

脊髓巨噬细胞集落刺激因子及其受体在复杂性 局部疼痛综合征 I 型病程中的变化*

廖志敏¹, 唐昱英^{1△}, 郑阳春², 徐 丹³

1. 四川大学华西第二医院 麻醉科 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(成都 610041);
2. 四川省肿瘤医院 肠道外科(成都 610041); 3. 四川大学华西医院 呼吸病学研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究以大鼠后肢缺血再灌注所模拟的复杂性局部疼痛综合征 I 型(CRPS I)在建模后神经病理性疼痛行为学变化和脊髓组织中巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和其受体 CSF-1R 在脊髓中的分布和表达。**方法** 采用大鼠后肢缺血再灌注方法建立 CRPS I 模型,在再灌注后 14 d 内每天连续观察缺血足底机械痛阈和热痛阈的变化。采用免疫荧光双标染色技术显示脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 在小胶质细胞和星状胶质细胞上的分布,以及在再灌注后 3 d、7 d 和 14 d M-CSF 和 CSF-1R 表达量的变化。**结果** 在缺血再灌注后 1~14 d,缺血足底的机械痛阈和热痛阈均较对照组降低($P<0.05$);M-CSF 由脊髓星状胶质细胞分泌,其特异性受体 CSF-1R 则主要分布在脊髓小胶质细胞上;在再灌注后 7 d 和 14 d,缺血同侧脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 的表达较对照组增加($P<0.05$)。**结论** CRPS I 模型在建模后 14 d 内,缺血同侧机械痛阈和热痛阈降低,缺血同侧脊髓组织中星状胶质细胞分泌的 M-CSF 和小胶质细胞上的 CSF-1R 含量增加。

【关键词】 复杂性局部疼痛综合征 I 型 巨噬细胞集落刺激因子 小胶质细胞

Expressions of Spinal Macrophage Colony Stimulating Factor and Its Receptor CSF-1R in the Development of Complicated Regional Pain Symptom I LIAO Zhi-min¹, TANG Yu-ying^{1△}, ZHENG Yang-chun², XU Dan³. 1. Department of Anesthesiology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 2. Department of Intestinal Surgery, Sichuan Provincial Cancer Hospital, Chengdu 610041, China; 3. Institute of Respiratory Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yuyingtang@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the changes of mechanical allodynia and temperature hyperalgesia, as well as the expression of the spinal macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and its receptor CSF-1R during the development of complicated regional pain symptom I (CRPS I). **Methods** The animal model of CRPS I was established using prolonged ischemia-reperfusion injury of rodent left hindpaw. The mechanical allodynia and temperature hyperalgesia of ipsilateral hindpaw were continuously measured for 14 d after reperfusion, and the expressions of spinal M-CSF and CSF-1R in ipsilateral spinal cord horn were measured with immunofluorescence technique on day 3, day 7 and day 14 after reperfusion. **Results** The thresholds of mechanical allodynia and temperature hyperalgesia of ipsilateral hindpaw were significantly decreased ($P<0.05$). M-CSF was secreted by the astrocytes. CSF-1R was primarily distributed on the microglia. The immunofluorescence intensities of M-CSF and CSF-1R in ipsilateral spinal cord horn were significantly increased on day 7 and day 14 after reperfusion ($P<0.05$). **Conclusion** The ischemia-reperfusion injury simulated pain syndrome in CRPS I and increased the expressions of spinal M-CSF and CSF-1R.

【Key words】 Complicated regional pain symptom I Macrophage colony stimulating factor Microglia

复杂性局部疼痛综合征 I 型(complex regional pain syndrome I, CRPS I)是一种常见的难治性神经病理性疼痛,由最初的外周神经损伤或全身性疾病等伤害性刺激进行性发展为以严重顽固性慢性疼痛为特征的临床综合征,主要表现为自发痛、痛觉过

敏和痛觉超敏。目前尚无确切有效的临床治疗方法,进一步研究 CRPS I 的病因机制具有重要的临床意义^[1]。

神经胶质细胞,特别是小胶质细胞和星状胶质细胞是维持神经元微环境稳态的重要支持细胞,也是神经病理性疼痛形成的关键因素。外周神经或脊神经损伤后,脊髓小胶质细胞和星状胶质细胞激活并释放各种促炎因子和炎性介质,直接或间接提高

* 国家自然科学基金(No. 81500963)资助

△ 通信作者, E-mail: yuyingtang@sohu.com

神经元对伤害性刺激的敏感性^[2-3]。现在普遍认为,包括 CRPS I 在内的众多神经病理性疼痛均是神经炎性疾病。近年来研究发现,巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)和其受体(colonystimulating factor 1 receptor, CSF-1R)可能是星状胶质细胞和小胶质细胞之间新的信息传递通路。星状胶质细胞分泌的 M-CSF 可能通过作用于小胶质细胞上的 CSF-1R 从而调控其生存增殖,进而参与各种神经免疫疾病的发生发展^[4-5]。生理状态下,成年中枢神经系统中的 M-CSF 和其受体 CSF-1R 表达量均较少,但在炎症和缺血变性等病理条件下, M-CSF 和 CSF-1R 表达量明显增多^[6-8]。但目前尚无 M-CSF/CSF-1R 在神经病理性疼痛中的相关研究。因此,本研究拟采用大鼠后肢缺血再灌注建立 CRPS I 模型,在建模后 14 d 内连续测量大鼠缺血足底机械痛阈和热痛阈的变化,并采用免疫荧光双标技术观察在建模后 3、7 和 14 d M-CSF 和 CSF-1R 在脊髓胶质细胞的分布和表达量的改变,初步探讨 M-CSF/CSF-1R 信号通路参与 CRPS I 疼痛敏化的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验动物、仪器和主要试剂

成年雄性 SD 大鼠(体质量 250 g, 四川成都达硕实验动物有限公司提供), Von Frey 纤维丝测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司), 336 爪尾刺激痛觉测试仪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 小鼠抗 CD11b/OX-42(编号: ab1211, Abcam 公司), 小鼠抗神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)(编号: ab10062, Abcam 公司), 兔抗 CSF-1R 多克隆抗体(编号: sc-13949, Santa Cruz 公司), 兔抗 M-CSF 多克隆抗体(编号: sc-13103, Santa Cruz 公司), 山羊抗兔 FITC-IgG(编号: ab97050, Abcam 公司)和山羊抗小鼠 IgG-Cy3(编号: ab97035, Abcam 公司)。

1.2 实验分组

SD 雄性大鼠随机分为对照组和 CRPS I 组。CRPS I 组参照 CODERRE 等^[9]加压缺血方法建立 CRPS I 模型: 大鼠戊巴比妥钠麻醉后, 采用内径 5.5 mm 的 O 型橡胶圈套扎于大鼠左后足近踝关节处, 5 h 后剪断橡胶圈。对照组不套扎。在 CRPS I 建模后 14 d 连续监测机械痛阈和热痛阈, 对照组和 CRPS I 组每组各 12 只大鼠。采用免疫荧光双标法分别在 CRPS I 建模后 3、7 和 14 d 荧光标记大鼠脊髓组织中星状胶质细胞 + M-CSF 和小胶质细

胞 + CSF-1R, CRPS I 和对照组大鼠各时点均 5 只。

1.3 机械痛阈的测定

每只大鼠按编号顺序于每日上午 9~11 点进行 Von Frey 机械缩爪阈值测定: 将大鼠放置于底为铁丝网的有机玻璃箱中适应 30 min, 大鼠安静后, 依次采用不同折力的 Von Frey 丝(分别为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0 和 26.0 g), 从小到大垂直刺激大鼠左侧足底光滑皮肤, 每次持续 6~8 s, 观测并记录足回缩反应(如舔足、甩腿等)时的刺激强度值。平均测试 5 次取平均值, 每次刺激间隔 10 s。

1.4 热痛阈的测定

每只大鼠按编号顺序于每日下午 2~5 点进行热痛阈的测定。将大鼠置于透明玻璃板上适应 30 min 后, 用加热头照射大鼠左侧足底直至出现抬腿回避, 并记录该时间段。平均测试 3 次取平均值, 每次刺激间隔 5 min。测试仪参数设定: 加热头空闲时激光发射强度为 20%, 加热头测试工作时激光发射强度为 60%, 切断时间 25 s, 触发温度 30 ℃。

1.5 脊髓免疫荧光双染检测 M-CSF 和 CSF-1R 的表达

大鼠戊巴比妥钠麻醉后, 打开胸腔, 暴露心脏, 剪开右心耳, 从左心室插入灌流针经主动脉匀速灌注生理盐水。待血水冲净后, 继而灌注体积分数为 4% 的多聚甲醛 200 mL。随后大鼠从腰骶部逐层剥离皮下组织、椎旁肌和棘间组织, 暴露脊髓。取脊髓腰膨大放入体积分数为 4% 的多聚甲醛中固定 12 h 后移入 300 g/L 蔗糖液沉底。待脊髓组织沉底后取出 OCT 包埋冰冻切片, 片厚 25 μ m。采用漂片法对脊髓冰冻切片进行免疫荧光双标法。具体步骤包括: ① 0.01 mmol/L PBS 冲洗后以 3 mL/L TritonX-100 常规破膜 30 min; ② 0.01 mmol/L PBS 冲洗后以 100 mL/L 山羊血清封闭, 室温 30 min; ③ 用滤纸吸干山羊血清后分别加入两种一抗, 浓度分别为小鼠抗 CD11b/OX-42(1:250)/兔抗 CSF-1R 多克隆抗体(1:100)和小鼠抗 GFAP(1:250)/兔抗 M-CSF 多克隆抗体(1:100), 然后 4 ℃ 湿盒内孵育过夜; ④ 次日取出以 0.01 mmol/L PBS 冲洗后加上相对应的二抗, 二抗浓度分别为山羊抗兔 FITC-IgG(1:500)/山羊抗小鼠 IgG-Cy3(1:500)混合组成, 并在 4 ℃ 湿盒内避光孵育 1 h; ⑤ 以 0.01 mmol/L PBS 冲洗后以 DAPI 复染细胞核 5 min, 并以防淬灭剂封片; ⑥ 荧光显微镜下观察并在相同拍摄条件下拍照。每只大鼠随机选择 4 张切片, 并采用 Image Pro Plus 对图片进行免疫荧光

灰度分析。以上实验每组染色均设有阴性对照,以 0.01 mmol/L PBS 代替一抗,其余步骤相同。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

对照组和 CRPS I 组大鼠在建模后 14 d 摄食、饮水和运动等一般表现均较正常。与对照组相比,CRPS I 组大鼠左侧后足在缺血再灌注后均出现了充血水肿,其中 3 只大鼠(25%)在再灌注后 14 d 因自发性疼痛出现了自噬现象。

2.2 机械痛阈和热痛阈实验结果

见图 1、图 2。对照组和 CRPS I 组实验前机械痛阈和热痛阈差异均无统计学意义。与对照组左侧足底比较,CRPS I 组左侧足底在建模后 1~14 d 机

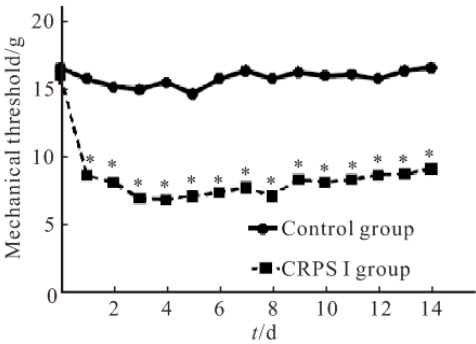


图 1 缺血再灌注后 14 d 机械痛阈的变化
Fig 1 The changes in mechanical threshold within 14 d after ischemia/refusion

* $P < 0.01$, vs. control group at the same time point

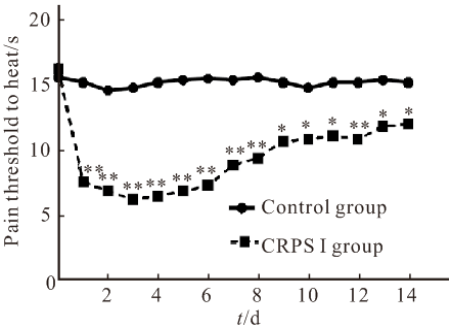


图 2 缺血再灌注后 14 d 热痛阈的变化
Fig 2 The changes in pain threshold to heat stimulation within 14 d after ischemia/refusion

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group at the same time point

械痛阈和热痛阈均降低($P < 0.01$)。

2.3 M-CSF 和 CSF-1R 在脊髓胶质细胞中的分布定位

免疫荧光双染结果显示(图 3、图 4):在脊髓组织中,M-CSF 主要与星状胶质细胞标记物 GFAP 吻合度较高,而 CSF-1R 则主要与小胶质细胞的特异性标记物 OX-42 相重叠。这提示 M-CSF 主要由星状胶质细胞分泌,其特异性受体 CSF-1R 主要分布在小胶质细胞上。

2.4 脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 表达量的改变

在 CRPS I 建模后 3 d,缺血同侧脊髓 M-CSF

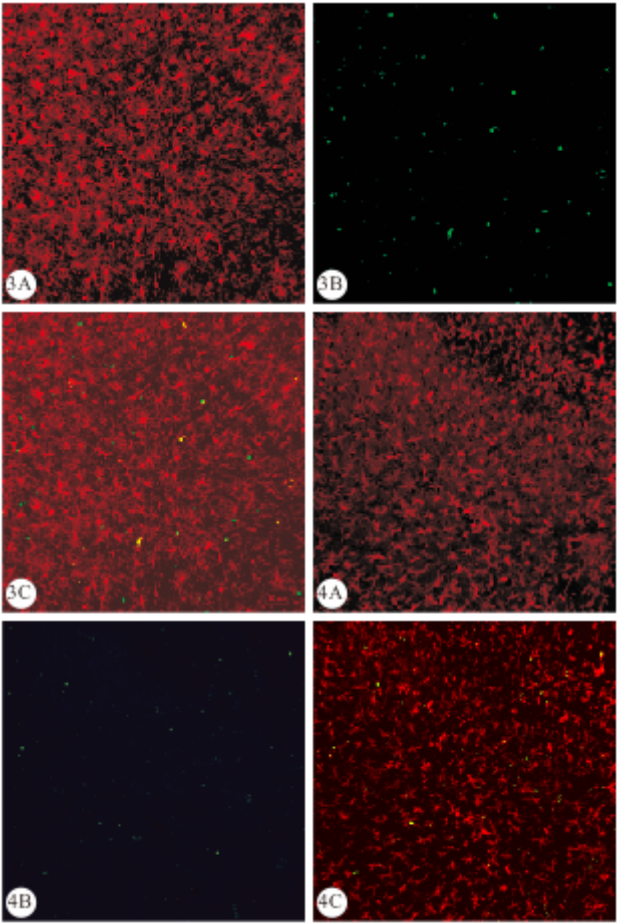


图 3 缺血再灌注后 7 d 脊髓后角星状胶质细胞分泌的 M-CSF。× 40
图 4 缺血再灌注后 7 d 脊髓后角小胶质细胞上分布的 CSF-1R。× 40

Fig 3 The M-CSF secreted by the astrocytes in the spinal dorsal horn on day 7 after ischemia refusion. × 40
Fig 4 The CSF-1R distributed on the microglia in the spinal dorsal horn on day 7 after ischemia refusion. × 40

3A: The astrocytes marked by GFAP;3B: The M-CSF marked by M-CSF antibody;3C: Astrocytes and M-CSF were merged;4A: The microglia marked by CD11b;4B: The CSF-1R marked by CSF-1R antibody;4C: Microglia and CSF-1R were merged

和 CSF-1R 免疫荧光强度与对照组相比差异无统计学意义。在 CRPS I 建模后 7 d 和 14 d, 缺血同侧脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 免疫荧光强度较对照组和建模后 3 d 均增加 ($P < 0.05$), 但建模后 7 d 和 14 d 比较, 缺血同侧脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 免疫荧光强度的差异无统计学意义。见图 5、图 6。

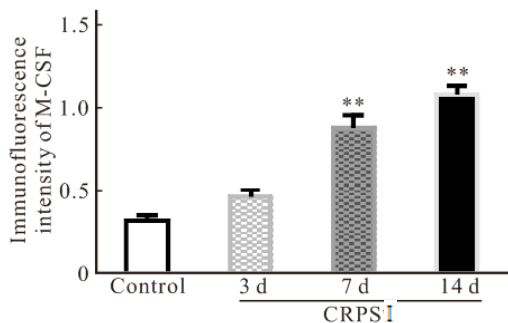


图 5 左侧脊髓后角 M-CSF 免疫荧光变化

Fig 5 The changes in immunofluorescence intensity of M-CSF in the left spinal dorsal horn

* * $P < 0.01$, vs. control group and CRPS I 3 d group

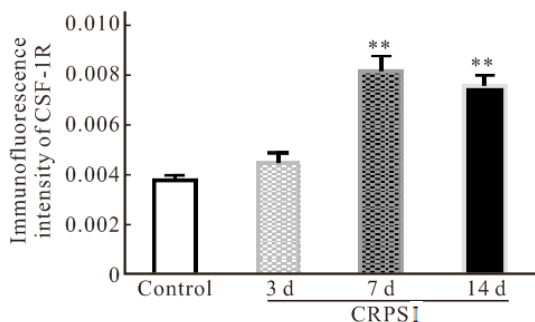


图 6 左侧脊髓后角 CSF-1R 免疫荧光变化

Fig 6 The changes in immunofluorescence intensity of CSF-1R in the left spinal dorsal horn

* * $P < 0.01$, vs. control group and CRPS I 3 d group

3 讨论

本研究发现, 缺血再灌注损伤能较好的复制包括自发病、机械性痛觉超敏和热痛觉过敏等 CRPS I 临床病理性疼痛表现; M-CSF 主要由脊髓星状胶质细胞分泌, CSF-1R 则主要分布在小胶质细胞上; CRPS I 建模后 7 d 和 14 d 缺血同侧脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 表达量较对照组明显增加。

CRPS I 常继发于骨折、挤压伤、软组织损伤和关节镜术后, 又称为反射性交感神经营养不良症, 其临床表现形式多样, 突出特征是疼痛, 包括自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏^[1]。既往研究显示 CRPS I 是一种进行性发展的炎症疾病, 与外周肢体缺血再灌注损伤有关^[10]。在本研究中, CRPS I 大鼠在

缺血 5 h 再灌注后 14 d 双侧下肢活动正常, 但缺血侧足底出现了机械痛阈和热痛阈的下降, 部分大鼠出现了自发性疼痛, 这表明本研究采用的缺血再灌注损伤较好的模拟了 CRPS I 的临床疼痛表现。

脊髓胶质细胞, 特别是小胶质细胞和星状胶质细胞具有维持神经元微环境稳态、调控神经免疫性疾病的功能。目前普遍认为, 神经病理性疼痛的本质是神经炎症功能紊乱, 脊髓胶质细胞在神经病理性疼痛的发生发展中发挥重要的作用。外周神经损伤后, 脊髓小胶质细胞作为中枢神经系统的固有免疫细胞, 能迅速被激活, 平时在静息态小胶质细胞上不表达或表达量很低的表面受体也会迅速增加, 使小胶质细胞表现出较强的抗原递呈能力和免疫效应器作用, 释放多种炎症因子, 并持续作用于神经元提高其兴奋性, 促进神经病理性疼痛的发生。而星状胶质细胞能分泌细胞因子或炎症介质并持续特异性作用于小胶质细胞上相应受体, 促进小胶质细胞迁移增生和免疫分泌功能, 从而维持神经病理性疼痛的发展^[11]。因此研究星状胶质细胞和小胶质细胞有利于更好的阐述神经病理性疼痛病因机制。

M-CSF 是一种重要的血源性巨噬细胞生长因子, 通过作用于其特异性受体 CSF-1R 从而刺激单核巨噬细胞的生存、发育、增殖和分化。在胚胎或新生时期, 中枢神经系统中的 M-CSF 和 CSF-1R 含量较高, 以更好的促进脑内单核巨噬细胞的发育。随着年龄的增长, 脑内 M-CSF 和 CSF-1R 的表达逐渐降低。但在 Alzheimer 病、多发性硬化和人类免疫缺陷病毒性脑炎等神经免疫疾病和缺血缺氧等病理刺激下, 中枢神经系统中的 M-CSF 和 CSF-1R 的表达量又会明显增多^[6]。M-CSF/CSF-1R 是调控小胶质细胞存活和生理功能的重要信号通路。研究证明: 提高培养基中 M-CSF 浓度能使小胶质细胞存活率增高并促使小胶质细胞增殖, 而缺乏 M-CSF 会使小胶质细胞出现明显的 DNA 缺口标记^[12]。M-CSF 还能刺激小胶质细胞释放诱导型一氧化氮合酶、白细胞介素(IL)-1 α 、巨噬细胞炎症蛋白 1 α 和 IL-6 等促炎因子^[12]。最新研究^[13]表明, CSF-1R 拮抗剂能有效减少中枢小胶质细胞数量, 并对认知情感等神经功能无明显影响。停用 CSF-1R 拮抗剂后, 中枢神经系统中小胶质细胞能迅速自身增殖分化为正常的小胶质细胞。着眼于小胶质细胞上的 CSF-1R 对神经免疫相关疾病具有可开发的临床前景。值得注意的是, 同 M-CSF 在建模后 14 d 持续增加的趋势相比较, 本研究中 CSF-1R 在建模后 7 d

和 14 d 呈稳定表达,甚至稍有下降趋势。这可能与分泌 M-CSF 的星状胶质细胞和含有 CSF-1R 的小胶质细胞在神经病理性疼痛中的不同维持时间有关。研究已证实:外周神经损伤后,脊髓后角的小胶质细胞和星状胶质细胞都被激活,但前者在损伤后 24 h 即被激活,其激活状态常在 3 个月内即消退。星状胶质细胞则在损伤后 3 d 才开始呈现激活状态,但持续时间较长^[14]。我们推测,M-CSF 和 CSF-1R 不同表达趋势可能与其各自相关的胶质细胞在神经病理性疼痛发生发展的不同作用有关。

在本研究中,我们验证了 M-CSF 主要由星形胶质细胞分泌,CSF-1R 则主要分布在小胶质细胞上;同时发现在 CRPS I 建模后 7 d 和 14 d,缺血同侧脊髓 M-CSF 和 CSF-1R 荧光表达量明显增加。结合本研究中机械痛阈和热痛阈实验结果,上述证据提示:M-CSF/CSF-1R 信号通路可能参与 CRPS I 中病理性疼痛的维持。

参 考 文 献

- [1] BRUEHL S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*, 2010, 113(3): 713-725.
- [2] CALVO M, BENNETT DL. The mechanisms of microgliosis and pain following peripheral nerve injury. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 271-282.
- [3] JI RR, BERTA T, NEDERGAARD M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy? *Pain*, 2013, 154(Suppl 1): S10-S28 [2015-08-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858488/>. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022.
- [4] SMITH AM, GIBBONS HM, OLDFIELD RL, *et al.* M-CSF increases proliferation and phagocytosis while modulating receptor and transcription factor expression in adult human microglia. *J Neuroinflammation*, 2013(10): 85. doi: 10.1186/1742-2094-10-85.
- [5] MITRASINOVIC OM, PEREZ GV, ZHAO F, *et al.* Overexpression of macrophage colony-stimulating factor receptor on microglial cells induces an inflammatory response. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 30142-30149.
- [6] PYONTECK SM, AKKARI L, SCHUHMACHER AJ, *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1264-1272.
- [7] VIDYADARAN S, OOI YY, SUBRAMAIAM H, *et al.* Effects of macrophage colony-stimulating factor on microglial responses to lipopolysaccharide and beta amyloid. *Cell Immunol*, 2009, 259(1): 105-110.
- [8] LIU W, XU GZ, JIANG CH, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor and its receptor signaling augment glycated albumin-induced retinal microglial inflammation *in vitro*. *BMC Cell Biol*, 2011(12): 5. doi: 10.1186/1471-2121-12-5.
- [9] CODERRE TJ, XANTHOS DN, FRANCIS L, *et al.* Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*, 2004, 112(1/2): 94-105.
- [10] KIM YO, KIM IJ, YOON MH. Antiallodynic effect through spinal endothelin-B receptor antagonism in rat models of complex regional pain syndrome. *Neurosci Lett*, 2015(584): 45-49 [2015-08-06]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394014008088>. doi: 10.1016/j.neulet.2014.10.005.
- [11] LIU W, TANG Y, FENG J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*, 2011, 89(5/6): 141-146.
- [12] WATKINS LR, HUTCHINSON MR, LEDEBOER A, *et al.* Glia as the “bad guys”: implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*, 2007, 21(2): 131-146.
- [13] ELMORE MR, NAJAFI AR, KOIKE MA, *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 2014, 82(2): 380-397.
- [14] MIKA J, ZYCHOWSKA M, POPIOLEK-BARCZYK K, *et al.* Importance of glial activation in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 2013, 716(1/2/3): 106-119.

(2015-09-06 收稿, 2016-05-29 修回)

编辑 余琳