

• 基础研究 •

维生素 D 在椎间盘退变中的作用及机制研究

颜珍珍¹ 李媛媛¹ 郭冉¹ 赵天才¹ 谢洋¹ 刘涛¹ 任志鑫¹ 袁宇飞¹ 苗洁¹ 张存^{1△}

[摘要] 目的:探讨维生素 D 对大鼠椎间盘退变的影响及其作用机制。方法:建立针刺诱导的椎间盘退变模型,随机分为假手术组、模型组、维生素 D(0.15 $\mu\text{g/kg}$)组和维生素 D(0.15 $\mu\text{g/kg}$) + 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂(Compound C, 20 mg/kg)组,每组 10 只。造模 1 周后,灌胃/腹腔注射相应药物,1 次/d,持续 4 周。用椎间盘高度指数(DHI)评估椎间盘退变程度;苏木精-伊红(HE)和番红 O-固绿染色观察尾椎间盘病理变化;TUNEL 染色检测髓核组织细胞凋亡水平;免疫组化染色检测髓核组织 Aggrecan、基质金属蛋白酶 13(MMP-13)、切割的半胱氨酸蛋白酶 3(Cleaved Caspase-3)、Bcl-2、Bax 表达;透射电镜观察髓核组织细胞线粒体结构变化;生化法检测髓核组织三磷酸腺苷含量及线粒体呼吸链复合物 I / II 活性水平;Western Blot 法检测髓核组织线粒体融合因子(Mfn)1、Mfn2、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)、动力相关蛋白 1(Drp1)、AMPK 及其磷酸化蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘高度指数降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),椎间盘结构紊乱,髓核萎缩、纤维环断裂、软骨终板基质丢失,呈明显退行性改变;椎间盘髓核组织 MMP-13、细胞凋亡率、Cleaved Caspase-3、Bax、p-Drp1/Drp1 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),Aggrecan、Bcl-2、三磷酸腺苷、呼吸链复合物 I / II、Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 水平均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且细胞线粒体结构损伤严重。与模型组比较,维生素 D 组大鼠椎间盘高度指数升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),椎间盘退变显著减轻,结构趋于正常,仅存轻微紊乱;椎间盘髓核组织 MMP-13、细胞凋亡率、Cleaved Caspase-3、Bax、p-Drp1/Drp1 水平均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),Aggrecan、Bcl-2、三磷酸腺苷、呼吸链复合物 I / II、Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且细胞线粒体结构损伤减轻。Compound C 可抑制维生素 D 对椎间盘退变大鼠的改善作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:维生素 D 可延缓大鼠椎间盘退变,恢复线粒体功能,抑制椎间盘髓核组织细胞凋亡,其机制可能与激活 AMPK/PGC-1 α 信号通路,从而改善髓核细胞线粒体动力学平衡有关。

[关键词] 维生素 D;椎间盘退变;细胞凋亡;线粒体动力学;AMPK/PGC-1 α 信号通路

[中图分类号] R681.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)05-0010-08

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260502

The Role and Mechanism of Vitamin D in Intervertebral Disc Degeneration

YAN Zhenzhen¹ LI Yuanyuan¹ GUO Ran¹ ZHAO Tiancai¹ XIE Yang¹LIU Tao¹ REN Zhixin¹ YUAN Yufei¹ MIAO Jie¹ ZHANG Cun^{1△}

¹ Handan Central Hospital, Handan 056001, Hebei China.

Abstract Objective: To investigate the effects of Vitamin D on intervertebral disc degeneration (IDD) in rats and to elucidate its protective mechanism. **Methods:** An acupuncture-induced IDD model was established. Rats were randomly divided into four groups ($n = 10$ per group): sham-operated group, model group, Vitamin D (0.15 $\mu\text{g/kg}$) group, and Vitamin D (0.15 $\mu\text{g/kg}$) + AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibitor (Compound C, 20 mg/kg) group. One week after model

establishment, the corresponding drugs were administered via gavage/intraperitoneal injection once daily for 4 consecutive weeks. The degree of disc degeneration was assessed using the disc height index (DHI). Pathological changes in the caudal intervertebral discs were observed by Hematoxylin-Eosin (HE)

基金项目:河北省卫生健康委员会医学科学研究课题计划项目 (20231964)

¹ 邯郸市中心医院(河北 邯郸, 056001)

[△]通信作者 E-mail: 13472406598@163.com

and Safranin O-Fast Green staining. The level of apoptosis in nucleus pulposus (NP) tissue was detected by TUNEL assay. Immunohistochemical staining was performed to measure the expression levels of Aggrecan, matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), Cleaved Caspase-3, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) in NP tissue. Mitochondrial structural changes in NP cells were observed using transmission electron microscopy (TEM). Biochemical assays were used to determine the adenosine triphosphate (ATP) content and the activity levels of mitochondrial respiratory chain complexes I and II in NP tissue. Western Blot was employed to detect the expression of Mitofusin 1 (Mfn1), Mitofusin 2 (Mfn2), Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α), Dynamin-related protein 1 (Drp1), AMPK, and its phosphorylated form (p-AMPK). **Results:** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited a significantly lower DHI ($P < 0.05$), disorganized disc structure, atrophy of the nucleus pulposus, rupture of the annulus fibrosus, and loss of cartilaginous endplate matrix, indicating significant degenerative changes. In the NP tissue, the levels of MMP-13, apoptosis rate, Cleaved Caspase-3, Bax, and the p-Drp1/Drp1 ratio were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of Aggrecan, Bcl-2, ATP, respiratory chain complexes I / II, Mfn1, Mfn2, p-AMPK/AMPK ratio, and PGC-1 α were significantly decreased ($P < 0.05$). Severe mitochondrial structural damage was also observed. Compared with the model group, the Vitamin D group showed a significantly higher DHI ($P < 0.05$), a significant mitigation of disc degeneration was observed, characterized by a structural normalization with exhibited only slight disorganization. Concomitantly, the NP tissue showed a marked decrease in several key degenerative indicators, including the levels of MMP-13, apoptotic rate, Cleaved Caspase-3, Bax, and the p-Drp1/Drp1 ratio ($P < 0.05$), while the levels of Aggrecan, Bcl-2, ATP, respiratory chain complexes I / II, Mfn1, Mfn2, p-AMPK/AMPK ratio, and PGC-1 α were significantly increased ($P < 0.05$). Mitochondrial structural damage was also ameliorated. Compound C was found to inhibit the ameliorative effects of Vitamin D on IDD in rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** Vitamin D can delay IDD in rats, restore mitochondrial function, and inhibit apoptosis in nucleus pulposus tissue. Its mechanism of action may be related to the activation of the AMPK/PGC-1 α pathway, thereby improving mitochondrial dynamics in nucleus pulposus cells.

Keywords: Vitamin D; intervertebral disc degeneration; apoptosis; mitochondrial dynamics; AMPK/PGC-1 α signaling pathway

椎间盘退变(IDD)的核心原因在于髓核细胞外基质(ECM)失衡,即胶原降解、基质金属蛋白酶激活、细胞凋亡^[1-2]。线粒体功能障碍被证明为细胞外基质分解的上游驱动^[3-4]。研究表明激活腺苷酸(AMP)活化蛋白激酶(AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)轴可恢复线粒体稳态、抑制凋亡^[5-6]。有研究显示维生素 D 缺乏与椎间盘退变程度正相关,且可激活 AMPK 改善线粒体功能^[7-8],但其能否通过 AMPK/PGC-1 α 延缓椎间盘退变尚无在体证据。本研究用大鼠椎间盘退变模型验证维生素 D 经该轴保护线粒体、减缓退变的作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只 7 周龄无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠由北京维通利华公司提供,体重为(220 $\pm$ 20) g,许可证编号为 SCXK 京 2024-0112。大鼠饲养于通风笼,控温(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 55% $\pm$ 10%,12 h/12 h 昼夜循环(20 $\sim$ 25 $^{\circ}\text{C}$),自由摄食饮水。本研究获得本院动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

1,25-二羟维生素 D₃ 购自上海罗氏制药公司;AMPK 抑制剂 Compound C 购自上海源叶公司;番红 O-固绿和苏木精-伊红(HE)染液购自北京索莱宝公司;

TUNEL 染色试剂盒购自上海碧云天公司;三磷酸腺苷(ATP)、线粒体呼吸链复合物 I 和 II 检测试剂盒购自南京建成生物公司;兔抗 Aggrecan、MMP-13、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax、Mfn1、Mfn2、PGC-1 α 、AMPK、p-AMPK、Drp1、p-Drp1、GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司。ECLIPSE 型显微镜购自日本 Nikon 公司;Western Blot 成像系统购自 Bio-Rad 公司;DR7500 数字化医用 X 射线摄影系统购自美国柯达公司;JEM-1400Plus 型场发射透射电镜购自日本 JEOL 公司;S60 数字全景扫描仪购自日本光子;M200 PRO 型多功能酶标仪购自瑞士帝肯公司。

1.3 方法

1.3.1 造模、分组及给药 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、维生素 D 组和维生素 D+AMPK 抑制剂组,每组 10 只。大鼠适应性饲养 1 周,除假手术组外,其余组大鼠参照文献[9]建立椎间盘退变模型:麻醉大鼠后,对尾部 Co6/7/8 节段进行酒精消毒,使用 21G 针头穿刺椎间盘。假手术组仅穿刺皮肤和肌肉(深约 2 mm),不损伤椎间盘;其余组避开动静脉,向椎间盘中心穿刺 5 mm,刺入后旋转针头 360 $^{\circ}$ 并留置 10 s,随后消毒并标记穿刺点,用输液贴保护。造模 1 周后,腰椎 X 线显示椎间盘高度降低,HE 染色可见髓核脊索细胞显著减少、纤维环板层结构紊乱,表明造模

成功^[10]。造模成功后,依据文献给药方案:维生素 D 组灌胃 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 维生素 D^[11],维生素 D+AMPK 抑制剂组在维生素 D 组灌胃基础上额外腹腔注射 20 mg/kg Compound C^[12],其余组同样操作,注射物替换为生理盐水,1 次/d,持续 4 周。

1.3.2 脊柱 X 线影像及椎间盘高度指数(DHI)测定

药物干预结束,大鼠经麻醉后,将其俯卧位固定于特制的放射摄影台上,使用软垫调整体位以确保脊柱自然伸展、无旋转或侧弯,重点定位 $L_4 \sim L_6$ 节段(可通过触摸髂嵴定位 L_6 椎体,向上依次为 L_5 和 L_4),采用数字化 X 线机以拍摄 $L_4 \sim L_6$ 脊柱正侧位片。用 ImageJ 软件测量 $L_{5/6}$ 椎体高度及椎间隙宽度并计算椎间盘高度指数评分。椎间盘高度指数=(椎间盘前缘高度+椎间盘后缘高度)/(邻近椎体前缘高度+邻近椎体后缘高度)。

1.3.3 HE 和番红 O-固绿染色

麻醉各组大鼠后,快速离断尾部,随机选取 5 只大鼠的部分尾椎置于 4%多聚甲醛中固定;其余大鼠尾椎在冰上分离 Co6/7/8 椎间盘组织,提取髓核后经液氮速冻,保存于 -80°C 冰箱。固定后的椎间盘组织经脱钙、梯度脱水、透明处理后石蜡包埋,制备 5 μm 切片,按常规方法行 HE 和番红 O-固绿染色,光学显微镜下观察病理变化并拍照。

1.3.4 TUNEL 染色

取椎间盘组织切片脱蜡至水后, 37°C 下 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K 处理 30 min, PBS 冲洗 3 次,按试剂盒操作步骤,依序施加 TUNEL 试剂盒成分,清洗并抗荧光淬灭剂封片(含 DAPI),荧光镜下观察并拍照,用 ImageJ 软件分析细胞凋亡率。

1.3.5 免疫组化染色

取椎间盘组织切片脱蜡至水后,抗原修复、酶消除,5% BSA 封闭 1 h, 4°C 下一抗 Aggrecan、MMP-13、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 孵育过夜,室温孵育二抗 2 h,苏木精复染后封片,光学显微镜下观察并拍照,用 ImageJ 软件对 Aggrecan、

MMP-13、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 阳性(棕色)面积半定量分析。

1.3.6 用透射电镜观察线粒体超微结构

取出 -80°C 下保存的髓核组织,剪碎后研磨,加入胶原酶 II 型混匀, 37°C 下消化 1 h。经 200 目滤网过滤, 4°C 下离心 5 min (1 500 r/min) 收集细胞沉淀,用 2.5%戊二醛固定。随后进行脱水、浸渍及琥珀酸酯包埋,切片后以醋酸铀和柠檬酸铅染色,透射电镜下观察细胞线粒体超微结构。

1.3.7 三磷酸腺苷及线粒体呼吸链复合物 I/II 活性测定

取 -80°C 下保存髓核组织,称取等量组织低温下进行研磨,并加入相应体积提取液制备组织匀浆, 4°C 下离心后取上清液。依照检测试剂盒说明书,测定三磷酸腺苷及线粒体呼吸链复合物 I/II 活性。

1.3.8 Western Blot 法检测

取 -80°C 下保存髓核组织,低温充分研磨后提取蛋白质,经 SDS-PAGE 分离并转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭。 4°C 下孵育一抗 Drp1、p-Drp1、Mfn1、Mfn2、PGC-1 α 、AMPK、p-AMPK 过夜,室温下二抗孵育 2 h。凝胶成像后,用 ImageJ 软件测条带灰度,结果以相对 GAPDH 蛋白的形式给出。

1.4 统计学方法

利用 GraphPad Prism 10.0 软件分析数据,数据符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,多组比较采用单因素方差分析和 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘退变程度的影响

与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘高度指数降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,维生素 D 组大鼠椎间盘高度指数升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 1 及表 1。

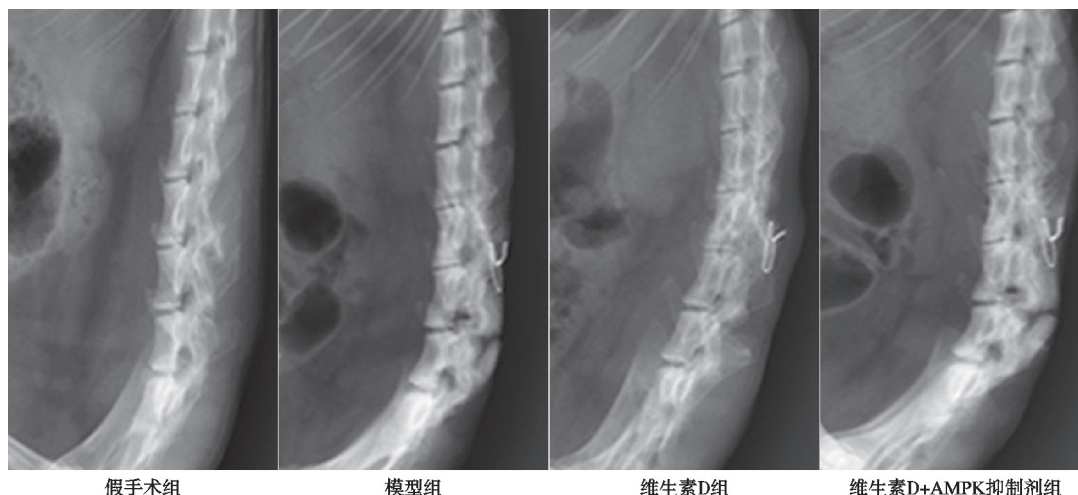


图 1 各组椎间盘退变大鼠 $L_4 \sim L_6$ 脊柱 X 线片

表 1 各组椎间盘退变大鼠 L₅~L₆ 椎间盘高度指数评分水平比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	椎间盘高度指数评分/分
假手术组	0.19±0.02
模型组	0.12±0.01 ¹⁾
维生素 D 组	0.15±0.02 ²⁾
维生素 D+AMPK 抑制剂组	0.14±0.02 ³⁾

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘组织病理学的影响

HE 染色显示,假手术组椎间盘轮廓清晰,髓核形态规则,纤维环纹理规整,未见明显退行性改变;模型组椎间盘出现明显的退行性改变,髓核区域缩小且不规则,纤维环层次紊乱,有部分区域出现裂隙或断裂;维生素 D 组椎间盘退行性改变减轻,髓核区域接近正常状态,纤维环排列较为整齐,但仍有一些轻微的紊乱;维生素 D+AMPK 抑制剂组椎间盘退行性改变较

模型组有所减轻,髓核区域较为完整但仍有轻微的不规则,纤维环排列稍显紊乱。

番红 O-固绿染色显示,假手术组软骨终板染色均匀,基质分布正常;模型组软骨终板染色不均,基质丢失严重,显示出明显的退变迹象;维生素 D 组软骨终板染色均匀,基质分布接近正常状态,退变迹象显著减少;维生素 D+AMPK 抑制剂组软骨终板染色较为均匀,基质丢失情况有所改善,见图 2。

2.3 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP-13 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组髓核组织 MMP-13 阳性率升高,Aggrecan 阳性率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组髓核组织 MMP-13 阳性率降低,Aggrecan 阳性率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与维生素 D 组比较,维生素 D+AMPK 抑制剂组髓核组织 MMP-13 阳性率升高,Aggrecan 阳性率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3 及表 2。

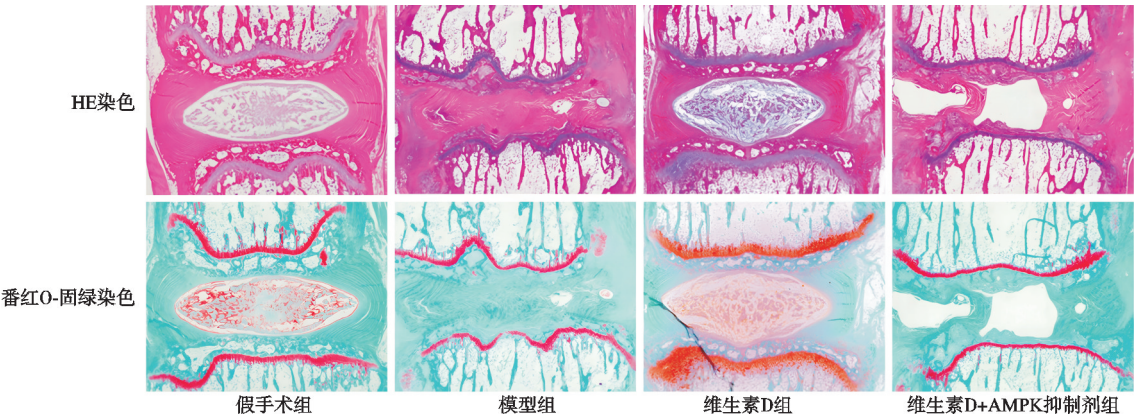


图 2 各组椎间盘退变大鼠椎间盘组织 HE 和番红 O-固绿染色情况 (10×)

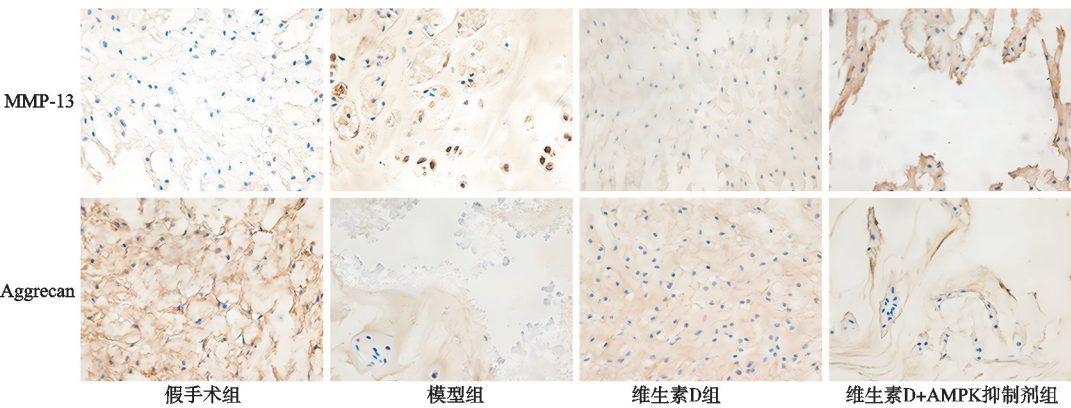


图 3 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP-13 蛋白免疫组化染色情况 (200×)

2.4 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织细胞凋亡的影响

与假手术组比较,模型组髓核组织细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组髓核组织细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与维生素 D 组比较,维生素 D+AMPK

抑制剂组髓核组织细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4 及表 3。

2.5 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织凋亡相关蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组髓核组织 Cleaved Caspase-3、Bax 阳性率升高,Bcl-2 阳性率降低,差异有

表 2 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 Aggrecan、MMP-13 阳性率比较($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	MMP-13	Aggrecan
假手术组	6.77 ± 1.48	47.47 ± 6.61
模型组	$35.42 \pm 2.56^{1)}$	$9.74 \pm 0.72^{1)}$
维生素 D 组	$19.62 \pm 1.55^{2)}$	$39.42 \pm 3.36^{2)}$
维生素 D+AMPK 抑制剂组	$31.92 \pm 2.74^{3)}$	$20.72 \pm 2.65^{2)3)}$

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组髓核组织 Cleaved Caspase-3、Bax 阳性率降低, Bcl-2 阳性率升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与维生素 D 组比较,维生素 D+AMPK 抑制剂组髓核组织 Cleaved Caspase-3、Bax 阳性率升高, Bcl-2 阳性率降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 5 及表 4。

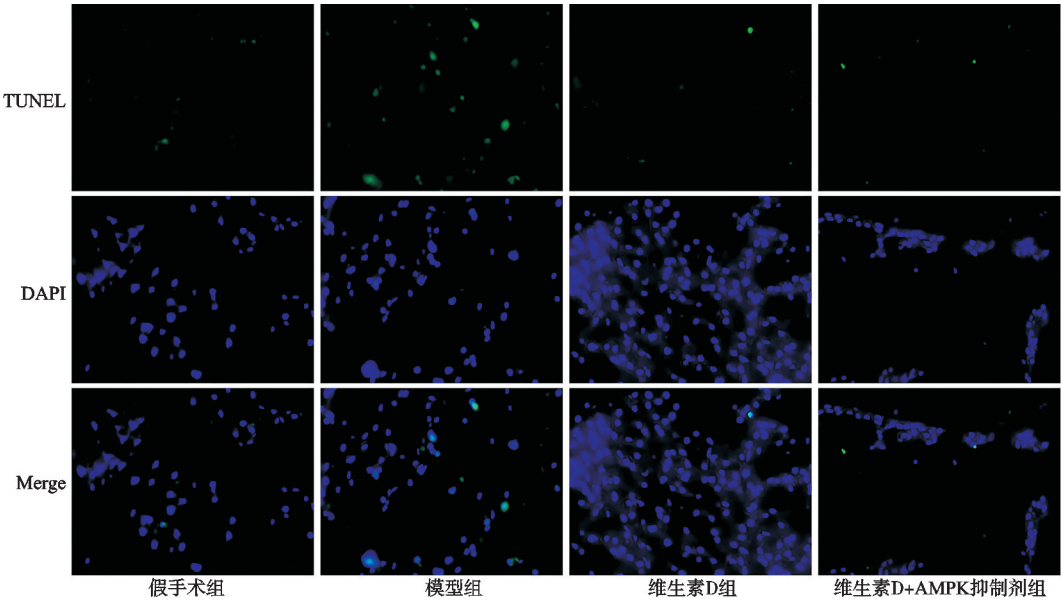


图 4 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 TUNEL 染色情况(200×)

表 3 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织细胞凋亡率比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率/%
假手术组	3.10 ± 0.65
模型组	$38.52 \pm 2.11^{1)}$
维生素 D 组	$5.99 \pm 0.90^{2)}$
维生素 D+AMPK 抑制剂组	$14.21 \pm 1.13^{2)3)}$

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

2.6 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织线粒体形态的影响

透射电镜显示,假手术组线粒体形态完整,膜及嵴结构清晰;模型组线粒体明显肿胀,膜结构破坏严重,内嵴紊乱甚至断裂,提示线粒体功能障碍与椎间盘退变密切相关;维生素 D 组线粒体形态最为接近正常状态,膜结构完整,内嵴排列规则,说明维生素 D 对线粒体具有一定的保护作用;维生素 D+AMPK 抑制剂组

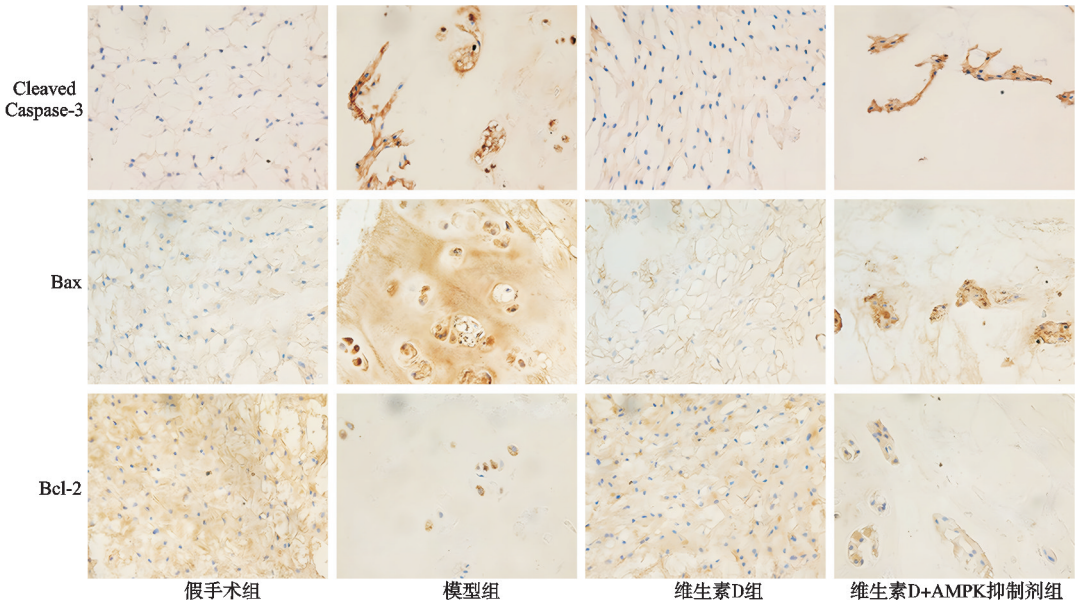


图 5 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白免疫组化染色情况(200×)

表 4 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl-2 阳性率比较($n=5, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	Cleaved Caspase-3	Bax	Bcl-2
假手术组	8.12 ± 1.37	4.78 ± 1.14	47.32 ± 5.25
模型组	$31.27 \pm 3.12^{1)}$	$50.00 \pm 5.89^{1)}$	$7.15 \pm 0.88^{1)}$
维生素 D 组	$15.38 \pm 1.17^{2)}$	$8.26 \pm 1.01^{2)}$	$28.52 \pm 2.60^{2)}$
维生素 D+AMPK 抑制剂组	$24.46 \pm 2.36^{2)3)}$	$29.38 \pm 3.14^{2)3)}$	$13.75 \pm 1.47^{2)3)}$

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

线粒体结构有所改善,肿胀减轻,膜结构部分恢复,但仍存在一定程度的内嵴紊乱,提示 AMPK 抑制剂可减轻维生素 D 对线粒体的修复作用,见图 6。

2.7 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织线粒体功能的影响

与假手术组比较,模型组髓核组织三磷酸腺苷、呼

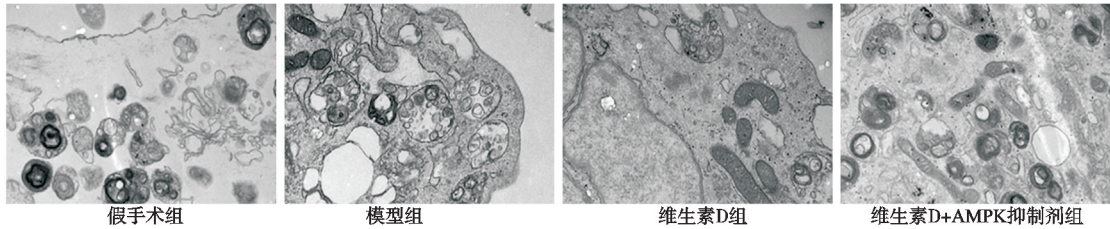


图 6 各组椎间盘退变大鼠椎间盘组织中线粒体超微结构(20 000 $\times$)

吸链复合物 I / II 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组髓核组织三磷酸腺苷、呼吸链复合物 I / II 水平升高,差异有统计学意义

($P<0.05$);与维生素 D 组比较,维生素 D+AMPK 抑制剂组髓核组织三磷酸腺苷、呼吸链复合物 I / II 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表 5 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织三磷酸腺苷、呼吸链复合物 I / II 水平比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	三磷酸腺苷/(nmol · L ⁻¹)	呼吸链复合物 I/(IU · mg ⁻¹)	呼吸链复合物 II/(IU · mg ⁻¹)
假手术组	268.23 ± 7.93	188.02 ± 8.59	108.28 ± 9.86
模型组	$92.42 \pm 9.51^{1)}$	$76.30 \pm 6.68^{1)}$	$46.65 \pm 3.40^{1)}$
维生素 D 组	$236.13 \pm 8.76^{2)}$	$170.96 \pm 11.47^{2)}$	$91.53 \pm 2.06^{2)}$
维生素 D+AMPK 抑制剂组	$146.61 \pm 8.15^{3)}$	$115.81 \pm 5.50^{3)}$	$70.58 \pm 5.11^{3)}$

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

2.8 维生素 D 对椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织线粒体动力学指标及 AMPK/PGC-1 α 通路相关蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组髓核组织 p-Drp1/Drp1 蛋白水平升高,Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,维生素 D 组髓核组织 p-Drp1/Drp1 蛋白水平降低,Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 蛋

白水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与维生素 D 组比较,维生素 D+AMPK 抑制剂组髓核组织 p-Drp1/Drp1 蛋白水平升高,Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 7 及表 6。

3 讨论

椎间盘退变是导致下腰痛的主要原因之一,其病理过程复杂,涉及细胞外基质降解、髓核细胞凋亡、炎

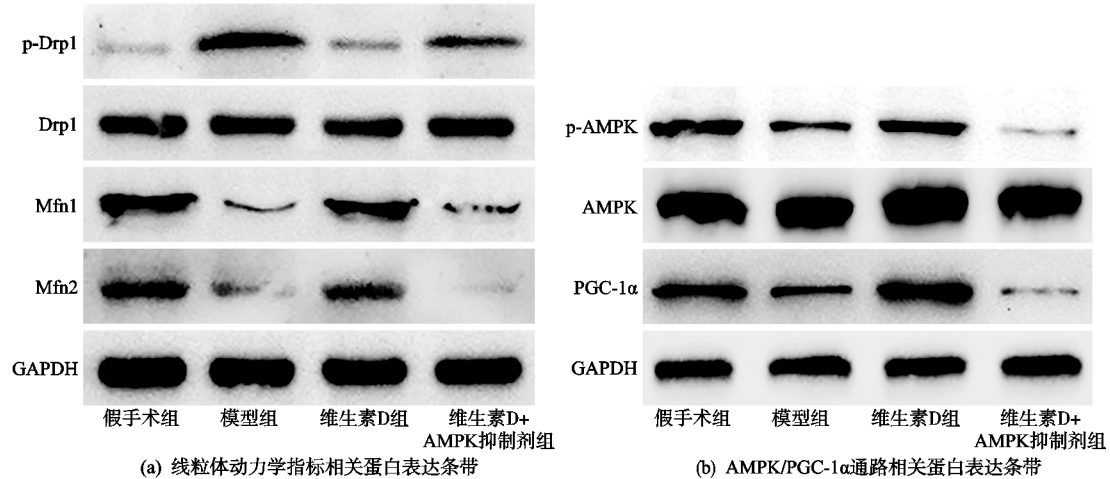


图 7 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织线粒体动力学指标及 AMPK/PGC-1 α 通路相关蛋白表达条带

表 6 各组椎间盘退变大鼠椎间盘髓核组织 p-Drp1/Drp1、Mfn1、Mfn2、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 蛋白水平比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	p-Drp1/Drp1	Mfn1	Mfn2	p-AMPK/AMPK	PGC-1 α
假手术组	0.12 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.11	0.89 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.09	0.83 $\pm$ 0.06
模型组	1.03 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.21 $\pm$ 0.03 ¹⁾	0.18 $\pm$ 0.01 ¹⁾	0.19 $\pm$ 0.02 ¹⁾	0.51 $\pm$ 0.05 ¹⁾
维生素 D 组	0.18 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.68 $\pm$ 0.10 ²⁾	0.58 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.45 $\pm$ 0.04 ²⁾	0.91 $\pm$ 0.08 ²⁾
维生素 D+AMPK 抑制剂组	0.50 $\pm$ 0.02 ²⁾³⁾	0.29 $\pm$ 0.03 ³⁾	0.17 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.13 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.14 $\pm$ 0.01 ²⁾³⁾

注:1)与假手术组相比, $P<0.05$;2)与模型组相比, $P<0.05$;3)与维生素 D 组相比, $P<0.05$ 。

症反应以及氧化应激等多个方面^[13-14]。本研究首次系统地探讨了维生素 D 通过调控 AMPK/PGC-1 α 信号通路,改善椎间盘退变中线粒体功能障碍的分子机制,取得了一系列有意义的发现。本研究采用针刺法成功建立大鼠椎间盘退变模型,表现为椎间盘高度下降、典型组织学退变及细胞外基质合成与降解失衡,同时伴有显著的髓核细胞凋亡,为后续药物评价提供了可靠模型基础。

研究表明维生素 D 并非仅通过调节钙磷代谢来影响脊柱的力学支撑,其活性形式作为一种激素,通过与椎间盘细胞上的受体结合,发挥多效性保护作用^[15]。最新临床研究显示,维生素 D 受体异常表达和启动子区高甲基化可能与椎间盘退行性病变的严重程度有关,表明维生素 D 受体可能成为评估病情和治疗的潜在靶点^[16]。Xu 等^[17]研究显示,维生素 D 可通过调节氧化还原平衡,减轻氧化应激损伤,同时保护椎体终板的微结构完整性,从而延缓去卵巢模型大鼠椎间盘退变的进程。此外, Li 等^[18]研究显示,维生素 D 缺乏通过激活 p38 激酶导致核受体辅阻遏蛋白 2 (NCoR2)降解,进而上调基质金属蛋白酶 ADAMTS 基因表达,加速椎间盘细胞外基质降解。本研究中,经维生素 D 干预后,大鼠的椎间盘高度指数显著升高,组织学染色明显可见椎间盘结构趋于正常。这表明维生素 D 作为一种临床上广泛使用的营养补充剂,具有潜在的椎间盘保护作用。

椎间盘退变的核心病理机制在于基质合成与降解失衡,其中 Aggrecan 作为主要结构蛋白维持髓核的水合与抗压功能,而 MMP-13 在炎症与机械应力作用下过度表达,介导 Aggrecan 及 II 型胶原的降解,导致基质丧失、椎间盘高度下降及功能减退^[19]。与此同时,髓核细胞因营养缺乏、炎症微环境及氧化应激等诱因发生凋亡,使基质合成能力显著降低^[20]。吴高臣等^[21]研究显示,敲低 X 染色体失活特异转录本 (XIST)可能通过上调 miR-132-3p 抑制炎症反应,促进髓核细胞增殖和 II 型胶原、Aggrecan 表达升高,从而改善大鼠椎间盘损伤和软骨基质流失。此外, Zhang 等^[22]研究表明,维生素 D 通过抑制 NF- κ B 通路激活,显著减轻了由 TNF- α 诱导的人髓核细胞凋亡。本研究中椎间盘退变大鼠髓核组织 Aggrecan 表

达下降与 MMP-13 升高共同导致细胞外基质失衡,同时髓核细胞凋亡显著,而维生素 D 干预后,基质降解和细胞凋亡现象均得到有效抑制。该结果提示维生素 D 的功能从钙磷代谢调节拓展至骨骼肌肉系统疾病防治,为椎间盘退变的干预提供了新的实验证据。

椎间盘退变的核心病理之一是髓核细胞的能量危机。Zhang 等^[23]研究表明,洋蓟素可以抑制椎间盘细胞铁死亡,防止线粒体萎缩和嵴密度降低。此外,彭鑫等^[24]研究显示,SS-31 预处理有效缓解炎症诱导的髓核细胞衰老和焦亡,通过抑制 NF- κ B、cGAS/STING 信号通路,改善线粒体功能和结构,从而减轻椎间盘退变。本研究发现,椎间盘退变模型组大鼠髓核组织中三磷酸腺苷含量及线粒体呼吸链复合物 I/II 的活性均显著下降,透射电镜结果也直观地显示了线粒体结构的严重损伤,如嵴断裂、肿胀甚至空泡化,这证实了线粒体功能障碍是椎间盘退变的关键驱动因素。而维生素 D 干预后,不仅逆转了三磷酸腺苷含量的下降和呼吸链复合物活性的降低,还显著改善了线粒体的超微结构。这些结果提示维生素 D 对椎间盘退变的保护作用,其根本机制可能在于恢复了髓核细胞的线粒体功能。

研究表明激活的 AMPK 可促进 PGC-1 α 表达,后者上调线粒体生物发生及融合蛋白(如 MFN1/2),同时影响分裂蛋白 DRP1 的活性,从而维持线粒体网络稳态^[25]。本研究发现椎间盘退变大鼠经维生素 D 干预后,显著激活了 AMPK 并上调 PGC-1 α 、Mfn1/2,下调 p-Drp1。为确证 AMPK/PGC-1 α 通路的核心地位,本研究使用 AMPK 抑制剂 Compound C 后,维生素 D 的所有有益效应均被阻断,表明其保护机制需通过激活 AMPK 实现。

本研究也存在以下局限性:首先,本研究采用的大鼠针刺模型虽经典,但与人类因年龄、遗传、力学负荷等因素导致的慢性椎间盘退变过程存在差异;其次,研究聚焦于 AMPK/PGC-1 α 通路,未涉及维生素 D 可能作用的其他通路(如 Wnt/ β -catenin 通路等)及其交叉对话;此外,结果仅基于体内动物实验,需通过体外人髓核细胞进一步验证,并深入探讨维生素 D 受体的具体作用。

综上所述,维生素 D 能够有效延缓大鼠椎间盘退

变,其核心分子机制是通过激活 AMPK/PGC-1 α 信号通路,进而改善髓核细胞的线粒体动力学平衡,恢复线粒体功能,最终抑制细胞凋亡并维持细胞外基质稳态。

参考文献

- [1] CHEN X L,ZHANG A R,ZHAO K C,et al. The role of oxidative stress in intervertebral disc degeneration; mechanisms and therapeutic implications[J]. Ageing Research Reviews,2024,98:102323.
- [2] XIN J G,WANG Y J,ZHENG Z,et al. Treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Orthopaedic Surgery, 2022,14(7):1271-1280.
- [3] ZONG Y,LI H,LIAO P,et al. Mitochondrial dysfunction; mechanisms and advances in therapy [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy,2024,9:124.
- [4] HUBENS W H G,VALLBONA-GARCIA A,DE COO I F M,et al. Blood biomarkers for assessment of mitochondrial dysfunction; an expert review [J]. Mitochondrion, 2022,62:187-204.
- [5] 张艳琼,石春霞,张清奇,等. 线粒体动力学与细胞骨架的研究进展[J]. 华南国防医学杂志,2024,38(9):809-812.
- [6] REN L M,LI C W,SUN J T,et al. Propionibacterium acnes evades microbicidal phagocytosis by inhibiting the mitochondrial biogenesis of nucleus pulposus cells[J]. The FEBS Journal,2026,293(1):295-317.
- [7] 高增杰,贾祎佳,覃裕,等. 从新视角探讨维生素 D 基础与临床最新研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2025,31(6):930-936.
- [8] 杜鑫,宋超,杜冰,等. 高海拔地区腰椎间盘突出人群血清 25 羟维生素 D 水平变化及意义[J]. 河北医药,2024,46(12):1805-1809.
- [9] LIU W,JIN S W,HUANG M,et al. Duhuo Jisheng decoction suppresses matrix degradation and apoptosis in human nucleus pulposus cells and ameliorates disc degeneration in a rat model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020,250:112494.
- [10] 朱在师,黄泽灵,陈俊名,等. 枳壳甘草汤对椎间盘退变模型大鼠尾椎间盘髓核组织细胞凋亡及 Hippo-YAP/TAZ 信号通路的影响[J]. 中医杂志,2025,66(5):509-517.
- [11] 贾二霞,徐娜,李帅,等. 维生素 D 介导 MEK/ERK 通路对妊娠糖尿病大鼠心肌损伤的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(7):1014-1018.
- [12] 魏超,于江,盛关云,等. 棕矢车菊素调节 AMPK/NLRP3 信号通路对骨关节炎大鼠炎性损伤的影响[J]. 中国药房,2025,36(4):421-426.
- [13] KANG L,ZHANG H Q,JIA C Y,et al. Epigenetic modifications of inflammation in intervertebral disc degeneration[J]. Ageing Research Reviews,2023,87:101902.
- [14] YANG X,CHEN Y,GUO J D,et al. Polydopamine nanoparticles targeting ferroptosis mitigate intervertebral disc degeneration via reactive oxygen species depletion, iron ions chelation, and GPX4 ubiquitination suppression[J]. Advanced Science,2023,10(13):2207216.
- [15] LAN T,YAN B,GUO W Z,et al. VDR promotes nucleus pulposus cell mitophagy as a protective mechanism against oxidative stress injury[J]. Free Radical Research, 2022,56(3/4):316-327.
- [16] VAJARINTARANGOON L, LIMTHONGKUL W, SINGHATANADGIGE W,et al. Downregulation and hypermethylation of vitamin D receptor in lumbar disc degeneration[J]. International Journal of Molecular Sciences,2025,26(7):3226.
- [17] XU H W,FANG X Y,CHEN H,et al. Vitamin D delays intervertebral disc degeneration and improves bone quality in ovariectomized rats [J]. Journal of Orthopaedic Research,2024,42(6):1314-1325.
- [18] LI X G,WANG B,WANG X N,et al. Vitamin D deficiency promotes intervertebral disc degeneration via p38/NCoR2-mediated extracellular matrix degradation[J]. European Journal of Nutrition,2025,64(4):163.
- [19] 郭佳霖,何志伟,杨学军. 天然小分子治疗椎间盘退变的作用机制研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2022,32(10):945-953.
- [20] 李季霖,周红海,余进爵,等. 髓核细胞凋亡相关信号通路研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2021,31(2):178-182.
- [21] 吴高臣,陈金鹏,孟凡剑,等. XIST 对椎间盘退变大鼠髓核细胞增殖及细胞外基质合成的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志,2024,49(7):823-831.
- [22] ZHANG C,TONG T,MIAO D C,et al. Vitamin D inhibits TNF- α induced apoptosis of human nucleus pulposus cells through regulation of NF- κ B signaling pathway[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2021,16(1):411.
- [23] ZHANG P,RONG K W,GUO J D,et al. Cynarin alleviates intervertebral disc degeneration via protecting nucleus pulposus cells from ferroptosis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2023,165:115252.
- [24] 彭鑫,王志强,张桐,等. 线粒体靶向肽 SS-31 对炎症诱导髓核细胞衰老和焦亡的作用及机制研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2025,35(4):399-407.
- [25] MIKHAIL A I,NG S Y,MATTINA S R,et al. AMPK is mitochondrial medicine for neuromuscular disorders[J]. Trends in Molecular Medicine,2023,29(7):512-529.

(收稿日期:2025-08-13)