

·基础研究·

## 皮下注射巨噬细胞集落刺激因子诱导 机械痛超敏的性别二态性

彭湘格<sup>1</sup>, 林震嘉<sup>1</sup>, 张辉<sup>2</sup>, 冷世泽<sup>2</sup>, 唐源<sup>1</sup>, 郑钰凡<sup>1</sup>, 谈智<sup>1</sup>, 周利君<sup>1</sup>

(1. 中山大学中山医学院生理教研室//中山大学疼痛研究中心, 广东广州 510080; 2. 广东省第二人民医院麻醉科, 广东广州 510317)

**摘要:**【目的】通过正常小鼠皮下注射巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)来研究其对疼痛行为的影响是否存在性别差异,并初步探讨其机制。【方法】将30只10周龄C57 BL/6J小鼠随机分为三组(每组10只,雌雄各半):牛血清白蛋白对照组(BSA, 0.3  $\mu$ g)、低剂量M-CSF组(L M-CSF, 0.075  $\mu$ g)、高剂量M-CSF组(H M-CSF, 0.3  $\mu$ g)。分别于左大腿内侧皮下注射50  $\mu$ L BSA或M-CSF,每日1次,连续3 d。给药前后采用von-Frey机械敏感性测试检测各组小鼠的机械撤足阈值(PWT)。再用免疫荧光染色法观察皮肤离子钙结合衔接蛋白1(Iba1), L5-L6 DRG及腰段脊髓背角中降钙素基因相关肽(CGRP)、磷酸化细胞外信号调节激酶( $p$ -ERK)的表达变化。【结果】在雌性小鼠中,只有高剂量M-CSF引起显著的机械痛超敏,而在雄性小鼠中两个剂量都引起明显痛觉异常。机制上,高剂量M-CSF诱导雌性小鼠皮下巨噬细胞大量聚集(Iba1标识);雄性小鼠巨噬细胞呈浓度依赖性增多,但没有雌性小鼠明显。在DRGs中, $p$ -ERK与CGRP表达增多也存在类似的性别差异。值得注意的是,CGRP在雄性小鼠DRG的神经纤维中显著升高。相应地,脊髓背角浅层的 $p$ -ERK与CGRP<sup>+</sup>末梢在M-CSF处理后显著增多,且雄性小鼠多于雌性小鼠。【结论】皮下注射M-CSF诱发的机械性痛觉超敏存在性别二态性,并与外周巨噬细胞扩增和伤害性通路敏化的差异性变化有关。

**关键词:** 痛觉超敏; 性别二态性; 巨噬细胞; 巨噬细胞集落刺激因子; 降钙素基因相关肽

中图分类号: R441.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2023)03-0395-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0305

### Sexual Dimorphism in Mechanical Hypersensitivity Induced by Subcutaneous Injection of M-CSF

PENG Xiang-ge<sup>1</sup>, LIN Zhen-jia<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, LENG Shi-ze<sup>2</sup>, TANG Yuan<sup>1</sup>,  
ZHENG Yu-fan<sup>1</sup>, TAN Zhi<sup>1</sup>, ZHOU Li-jun<sup>1</sup>

(1. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University//Center for Pain Research, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Anesthesiology, Guangdong Second People's Hospital, Guangzhou 510317, China)

Correspondence to: ZHOU Li-jun; E-mail: zhoulij3@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate whether there exists gender differences in mechanical pain hypersensitivity induced by the subcutaneous injection of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in normal mice and to explore the preliminary mechanism.【Methods】Thirty 10-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into three groups, ( $n = 10$

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 广东省自然科学基金(2021A1515011201, 2021A1515011742, 2020A1515010204); 广东省第二人民医院2019年医院引进人才科研启动基金(YY2019-003); 广州市科技技术局市校(院)联合资助项目(SL2023A03J00808)

作者简介: 彭湘格, 硕士生, 研究方向: 术后痛, E-mail: pengxg5@mail2.sysu.edu.cn; 周利君, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: zhoulij3@mail.sysu.edu.cn

mice/group, half male and half female). The albumin control group (BSA, 0.3  $\mu\text{g}$ ), low dose M-CSF group (L M-CSF, 0.075  $\mu\text{g}$ ) and high dose M-CSF group (H M-CSF, 0.3  $\mu\text{g}$ ) received 50  $\mu\text{L}$  BSA or M-CSF injected subcutaneously into the left medial thigh once daily for 3 consecutive days. Before and after drug administration, von-Frey mechanical sensitivity test was used to detect the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) in each group. Immunofluorescence was performed to examine the expression changes of Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) in skin, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and phosphorylated ERK1/2 (*p*-ERK) in L5-L6 DRG and lumbar spinal dorsal horn. **[Results]** In female mice, only high dose of M-CSF caused mechanical allodynia, whereas in male mice both doses produced marked allodynia. Mechanically, high-dose M-CSF induced massive aggregation of subcutaneous macrophages (marked by Iba1) in male and female mice, but more dramatic dependence in female mice. Similar gender differences were also found in the increase of *p*-ERK and CGRP expression in dorsal root ganglion (DRGs). Notably, CGRP expression was especially elevated in the fibers of DRG in male mice. Correspondingly, the expressions of *p*-ERK and CGRP<sup>+</sup> terminals in the superficial spinal dorsal horn of male mice were significantly higher than those of female mice after M-CSF treatment. **[Conclusion]** Subcutaneous injection of M-CSF triggers sexual dimorphism in mechanical pain hypersensitivity, which is related with differential changes in peripheral macrophage expansion and sensitization of the nociceptive pathway.

**Key words:** pain hypersensitivity; sexual dimorphism; macrophage; macrophage colony-stimulating factor; calcitonin gene-related peptide

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 395-402]

性别差异,即性别二态性(sexual dimorphism)最早在研究哺乳动物免疫系统时发现——雌性在病毒感染时产生的免疫反应往往高于雄性。疼痛的感知也存在不同程度的性别差异,如女性往往患慢性疼痛的概率更高。尽管慢性疼痛的性别二态性是一种公认的临床现象<sup>[1]</sup>,但机制的探讨却相对较晚。2011年Sorge发现雄性小鼠对鞘内注射Toll样受体4(TLR4)的配体内毒素脂多糖后痛反应迅速敏感,而雌性小鼠无反应<sup>[2]</sup>。随后不少研究证实痛超敏反应的性别二态性可能是由完全不同的通路以及不同的免疫细胞类型及免疫反应介导<sup>[3]</sup>。例如:脊髓小胶质细胞选择性地调节雄性小鼠的神经性疼痛<sup>[4]</sup>。巨噬细胞Toll样受体9(TLR9)增进化疗诱导的雄性小鼠神经性疼痛<sup>[5]</sup>。新近研究显示巨噬细胞通过IL-23/IL-17A通路在雌性机械性疼痛中起着重要的驱动作用<sup>[6-7]</sup>。这些研究表明疼痛性别二态性的机制非常复杂,但目前还知之甚少。鉴于巨噬细胞在疼痛的起病与发展中发挥着重要的作用<sup>[8-10]</sup>,探讨巨噬细胞在疼痛的性别二态性中的作用有重要的理论和临床意义。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF),又称CSF1,是刺激单核吞噬细胞(如单核细胞、巨噬细胞及破骨细胞等)存活、增殖和分化的关键生长因子<sup>[11]</sup>。研究发现神经损伤后,感觉神经元

新合成的M-CSF通过集落刺激因子受体1(colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R)触发脊髓驻留巨噬细胞(即小胶质细胞)<sup>[12]</sup>和背根神经节(dorsal Root Ganglion, DRG)驻留巨噬细胞<sup>[9]</sup>的激活和扩增,分别介导了神经性疼痛表型特征——机械超敏反应的起始和维持过程。我们也报道了感觉神经在致痛强度的电刺激下通过释放M-CSF调控小胶质细胞活化介导可塑性疼痛<sup>[13]</sup>。随后研究进一步揭示M-CSF调控脊髓小胶质细胞活性以及疼痛存在着明显的性别二态性:雄性啮齿动物依赖于脊髓M-CSF的增多<sup>[12, 14]</sup>;而雌性不依赖<sup>[15]</sup>。但目前尚无M-CSF调控巨噬细胞数量功能参与疼痛性别二态性的报道。据此,本研究将首先观察外周M-CSF增多对机械痛超敏的影响,再探查其是否存在性别二态性及其机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

SPF级雌、雄C57 BL/6J小鼠各15只,10周龄(18~20)g,购于中山大学实验动物中心(广州)生产许可证:SCXK(粤)2021-0029;使用许可证:SYXK(粤)2022-0081;医学实验伦理审批号:2021001979。小鼠置于SPF级动物实验室中饲养,

环境温度(20~26)°C,相对湿度为40%~70%,且所有笼具、饲料、饮水、垫料均严格消毒。动物使用协议和动物处理程序获得了中山大学实验动物管理与使用委员会(IACUC)的批准。

### 1.2 实验材料及主要试剂

牛血清白蛋白对照组(BSA, 0.3 μg)、重组小鼠M-CSF(#576406, Biolegend公司)。依照参考文献[16]中剂量,将BSA或M-CSF直接溶于生理盐水配置成2个浓度梯度(1.5 μg/mL或6 μg/mL)。

异氟烷(瑞沃德公司); von-Frey(Aesthesio, Danmic公司); Goat anti-Iba1(ab5076, abcam公司); Rabbit anti-p-ERK(ab5076, abcam公司); Rabbit anti-CGRP(14959, Cell Signaling公司); Donkey anti-Goat IgG Alexa Fluor 488(A21206, Life Technologies公司); Donkey anti-Rb IgG Alexa Fluor 647(A31573, Life Technologies公司); 倒置荧光显微镜(Nikon公司)。

### 1.3 实验分组及皮下给药

将30只10周龄C57 BL/6J小鼠随机分为三组(每组10只,雌雄各半):牛血清白蛋白对照组(BSA, 0.3 μg)、低剂量M-CSF组(L M-CSF, 0.075 μg)、高剂量M-CSF组(H M-CSF, 0.3 μg)。分别于左大腿内侧皮下注射50 μL BSA或M-CSF(单次给药量分别为0.075 μg/0.3 μg),每日1次,连续3次,第3次注射6 h后取材。

### 1.4 机械撤足阈值测试

给药前后采用von-Frey机械敏感性测试检测各组间机械撤足阈值(PWT)。每次测试前将小鼠提前30 min置于测试网架上以适应测试环境。使用一组不同厚度的短纤维型单丝(Aesthesia®), 0.07 g, 0.16 g, 0.4 g, 0.6 g, 1.0 g, 1.4 g和2.0 g)刺激小鼠的后爪中足底表面来评估机械痛觉过敏。测试过程中至少由2名实验员在不知道分组情况下盲测,将细丝垂直于后爪的足底表面,施加足够的压力使其弯曲。如果小鼠缩爪或舔舐后爪,则记为能够产生伤害性反应的刺激强度。

### 1.5 免疫荧光染色及统计

小鼠腹腔注射10%乌拉坦后,经左心室灌注40 mL 0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液快速冲净血液后再灌注40 mL 40 g/L多聚甲醛溶液进行前固定。将取下的腰段脊髓(L4-L6)后固定(3~4 h)再转至30%蔗糖溶液脱水沉底。再用冰冻切片机(Leica

公司)将皮肤、脊髓和DRG切成16 μm薄组织片。组织片先用驴血清常温封闭1 h后,加入一抗4°C孵育18 h左右;再用磷酸盐缓冲液清洗3次,每次20 min。之后加入对应的二抗常温孵育1 h,然后再次清洗3次后滴加抗荧光淬灭剂封片,拍摄。结果分析:使用ImageJ对免疫荧光实验的数据进行分析,其中分析荧光强度的操作步骤为:将图片导入ImageJ,格式调为8 bit(Image-Type-8 bit),调整Threshold使其强弱与原图信号一致(Image-Adjust-Threshold),用选框选出ROI,然后测出荧光强度值(Analyze-Measure-IntDen)。将不同处理组的IntDen录入Excel软件,将各组的IntDen分别除以对照组的进行均一化处理,然后使用Graphpad prism作图。

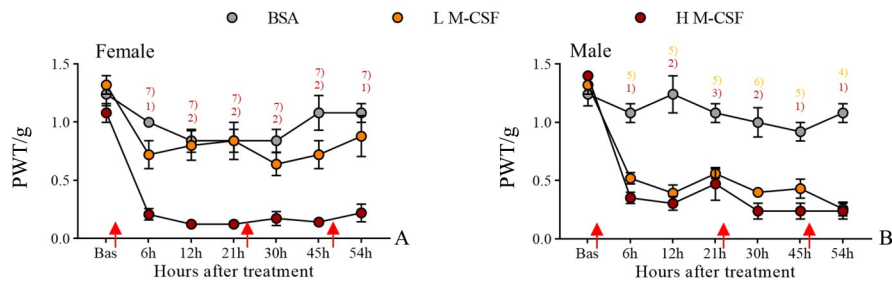
### 1.6 统计学方法

所有数据以均值±标准误(Mean ± SEM)表示,均为正态分布的计量结果。图1行为学结果的统计采用双因素方差分析(two-way ANOVA),事后Turkey检验对每个时间点各组进行两两比较。图2~4使用单因素方差分析(one-way ANOVA)处理实验数据,采用Tukey多重比较法进行两两比较。所有数据采用GraphPad Prism 8.0软件分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 皮下注射M-CSF诱发机械痛超敏的性别二态性

为检测皮下注射M-CSF是否会引起痛觉过敏反应,我们给10周龄正常雌雄小鼠左侧大腿内侧注射50 μL不同浓度的M-CSF溶液(1.5 μg/mL L M-CSF或6 μg/mL H M-CSF,每天1次,共3次),BSA溶液作为对照。雌性小鼠的机械痛行为学测试结果显示(图1A),与对照组相比,连续3次L M-CSF对PWT影响不明显,而H M-CSF明显降低PWT,提示高浓度M-CSF在雌性小鼠中引起显著机械痛敏反应。与雌性小鼠不同,低剂量与高剂量M-CSF在雄性小鼠中均引起显著机械痛超敏,且两浓度之间差异无统计学意义(图1B)。痛行为学结果表明,皮下注射高浓度M-CSF在雌雄小鼠中都能诱发机械痛敏,但低浓度只在雄性小鼠引起机械痛敏,提示皮下M-CSF异常升高诱发的痛反应存在性别差异。



A: Mechanical pain threshold (PWT) changes in female mice. B: PWT in male mice. Bas: the basal pain threshold measured before injection. BSA represents subcutaneous injection with Bull Serum Albumin (BSA, 0.3  $\mu$ g, 50  $\mu$ L); L M-CSF (0.075  $\mu$ g, 50  $\mu$ L) and H M-CSF (0.3  $\mu$ g, 50  $\mu$ L) were used to represent the low-concentration and high-concentration M-CSF injection groups. Red arrows represent the time points of injections (30 min before or 24 h, 48 h after treatment by injection). All data were shown by means  $\pm$  SEM, and were analyzed by two-way ANOVA followed by Turkey's test for each group. Female PWT:  $F = 148.5$ ,  $P < 0.0001$ ; Male PWT:  $F = 100.5$ ,  $P < 0.0001$ ;  $n = 5$  / group. 1)  $P < 0.001$  2)  $P < 0.01$  3)  $P < 0.05$  between H M-CSF and BSA, 4)  $P < 0.001$  5)  $P < 0.01$  6)  $P < 0.05$  between L M-CSF and BSA, 7)  $P < 0.05$  between L M-CSF and H M-CSF.

图1 皮下注射M-CSF诱发正常小鼠机械性疼痛具有性别差异

Fig. 1 Subcutaneous injection of M-CSF induced mechanical pain in naive mice with a gender difference

## 2.2 多次注射M-CSF诱导的皮下巨噬细胞扩增存在性别差异

鉴于M-CSF通过其受体CSF1R调控单核细胞和巨噬细胞的增殖分化,我们检测了注射局部巨噬细胞的变化来探讨M-CSF诱导痛敏的可能机制。已知离子钙结合衔接蛋白1(Ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba1)是一种特异性表达在巨噬细胞/小胶质细胞中的细胞骨架蛋白,并在这些细胞的激活过程中上调,常被作为巨噬细胞/小胶质细胞的细胞标记物。接下来,我们对注射局部的皮肤进行了Iba1的免疫荧光染色。如图2所示,在雌性小鼠中,与BSA对照组相比,低浓度M-CSF对Iba1免疫原性的相对累积光密度值(RelDen)无明显差异( $P > 0.05$ ),但高浓度M-CSF组中Iba1的RelDen显著增加,提示多次高浓度M-CSF注射引起皮下巨噬细胞剧烈增多( $P < 0.0001$ )。在雄性小鼠中,低浓度与高浓度M-CSF均能增加Iba1的表达( $P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$ ),且呈浓度依赖性。此外,与雄性组相比,高浓度M-CSF在雌性小鼠中引起的巨噬细胞增多更显著( $P < 0.01$ )。以上结果说明,多次注射M-CSF诱导皮下巨噬细胞增多,且在雌性小鼠中尤为明显。

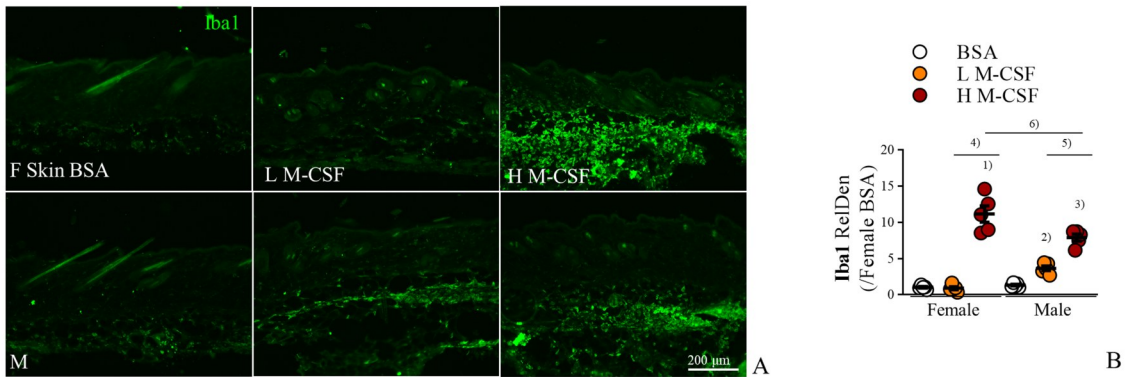
## 2.3 M-CSF诱导DRG内p-ERK和CGRP表达上调和神经元激活

为进一步阐明皮下注射M-CSF诱导疼痛二态性的机制,我们首先在DRG中观察神经元激活的标志物磷酸化细胞外信号调节酶(Phospho-extracellular regulated protein kinases, ERK)以及与痛

密切相关的降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)在痛觉传导通路的变化情况。结果如图3所示,在雌性小鼠中,皮下注射高浓度M-CSF导致DRG中p-ERK( $P < 0.01$ )和CGRP( $P < 0.01$ )阳性信号显著增高,但低浓度M-CSF处理组p-ERK或CGRP均没有显著改变。统计学分析显示雌性小鼠中H M-CSF与L M-CSF中存在统计学差异(p-ERK  $P < 0.01$ , CGRP  $P < 0.05$ )。而在雄性小鼠中,p-ERK和CGRP在低浓度、高浓度M-CSF处理后均增加( $P < 0.05$ ),但不存在浓度差异,而且整体表达强度低于雌性小鼠高浓度M-CSF处理组。此外,CGRP<sup>+</sup>纤维在M-CSF注射的雄性小鼠DRG中明显增多(图3B,白色箭头所示)。综上,皮下注射M-CSF诱导的DRG内p-ERK和CGRP表达增高,并与皮下巨噬细胞增多的性别二态性一致。

## 2.4 M-CSF诱导了脊髓背角浅层内p-ERK和CGRP表达上调

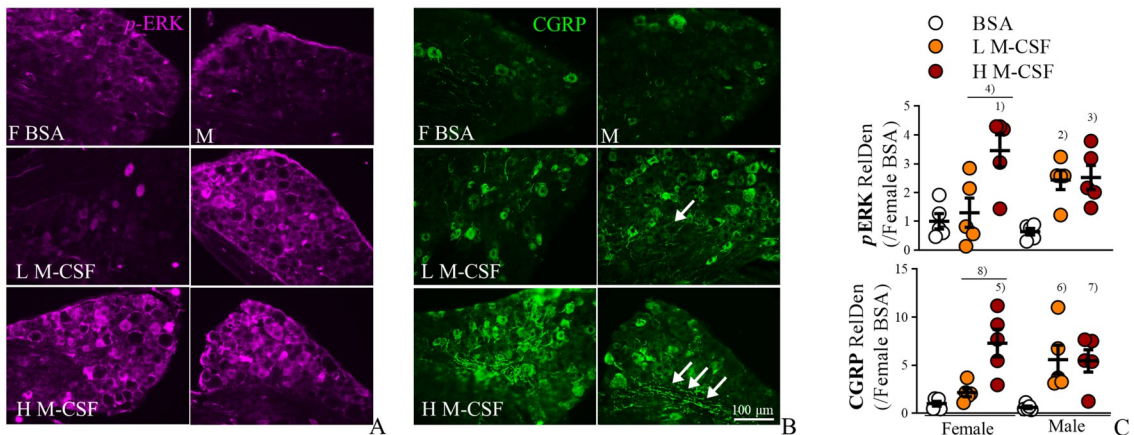
为进一步观察皮下注射M-CSF诱导的疼痛二态性是否存在中枢敏化的相关变化,我们又观察了脊髓背角中p-ERK与CGRP的表达变化情况(图4)。在雌性小鼠中高浓度M-CSF能引起CGRP<sup>+</sup>神经末梢( $P < 0.05$ )以及p-ERK( $P < 0.001$ )的表达上调,但低浓度M-CSF作用不明显。而在雄性小鼠中,高浓度低浓度M-CSF注射均能引起CGRP(高: $P < 0.0001$ ,低:CGRP  $P < 0.0001$ )和p-ERK(高: $P < 0.001$ ,低: $P < 0.05$ )表达增强,且均略高于雌性小鼠。在雌性和雄性小鼠中均观察到浓度差异。同时,雄性



A: Representative pictures showing M-CSF induced macrophages expansion in skin (Iba1 marker) in female (F) and male (M) mice, and had differences in concentration and gender. Samples were obtained from 6 h after the third treatment. B: Statistical analysis of relative integrated density (RelDen) of Iba1. All data were shown by means  $\pm$  SEM, and were analyzed by one-way ANOVA followed by Turkey's test for each group ( $F = 64.76$ ,  $P < 0.0001$ ).  $n = 3$  mice/group, 2 tissue slices/mouse. 1)  $P < 0.0001$  between Female H M-CSF and Female BSA, 2)  $P < 0.05$  between Male L M-CSF and Male BSA, 3)  $P < 0.0001$  between Male H M-CSF and Male BSA, 4)  $P < 0.0001$  between Female H M-CSF and Female L M-CSF, 5)  $P < 0.0001$  between male H M-CSF and female L M-CSF, 6)  $P < 0.001$  between Male H M-CSF and Male L M-CSF, 7)  $P < 0.01$  between Female H M-CSF and Male H M-CSF.

图2 M-CSF在雌雄小鼠中诱发不同程度的皮下巨噬细胞增多

Fig. 2 M-CSF induced different degrees of increase in subcutaneous macrophages in male and female mice



A-B: Representative pictures showing the expressions of *p*-ERK and CGRP in each group. White arrows indicate the CGRP<sup>+</sup> neurofilaments in each group. C: Statistical analysis of RelDen of *p*-ERK and CGRP. All data were shown by means  $\pm$  SEM, and were analyzed by one-way ANOVA followed by Turkey's test for each group (*p*-ERK:  $F = 7.45$ ,  $P < 0.001$ ; CGRP:  $F = 7.806$ ,  $P < 0.001$ ).  $n = 3$  mice/group, 2 tissue slices/mouse. 1)  $P < 0.01$  between Female H M-CSF and Female BSA, 2)  $P < 0.05$  between Male L M-CSF and Male BSA, 3)  $P < 0.05$  between Male H M-CSF and Male BSA, 4)  $P < 0.01$  between Female H M-CSF and Female L M-CSF, 5)  $P < 0.01$  between Female H M-CSF and Female BSA, 6)  $P < 0.05$  between Male L M-CSF and Male BSA, 7)  $P < 0.05$  between Male H M-CSF and Male BSA, 8)  $P < 0.05$  between Female H M-CSF and Female L M-CSF.

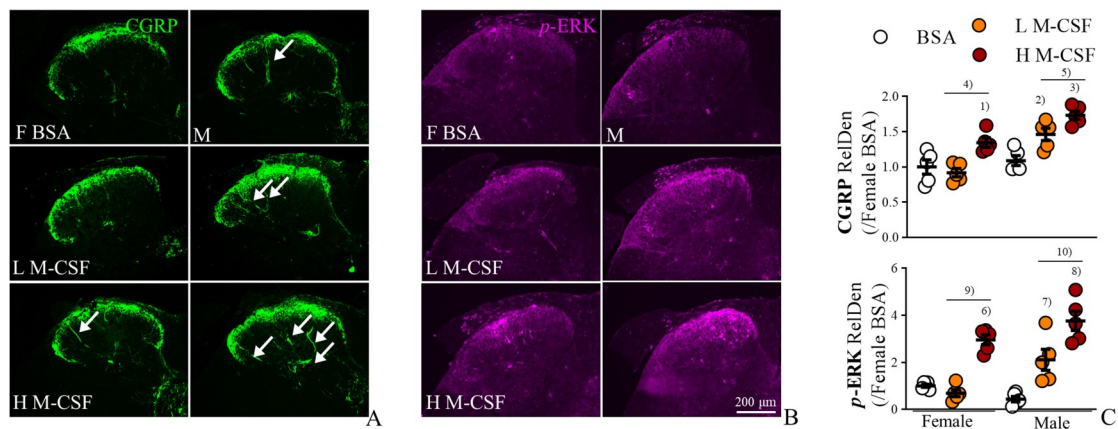
图3 M-CSF差异性上调DRG中*p*-ERK和CGRP表达

Fig. 3 M-CSF differentially up-regulated the expressions of *p*-ERK and CGRP in L5-6 DRGs

小鼠在M-CSF注射后CGRP阳性末梢显著增多(图4A,白色箭头所示)。以上结果显示,与雌性小鼠相比,M-CSF明显增加*p*-ERK和CGRP在雄性小鼠脊髓浅层背角中的表达,提示M-CSF对雄性小鼠痛反应的影响以神经通路致敏为优势。

### 3 讨论

本研究主要发现,正常小鼠皮下注射外源性M-CSF诱发的痛觉超敏存在性别差异。在雌性小鼠中,只有高剂量M-CSF诱导机械痛;而在雄性小



A-B: Representative pictures showing the expression of CGRP and *p*-ERK in the spinal dorsal horn of each group. White arrows indicate the CGRP+ neurofilaments in each group. C: Statistical analysis of RelDen of *p*-ERK and CGRP. All data were shown by means  $\pm$  SEM, and were analyzed by one-way ANOVA followed by Turkey's test for each group (CGRP:  $F = 17.18, P < 0.0001$ ; *p*-ERK:  $F = 23.54, P < 0.0001$ ).  $n = 3$  mice/group, 2 tissue slices/mouse. 1)  $P < 0.05$  between Female H M-CSF and Female BSA group, 2)  $P < 0.05$  between Male L M-CSF and Male BSA, 3)  $P < 0.0001$  between Male H M-CSF and Male BSA, 4)  $P < 0.01$  between Female H M-CSF and Female L M-CSF, 5)  $P < 0.05$  between Male H M-CSF and Male L M-CSF, 6)  $P < 0.001$  between Female H M-CSF and Female BSA, 7)  $P < 0.01$  between Male L M-CSF and Male BSA, 8)  $P < 0.0001$  between Male H M-CSF and Male BSA, 9)  $P < 0.0001$  between Female H M-CSF and Female L M-CSF, 10)  $P < 0.01$  between Male H M-CSF and Male L M-CSF.

图4 M-CSF增加脊髓背角浅层CGRP和*p*-ERK的表达上调

Fig. 4 M-CSF enhanced the expressions of CGRP and *p*-ERK in the superficial dorsal horn of the spinal cord

鼠中低浓度M-CSF就可明显诱导痛敏,且与高剂量无明显差异。免疫荧光染色实验显示M-CSF引起雌性小鼠皮下巨噬细胞扩增更明显,而对雄性小鼠脊髓背角伤害感觉性传导通路的致敏作用更显著。

早期不少研究报道了M-CSF的异常表达与疼痛关联<sup>[17-18]</sup>。直到2016年,Guan等发现在雄性小鼠部分神经损伤(SNI)的神经病理性疼痛模型中,大量M-CSF在损伤DRG感觉神经元新合成并在脊髓中枢释放;抑制M-CSF可预防神经损伤诱导的超敏反应,而正常小鼠鞘内注射M-CSF(30 ng)引起机械痛敏<sup>[12]</sup>。该研究首次揭示M-CSF经CSF1R诱导脊髓小胶质细胞激活促进神经性疼痛的发展。我们也发现,感觉神经异常兴奋后M-CSF表达与释放增加,通过激活脊髓小胶质细胞引起脊髓C纤维突触可塑性长时程增强(LTP),进而导致中枢敏化产生慢性疼痛<sup>[13]</sup>。这些基于雄性动物的研究证实了M-CSF通过激活小胶质细胞的中枢作用介导慢性疼痛的产生。M-CSF也是调控巨噬细胞数量功能的关键分子,但目前尚无其调控巨噬细胞参与疼痛的报道。据此,本研究通过皮下直接注射外源性M-CSF来探讨这个问题。行为学结果显示,比鞘内注射高10倍的M-CSF(300 ng)皮下注射在雌

性和雄性中都能引起的明显的机械痛敏(图1)。这一结果也被随后的免疫荧光结果证实:皮下注射局部有大量巨噬细胞聚集(图2),DRG(图3)与脊髓背角浅层(图4)中与疼痛相关信号*p*-ERK和CGRP<sup>[19]</sup>都有不同程度的增加。我们的结果显示,外周局部M-CSF病理性增加会诱导机械痛敏,拓展了M-CSF病理性升高的临床意义及与炎性疼痛的关联。

研究揭示中枢M-CSF调控小胶质细胞参与疼痛过程存在性别差异。鞘内注射M-CSF仅在正常雄性大鼠和小鼠诱导机械痛觉超敏和小胶质细胞激活<sup>[12,14]</sup>,但对雌性小鼠无效<sup>[15]</sup>。其次,转录扩增和形态学分析显示,雄性小胶质细胞有很强的免疫激活,而雌性小胶质细胞没有<sup>[15]</sup>。此外,感觉神经元中M-CSF被特异性敲除的雄性Adv-M-CSF小鼠在周围神经损伤后不引起病理性疼痛,但雌性Adv-M-CSF小鼠仍可诱导鼠机械痛觉超敏反应<sup>[15]</sup>。随后又发现,鞘内注射M-CSF还诱导脊髓脑膜内淋巴细胞显著扩增,其中雌性小鼠中调节性T细胞(Tregs)优先扩增。最后,Treg缺陷(Foxp3 DTR)雌性小鼠表现出与雄性小鼠相当的M-CSF诱导的小胶质细胞激活和疼痛超敏反应<sup>[15]</sup>。综上所述,M-CSF在脊髓层面对疼痛以及小胶质细胞

的影响存在性别二态性:雄性啮齿动物的超敏反应依赖于脊髓M-CSF的增多;而雌性小鼠不依赖。这可能与M-CSF引起Treg细胞增多进而抑制小胶质细胞激活和疼痛超敏反应有关。

M-CSF外周致痛作用是否也存在性别差异呢?本研究通过皮下局部注射外源性M-CSF的方法对外周M-CSF在疼痛性别二态性方面的病理意义进行了探索。我们发现,皮下注射高浓度M-CSF致痛行为学无性别差异,但低浓度M-CSF却与鞘内注射相似,存在性别二态性:低浓度只在雄性小鼠有作用(图1)。这提示外周M-CSF异常升高引起的疼痛存在与中枢一致的性别差异。

机制上,我们发现雌性小鼠皮下注射低浓度M-CSF在外周和中枢均未表现出明显变化(图3-4),提示雌性小鼠似乎存在一个M-CSF耐受阈值。而高浓度M-CSF使皮下大量巨噬细胞聚集并活化(图2),而且DRG  $p$ -ERK和CGRP等外周敏化变化显著。之前的研究<sup>[20]</sup>显示“病变微环境中雌激素水平的升高介导巨噬细胞与神经纤维之间的相互作用进而介导子宫内膜异位症患者伴有持续的盆腔疼痛”,提示M-CSF诱导的雌性小鼠疼痛高度依赖于局部巨噬细胞的活化,进而与神经系统相互作用。低浓度M-CSF不足以激活巨噬细胞,从而无法诱导疼痛。在外周M-CSF处理的雄性小鼠中,我们发现脊髓背角CGRP<sup>+</sup>神经终末和 $p$ -ERK表达增多明显,DRG中也存在较强的CGRP和 $p$ -ERK信号表达(图3-4)。同时,多项研究证实“雄性啮齿动物的超敏反应依赖于脊髓M-CSF增多”<sup>[12, 14-15]</sup>,提示M-CSF可直接作用于中枢神经致敏,M-CSF对雄性小鼠疼痛的影响可能与中枢敏化有关,但具体机制有待进一步研究。体外实验发现M-CSF和

雌二醇共孵育可刺激巨噬细胞释放脑源性神经营养因子(BDNF)和神经营养因子-3(NT-3)进而引起感觉神经轴突异常生长<sup>[20]</sup>。而我们之前的研究显示M-CSF在脊髓中枢激活小胶质细胞释放BDNF也能促进CGRP中枢神经末梢的异常生长<sup>[13]</sup>。这都一定程度阐明了外周与中枢M-CSF产生不同效应的原因。综上所述,我们认为在M-CSF在外周与中枢可通过作用于不同的效应细胞进而产生部位差异性的疼痛性别二态性:外周M-CSF以扩增激活巨噬细胞引起免疫系统和神经系统的相互作用为主,而中枢M-CSF在雄性动物中则通过小胶质细胞增殖激活诱导明显的中枢敏化为主。

此外,皮下注射M-CSF驱动与雄性小鼠鞘内注射一样的中枢敏化变化的机制并不清楚。另外,同在C57 BL/6J小鼠中,M-CSF皮下注射诱发机械痛敏的量(75 ng、300 ng)比鞘内注射量(30 ng)要高很多,这可能与中枢对M-CSF易感以及外周M-CSF直接和间接影响痛觉神经传导通路的机制相对较慢有关。这些都有待下一步证实。

综上,本研究报道了小鼠皮下注射M-CSF引起机械超敏存在性别二态性的新发现,并初步从机制上揭示M-CSF在雌性小鼠中以驱动局部巨噬细胞增多为主,而在雄性小鼠中以增加感觉神经元CGRP中枢运输进而影响脊髓背角浅层神经元的兴奋性为主。这些发现揭示了外周M-CSF升高介导机械痛敏的性别二态性表型,为疼痛的性别差异多层次机制提供了新的见解,也为慢性疼痛的局部病变提供了M-CSF的防治靶点。

#### 参考文献

- [1] Gregus AM, Levine IS, Eddinger KA, et al. Sex differences in neuroimmune and glial mechanisms of pain [J]. *Pain*, 2021, 162(8): 2186-2200.
- [2] Sorge RE, Lacroix-Fralish ML, Tuttle AH, et al. Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(43): 15450-15454.
- [3] Mogil JS. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(7): 353-365.
- [4] Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(8): 1081-1083.
- [5] Luo X, Huh Y, Bang S, et al. Macrophage toll-like receptor 9 contributes to chemotherapy-induced neuro-

- pathic pain in male mice [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(35): 6848–6864.
- [6] Ji J, He Q, Luo X, et al. IL-23 enhances C-fiber-mediated and blue light-induced spontaneous pain in female mice[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 787565.
- [7] Luo X, Ouyang C, Wang Z, et al. IL-23/IL-17A/TRPV1 axis produces mechanical pain via macrophage-sensory neuron crosstalk in female mice [J]. *Neuron*, 2021, 109(17): 2691–2706. e5.
- [8] Silva NR, Gomes FIF, Lopes AHP, et al. The cannabidiol analog PECS-101 prevents chemotherapy-induced neuropathic pain via PPAR $\gamma$  receptors [J]. *Neurotherapeutics*, 2022, 19(1): 434–449.
- [9] Yu X, Liu H, Hamel KA, et al. Dorsal root ganglion macrophages contribute to both the initiation and persistence of neuropathic pain [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 264.
- [10] Song Y, Li X, Huang D, et al. Macrophages in peripical lesions: potential roles and future directions [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 949102.
- [11] Stanley ER, Cifone M, Heard PM, et al. Factors regulating macrophage production and growth: identity of colony-stimulating factor and macrophage growth factor [J]. *J Exp Med*, 1976, 143(3): 631–647.
- [12] Guan Z, Kuhn JA, Wang X, et al. Injured sensory neuron-derived CSF $_1$  induces microglial proliferation and DAP12-dependent pain [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(1): 94–101.
- [13] Zhou LJ, Peng J, Xu YN, et al. Microglia are indispensable for synaptic plasticity in the spinal dorsal horn and chronic pain [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(13): 3844–3859. e6.
- [14] Okubo M, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Macrophage-colony stimulating factor derived from injured primary afferent induces proliferation of spinal microglia and neuropathic pain in rats [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153375.
- [15] Kuhn JA, Vainchtein ID, Braz J, et al. Regulatory T-cells inhibit microglia-induced pain hypersensitivity in female mice [J]. *Elife*, 2021, 10: e69056.
- [16] Alfituri OA, Mararo EM, Stekete PC, et al. Dermal bacterial LPS-stimulation reduces susceptibility to intradermal trypanosoma brucei infection [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 9856.
- [17] Jacobsen DP, Moen A, Haugen F, et al. Hyperexcitability in spinal WDR neurons following experimental disc herniation is associated with upregulation of fractalkine and its receptor in nucleus pulposus and the dorsal root ganglion [J]. *Int J Inflam*, 2016: 6519408.
- [18] Egeland NG, Moen N A, Pedersen LM, et al. Spinal nociceptive hyperexcitability induced by experimental disc herniation is associated with enhanced local expression of Csf1 and FasL [J]. *Pain*, 2013, 154(9): 1743–1748.
- [19] 唐源, 金冬梅, 揭英桃, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯缓解高频刺激诱导的雌性小鼠慢性原发性疼痛 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(2): 221–228.
- Tang Y, Jin DM, Jie YT, et al. Intrathecal injection of (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) alleviates chronic primary pain induced by high-frequency stimulation in female mice [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(2): 221–228.
- [20] Greaves E, Temp J, Esnal-Zufiurre A, et al. Estradiol is a critical mediator of macrophage-nerve cross talk in peritoneal endometriosis [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(8): 2286–2297.

(编辑 孙慧兰)