

• 基础研究 •

## 下调 Dixdc1 表达抑制创伤性脑损伤后星形胶质细胞极化

汤莉巧<sup>1,2</sup>, 段程伟<sup>3</sup>, 陈伟观<sup>2,4</sup>, 郭宇<sup>1,2</sup>, 孙王妍<sup>1,2</sup>, 宰添羽<sup>1,2</sup>, 刘梦琦<sup>1,2</sup>, 张冬梅<sup>3</sup>, 卢红建<sup>2,4\*</sup><sup>1</sup>南通大学护理与康复学院, 江苏 南通 226001; <sup>2</sup>南通市第一人民医院康复医学科, <sup>3</sup>临床医学研究中心, 江苏 南通 226001; <sup>4</sup>南通大学第二附属医院康复医学科, 江苏 南通 226001

**[摘要]** 目的: 探讨含DIX域蛋白1(DIX domain containing 1, Dixdc1)蛋白对小鼠创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)后星形胶质细胞增殖迁移和极化的影响。方法: 使用受控皮质撞击装置(controlled cortical impact, CCI)构建小鼠TBI模型。Western blot检测损伤前后Dixdc1、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、神经毒性星形胶质细胞标志物补体3(complement 3, C3)、神经保护性星形胶质细胞标志物S100钙结合蛋白A10(S100 calcium binding protein A10, S100A10)蛋白的表达; 免疫组织化学染色观察Dixdc1和GFAP的表达及分布; 免疫荧光染色观察Dixdc1与GFAP的共定位情况。使用短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)敲低小鼠星形胶质细胞C8-D1A中的Dixdc1水平, 然后使用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激模拟体外星形胶质细胞的活化状态; Western blot检测Dixdc1、GFAP、C3、S100A10以及细胞增殖迁移相关蛋白的表达; 流式细胞术分析细胞周期, 并行Western blot检测S期相关蛋白的表达; RT-PCR检测星形胶质细胞极化相关标志物的表达; 细胞免疫荧光检测C3和S100A10的荧光强度变化; Western blot检测信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的磷酸化水平。结果: 与Sham组相比, TBI组小鼠大脑皮质中Dixdc1和GFAP蛋白表达水平增加; Dixdc1在损伤周围皮质的星形胶质细胞中表达。LPS刺激C8-D1A细胞后Dixdc1和GFAP蛋白表达水平上调。细胞划痕和EdU实验显示, 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的星形胶质细胞增殖迁移, 下调相关蛋白的表达; 减少了细胞周期中S期的比例, 下调CyclinA、CDK2的蛋白水平。C3蛋白在损伤前期表达水平增加, 后期减少, 而S100A10蛋白在损伤前期表达水平减少, 后期增加。Dixdc1敲低可能通过降低STAT3磷酸化水平进而抑制LPS诱导的A1型星形胶质细胞极化, 下调C3蛋白表达, 上调S100A10蛋白表达。结论: TBI后星形胶质细胞内Dixdc1蛋白表达增加。抑制Dixdc1蛋白表达显著抑制LPS刺激诱导的A1型星形胶质细胞的增殖、迁移、细胞周期激活以及STAT3磷酸化。

**[关键词]** 创伤性脑损伤; 星形胶质细胞; 增殖; 迁移; 极化; Dixdc1**[中图分类号]** R651.15**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2026)02-202-11**doi:** 10.7655/NYDXBNSN250503

## Downregulation of Dixdc1 expression suppresses astrocyte polarization following traumatic brain injury

TANG Liqiao<sup>1,2</sup>, DUAN Chengwei<sup>3</sup>, CHEN Weiguan<sup>2,4</sup>, GUO Yu<sup>1,2</sup>, SUN Wangyan<sup>1,2</sup>, ZAI Tianyu<sup>1,2</sup>, LIU Mengqi<sup>1,2</sup>, ZHANG Dongmei<sup>3</sup>, LU Hongjian<sup>2,4\*</sup><sup>1</sup>School of Nursing and Rehabilitation, Nantong University, Nantong 226001; <sup>2</sup>Department of Rehabilitation Medicine, <sup>3</sup>Medical Research Center, Nantong First People's Hospital, Nantong 226001; <sup>4</sup>Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of DIX domain-containing protein 1 (Dixdc1) on the proliferation, migration, and polarization of astrocytes following traumatic brain injury (TBI) in mice. **Methods:** A mouse TBI model was established using the controlled cortical impact (CCI) device. Western blot was used to examine the expression of Dixdc1, glial fibrillary acidic protein (GFAP), the neurotoxic astrocyte marker complement 3 (C3), and the neuroprotective astrocyte marker S100 calcium-binding protein A10 (S100A10) before and after injury. Immunohistochemical staining was performed to observe the expression and distribution of Dixdc1 and GFAP, and immunofluorescence staining was used to observe the colocalization of Dixdc1 with GFAP. Short hairpin RNA

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2022YFC2405605); 国家自然科学基金(32101027); 江苏省自然科学基金(BK20221274); 南通市科技计划项目(JC2023114); 江苏省医学重点学科(实验室)建设单位(JSDW202249)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: Dr\_lhj2021@126.com (ORCID: 0009-0002-7377-8879)

(shRNA) was used to knock down Dixdc1 levels in mouse astrocytes C8-D1A. Lipopolysaccharide (LPS) stimulation was then applied to mimic the activated state of astrocytes *in vitro*. Western blot was performed to detect expression changes of Dixdc1, GFAP, C3, S100A10, as well as cell proliferation and migration-related proteins. Flow cytometry was performed to analyze the cell cycle, accompanied by Western blot detection of S-phase-related proteins. RT-PCR was used to detect the expression of astrocyte polarization markers. Cellular immunofluorescence was employed to detect the fluorescence intensity of C3 and S100A10. Additionally, Western blot was performed to assess the phosphorylation levels of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Results:** Compared with the Sham group, the protein expression levels of Dixdc1 and GFAP were upregulated in the cerebral cortex of TBI mice. Dixdc1 was expressed in astrocytes within the peri-lesional cortical regions. Following LPS stimulation, the protein expression levels of both Dixdc1 and GFAP were upregulated in C8-D1A cells. Scratch assay and EdU assay demonstrated that knockdown of Dixdc1 suppressed LPS-induced astrocyte proliferation and migration, downregulated the expression of associated proteins, reduced the proportion of cells in the S phase of the cell cycle, and decreased CyclinA and CDK2 protein levels. C3 showed elevated expression levels during the acute phase but declined thereafter, whereas S100A10 demonstrated an inverse temporal pattern. Dixdc1 knockdown may inhibit LPS-induced A1-type astrocyte polarization by reducing STAT3 phosphorylation levels, which concurrently downregulated C3 protein expression and upregulated S100A10 protein expression. **Conclusion:** Following TBI, Dixdc1 protein expression was upregulated in astrocytes. Knockdown of Dixdc1 significantly suppressed LPS-induced proliferation, migration, cell cycle and STAT3 phosphorylation of A1-type astrocytes.

[Key words] traumatic brain injury; astrocytes; proliferation; migration; polarization; Dixdc1

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(02): 202-212]

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是由外部机械力导致颅脑区域的结构和功能完整性受损, 是世界上发病率最高的神经系统疾病之一<sup>[1]</sup>, 常造成意识障碍、记忆缺失及神经功能障碍<sup>[2]</sup>, 具有较高的致残率和致死率, 导致严重的健康问题和社会经济负担<sup>[1]</sup>。TBI 的病理过程包括原发性损伤导致的即时神经功能破坏, 和由长期炎症级联反应导致的继发性损伤<sup>[3]</sup>。

神经炎症是 TBI 最主要的病理表现之一, 抑制或减缓 TBI 后的神经炎症对改善 TBI 患者预后具有重要意义<sup>[4]</sup>。神经炎症可刺激神经胶质细胞 (主要是小胶质细胞和星形胶质细胞) 活化和炎症因子释放<sup>[5-6]</sup>。星形胶质细胞在中枢神经系统中具有绝对的数量优势, 几乎行使所有胶质细胞的功能, 包括形成和维持血脑屏障 (blood brain barrier, BBB), 分泌神经营养因子促进神经元突触形成等<sup>[7-8]</sup>。脑损伤后, 星形胶质细胞转变为反应性星形胶质细胞, 表现为胞体肥大、增殖加剧、炎症介质和神经营养因子的分泌增加<sup>[9]</sup>。Lid-delow 等<sup>[10]</sup>发现了星形胶质细胞亚型的存在, 证实了脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导小胶质细胞分泌白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\alpha$ 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  等, 进而诱导生成神经毒性 A1 型星形胶质细胞, 促进炎症和损害神经细胞; 缺血诱导生成神经保护性 A2 型星形胶质细胞, 促进神经营养因子表达、神经元存活和生长、细胞增殖。

DIX 域蛋白 1 (DIX domain containing 1, Dixdc1) 是

斑马鱼 Ccd1 在人体内的同源蛋白, 具有 Dishevelled-Axin (DIX) 和 coiled-coil (MTH) 两种结构域的蛋白, 是 Wnt 信号通路的正调节因子<sup>[11]</sup>。目前关于 Dixdc1 的研究主要集中在肿瘤方面, 但越来越多的研究表明, Dixdc1 在调节神经发育和神经损伤中发挥重要作用。如 Dixdc1 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号调节突触密度, 从而影响精神易感性<sup>[12]</sup>; Dixdc1 通过调节  $\beta$ -catenin 磷酸化影响神经系统发育, 促进神经细胞增殖迁移<sup>[13]</sup>; Dixdc1 参与星形胶质细胞的细胞周期, 促进其增殖<sup>[14]</sup>。但 Dixdc1 在星形胶质细胞极化中的分子机制尚不清楚。本研究拟开展相关实验, 研究 TBI 后星形胶质细胞中 Dixdc1 的表达变化及其对星形胶质细胞增殖、迁移和极化的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性 C57BL/6 小鼠 (60 只, 6~8 周龄) 由南通大学动物实验中心提供。所有动物实验均按照动物伦理委员会批准的方案进行 (伦理编号: S20220302-005)。小鼠星形胶质细胞 C8-D1A 购自上海中乔新舟公司。小鼠原代星形胶质细胞 (KGG5468-1) 购自南京凯基生物技术股份有限公司。

补体 3 (complement 3, C3)、S100 钙结合蛋白 A10 (S100 calcium binding protein A10, S100A10)、E-钙黏蛋白 (E-Cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-Cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、细胞周期蛋白依赖性

激酶2(cyclin-dependent kinase 2, CDK2)、信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)抗体(Proteintech公司,美国); Dixdc1抗体(Santa Cruz公司,美国);胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、p-STAT3抗体(Cell Signaling Technology公司,美国); Cyclin A抗体(Abcam公司,英国); DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(上海 LONSERA公司); DMEM/F12培养基、胎牛血清、脂多糖、TRIzol(Sigma公司,美国);质粒抽提试剂(Omega BioTek, 美国);逆转录试剂(Takara Bio公司,日本);DAB检测试剂(上海 Genetech公司);PI/RNase 染色缓冲液(BD Biosciences公司,美国);SYBR Green qPCR Mix (2×)、EdU-555细胞增殖检测试剂盒、青霉素-链霉素(上海碧云天生物技术公司);4%多聚甲醛(合肥 Biosharp公司);PVDF膜(Millipore公司,美国)。Dixdc1敲低慢病毒载体的构建与包装由青岛蔚蓝生物科技股份有限公司完成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 构建小鼠 TBI 模型

使用受控皮质撞击装置(controlled cortical impact, CCI)诱导 TBI 模型<sup>[15]</sup>。分离肌肉及骨膜暴露颅骨后,于冠状缝和人字缝之间,中线旁 2 mm 处进行开窗(直径约 4 mm),移除骨瓣暴露脑组织,连接冲击装置,并设置参数(活塞速度 4.0 m/s,变形深度为 2.0 mm,停留时间 200 ms),使撞击杆尖端垂直于硬脑膜,给予小鼠 1 次中重度皮质撞击。除不进行 CCI 损伤外,假手术组小鼠接受相同的手术。

### 1.2.2 细胞培养与刺激

小鼠 C8-D1A 细胞用完全培养基(DMEM 基础培养基、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素),小鼠原代星形胶质细胞用完全培养基(DMEM/F12、10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素),37 °C 水浴复苏后接种于细胞培养皿中,置于 37 °C 恒温培养箱(含 5% CO<sub>2</sub>)。当细胞生长到合适密度时,分别用 1 μg/mL LPS 刺激 C8-D1A 细胞<sup>[16]</sup>、100 ng/mL LPS 刺激小鼠原代星形胶质细胞<sup>[17]</sup>。

### 1.2.3 星形胶质细胞慢病毒感染实验

星形胶质细胞以适量密度接种到培养皿中后,将慢病毒悬液 40 μL 加入到 2 mL 细胞培养基中,混匀并加入细胞后放回恒温培养箱中孵育。24 h 后更换新鲜的完全培养液继续培养。72 h 后荧光显微镜观察病毒感染效率,加入适当浓度嘌呤霉素筛选稳定转染

的细胞。

### 1.2.4 HE 染色

4%多聚甲醛灌注固定小鼠大脑,经蔗糖梯度脱水后进行 OCT 包埋并沿冠状面将脑组织切成 10 μm 的切片,贴于载玻片上。依次经过以下染料完成 HE 染色:苏木素染液 10 min,自来水冲洗,分化液分化 30 s,伊红染液 1 min,依次浸入 70%、80%、90%、100%乙醇进行脱水,二甲苯透明并用中性树胶封片后显微镜下观察。

### 1.2.5 免疫组织化学染色

根据 DAB 检测试剂说明书对脑组织切片进行免疫组织化学染色。冰冻切片 37 °C 烘箱中烘烤 1 h, PBS 洗涤后用内源性过氧化物酶阻断剂在室温下孵育 2 h,然后用 Dixdc1 抗体(1:50)和 GFAP 抗体(1:200)4 °C 孵育过夜。次日切片经 PBS 洗涤后用二抗室温孵育 2 h, DAB 显色,脱水后中性树脂封片,显微镜下观察并拍摄。

### 1.2.6 组织免疫荧光染色

冰冻切片使用 PBS 漂洗后,封闭液(PBS+10% FBS+0.3% TritonX-100)室温下封闭 2 h,接着用一抗稀释液(PBS+1% FBS+0.3% TritonX-100)稀释抗体, Dixdc1 抗体(1:50)和 GFAP 抗体(1:200)于 4 °C 孵育 16 h, PBS 漂洗后加入相应的荧光二抗,室温孵育 2 h, PBS 漂洗后 Hoechst 染色 10 min。用封片剂封固后显微镜下观察。

### 1.2.7 细胞免疫荧光染色

细胞以适量密度铺在 24 孔板上,在不同实验处理后弃去培养基, PBS 洗涤后用甲醇 4 °C 固定 15 min。封闭液室温封闭 2 h 后,用一抗稀释液稀释抗体,加 C3 抗体(1:50)和 S100A10 抗体(1:50)于 4 °C 孵育 16 h, PBS 洗涤后加入相应的荧光二抗,室温孵育 2 h, PBS 洗涤后 Hoechst 染色 10 min。用封片剂封固后显微镜下观察。

### 1.2.8 Western blot 检测

使用 RIPA 裂解液充分裂解组织、细胞后,4 °C 高速离心 20 min 后留取上清于 EP 管中。BCA 蛋白检测试剂测量蛋白样品浓度。7.5%或 12.5% SDS-PAGE 分离蛋白样品(每孔 20 μg 蛋白),并转移到 PVDF 膜上。5%脱脂牛奶常温下封闭 2 h。TBST 洗涤后一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后加入相应二抗,室温孵育 2 h。将处理后的 PVDF 膜置于化学发光成像系统中采集特异性信号。

### 1.2.9 Real-time PCR 实验

使用 TRIzol 试剂提取细胞中的总 RNA,并使用

逆转录试剂将RNA逆转录成cDNA。实时荧光定量PCR仪扩增目的基因,以 $\beta$ -Actin为内参。将得到的Ct值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。引物由南京擎科生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

表1 Real-time PCR引物序列

Table 1 Primer sequences used in real-time PCR

Gene	Primer sequence(5'→3')
Serping1	Forward: AACTTGGACCAGGACGCAG
	Reverse: GAGAAAGGCTCTATCCCCAGC
H2.D1	Forward: AAGACCTGAAAACGTGGACGG
	Reverse: TAATGCTCTGCAGCACCACTCT
Gbp2	Forward: AGCTGCACTATGTGACGGAG
	Reverse: AGCCCAAAAAGTTAGCGGAA
Srgn	Forward: TGTTTCAGGAACCCAACTCGC
	Reverse: GTCACATAGCCACGGTAGGAG
S100A10	Forward: TCTTCGGCACTAGCCTCATC
	Reverse: AAGAGTCTGTGCGAAACCTGGG
Clcf1	Forward: CCTCCGAGCAGGGGACT
	Reverse: TGTGCGATTAAGAGCTGGCA
Emp1	Forward: CCCTCACTGTGGTTGCAAATC
	Reverse: GAGAATTCTGGAGTATCCAGTGAGA
$\beta$ -Actin	Forward: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA
	Reverse: TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCC

### 1.2.10 细胞划痕实验

采用细胞划痕实验检测细胞迁移能力。将细胞接种于6孔板中,待细胞完全贴壁后,用10  $\mu$ L枪头在6孔板内画3条竖线,用PBS洗去划痕处多余的细胞,显微镜下观察拍摄,无血清细胞培养基继续培养24 h后,采集细胞迁移的图片。

### 1.2.11 EdU细胞增殖检测

使用EdU细胞增殖试剂盒检测细胞增殖。将细胞接种于6孔板中,细胞经过实验处理后,将细胞与含10  $\mu$ mol/L EdU的培养基一起孵育2 h后,用Azide 555溶液(红色)和Hoechst(蓝色)对细胞进行染色。在荧光显微镜下观察。

### 1.2.12 细胞周期检测

细胞消化后收集于15 mL离心管中,离心弃上清后用PBS清洗细胞沉淀,再次离心弃上清液后用75%乙醇固定细胞过夜。固定结束后,离心弃上清液并用PBS清洗残余的乙醇。在细胞沉淀中加入500  $\mu$ L PI染色液重悬,室温避光孵育15 min后使用流式细胞分析仪分析。

### 1.3 统计学方法

所有量化数据均通过GraphPad Prism进行统计分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组

间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Dixdc1蛋白在TBI后皮质中表达上调

首先对小鼠TBI后不同时间的脑组织切片进行HE染色,结果显示小鼠大脑右半球损伤,并随着损伤时间的延长,损伤部位的脑组织结构缺失,血肿逐渐被吸收,神经细胞水肿坏死并伴有炎症细胞浸润(图1A)。先前研究表明Dixdc1能够促进TBI后星形胶质细胞增殖<sup>[14]</sup>。据此,通过Western blot检测TBI后Dixdc1蛋白的表达,结果显示与Sham组相比,损伤后Dixdc1的蛋白表达增加,且于损伤3 h后达峰值(图1B、C);GFAP的蛋白表达在损伤后1、3 d明显增加(图1B、D)。对Sham组及TBI 3 h组小鼠的脑组织切片进行免疫组织化学染色,与Sham组相比,Dixdc1在损伤周围脑皮质区域的阳性信号增加(图1E、F),损伤周围脑皮质区星形胶质细胞存在明显活化(图1G、H)。提示Dixdc1在小鼠脑损伤皮质中的表达增加且星形胶质细胞明显活化。

### 2.2 Dixdc1蛋白与星形胶质细胞存在共定位

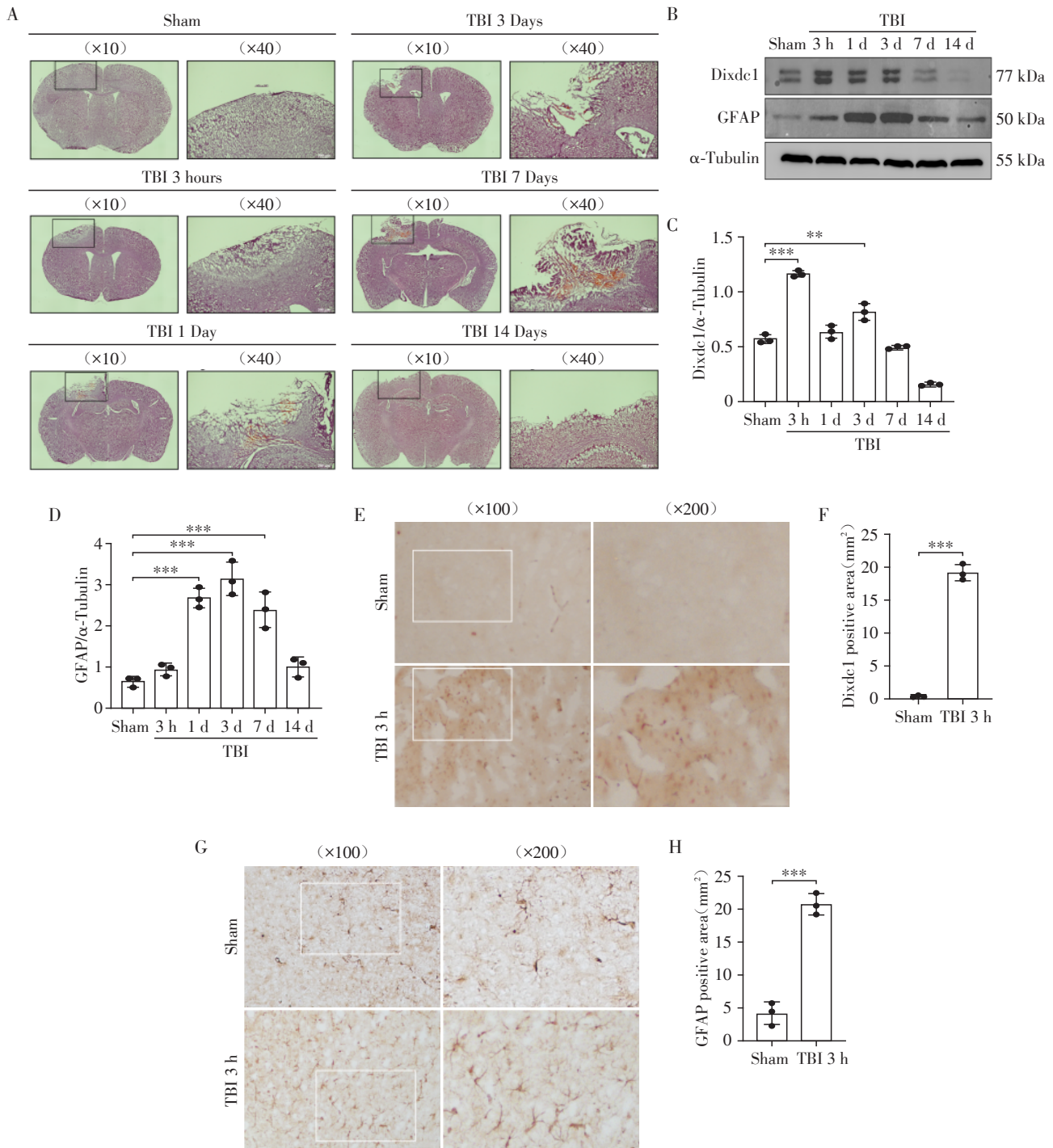
为进一步探索Dixdc1蛋白在TBI后的定位变化,使用双免疫荧光抗体对Sham组及TBI 3 h组的小鼠脑组织切片进行染色。与Sham组相比,TBI后Dixdc1、GFAP阳性信号均增加,且Dixdc1与GFAP的阳性信号存在共定位(图2A、B),表明Dixdc1可能是参与TBI后星形胶质细胞活化的潜在分子。除星形胶质细胞外,检测发现Dixdc1与小胶质细胞标志物Iba1、神经元标志物NeuN阳性信号不存在交叉(图2C、D)。提示Dixdc1在星形胶质细胞中特异性表达,因此选择星形胶质细胞这一细胞类型进行后续实验。

### 2.3 LPS刺激促进星形胶质细胞中Dixdc1蛋白表达

使用LPS刺激C8-D1A细胞来构建体外星形胶质细胞活化模型<sup>[16]</sup>。Western blot检测显示,1  $\mu$ g/mL LPS刺激星形胶质细胞后Dixdc1、GFAP、PCNA的蛋白表达增加(图3),且于刺激后24 h Dixdc1和GFAP蛋白表达增加最为明显,因此选择1  $\mu$ g/mL LPS刺激细胞24 h进行后续实验。值得注意的是,LPS刺激后Dixdc1表达变化趋势与GFAP表达变化具有一致性,因此推测Dixdc1对星形胶质细胞活化具有调控作用。

### 2.4 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的星形胶质细胞增殖和迁移

为了探究Dixdc1是否调控星形胶质细胞的增



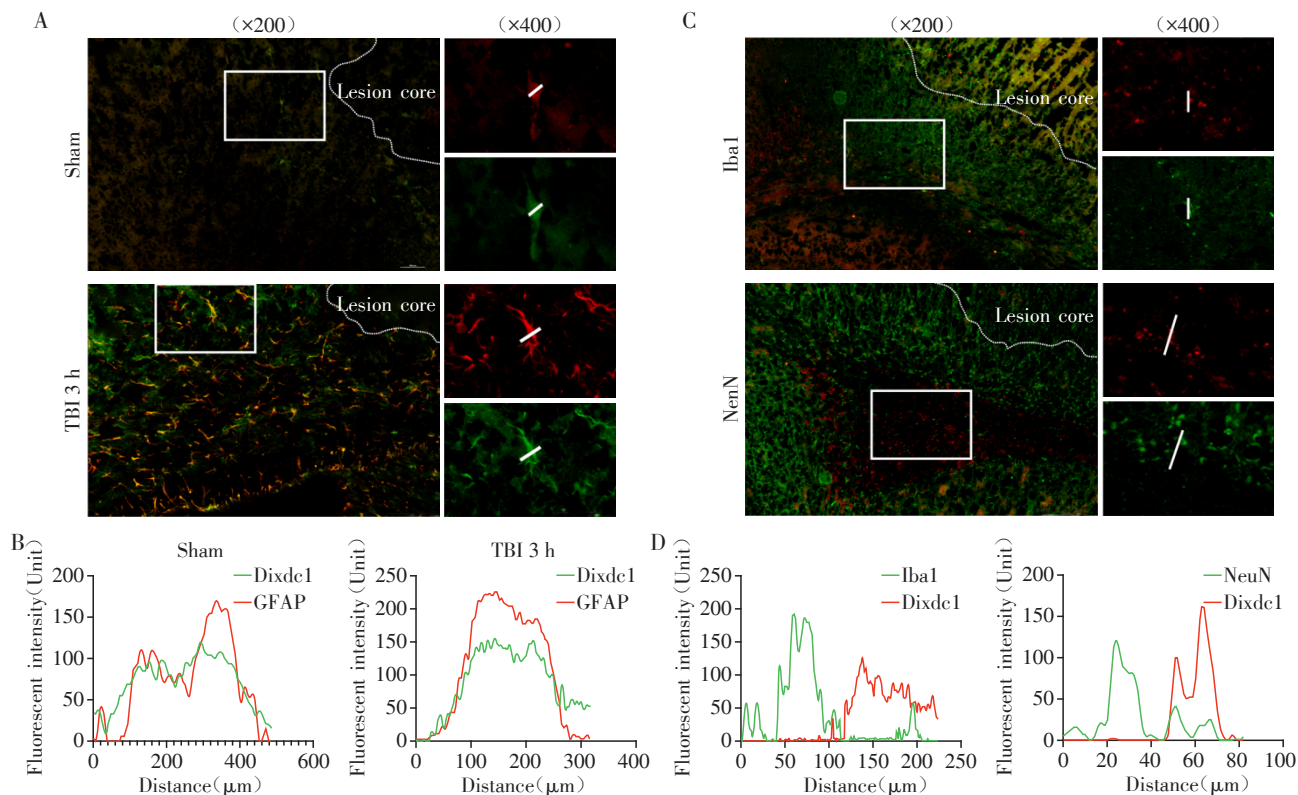
A: HE staining analysis of brain tissue structural changes in sham, 3 h, 1 d, 3 d, 7 d, and 14 d groups of mice. B-D: Expression levels of Dixdc1 (C) and GFAP (D) at lesion sites post-TBI by Western blot (B). E-H: The expression and distribution of Dixdc1 (E) and GFAP (G) within the ipsilateral cerebral cortex in sham group or TBI 3 h group by immunohistochemical staining. Quantitative analyses of protein density for Dixdc1 (F) and GFAP (H) indicate significant alterations compared with the sham group. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

图1 Dixdc1 蛋白在 TBI 后皮质中表达上调

Figure 1 Dixdc1 protein expression is upregulated in the cortex after TBI

殖迁移, 首先采用细胞划痕实验, 与 PBS 组(溶剂对照组)相比, LPS 组能够诱导星形胶质细胞向划痕中心迁移, 在 Dixdc1-sh 组(Dixdc1 敲低组)中细胞的迁移距离缩短(图 4A、B)。此外, 进行 EdU 实验检测星

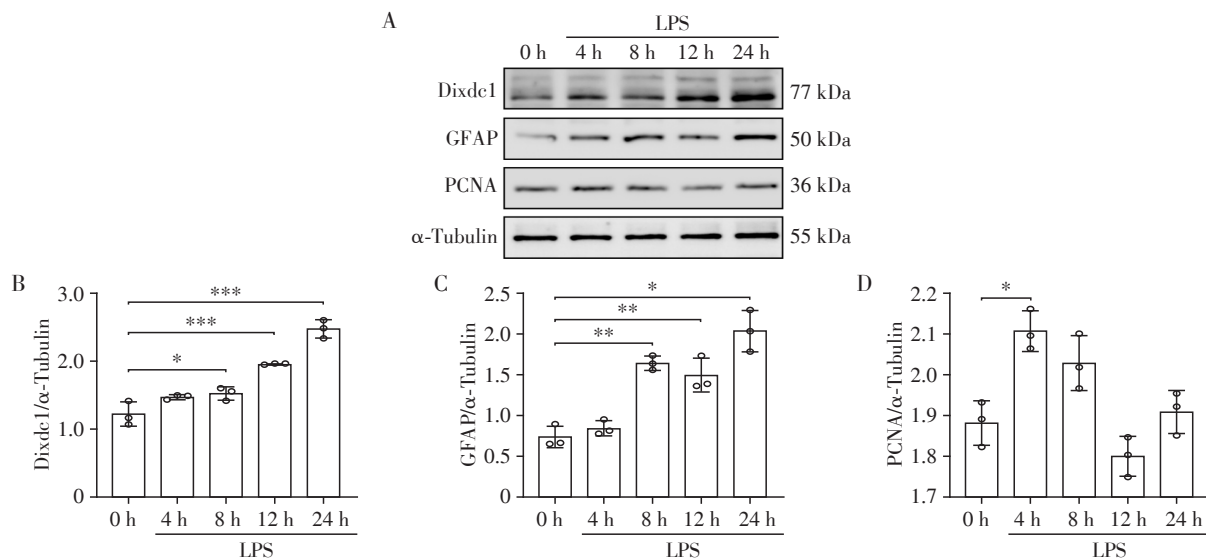
形胶质细胞中新合成的 DNA 来评估细胞增殖活性。与 PBS 组相比, LPS 组增殖细胞数增加, Dixdc1-sh 组增殖细胞数减少(图 4C、D)。进一步检测细胞迁移增殖的相关指标来验证上述现象, LPS 处理



A, B: Immunofluorescence staining of Dixdc1 (green) and GFAP (red) within the ipsilateral cerebral cortex in sham group or TBI 3 h group. C, D: Immunofluorescence staining of Dixdc1 (red) and Iba1/NeuN (green) within the ipsilateral cerebral cortex in sham group or TBI 3 h group. The lesion core region was delineated using a white dashed line and annotated as "Lesion core".

图2 Dixdc1蛋白与星形胶质细胞存在共定位

Figure 2 Dixdc1 protein co-localizes with astrocytes



A: Western blot detection of protein levels of Dixdc1, GFAP and PCNA in an activated astrocyte model. B-D: Quantitative analysis of Dixdc1 (B), GFAP (C) and PCNA (D) protein expressions. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

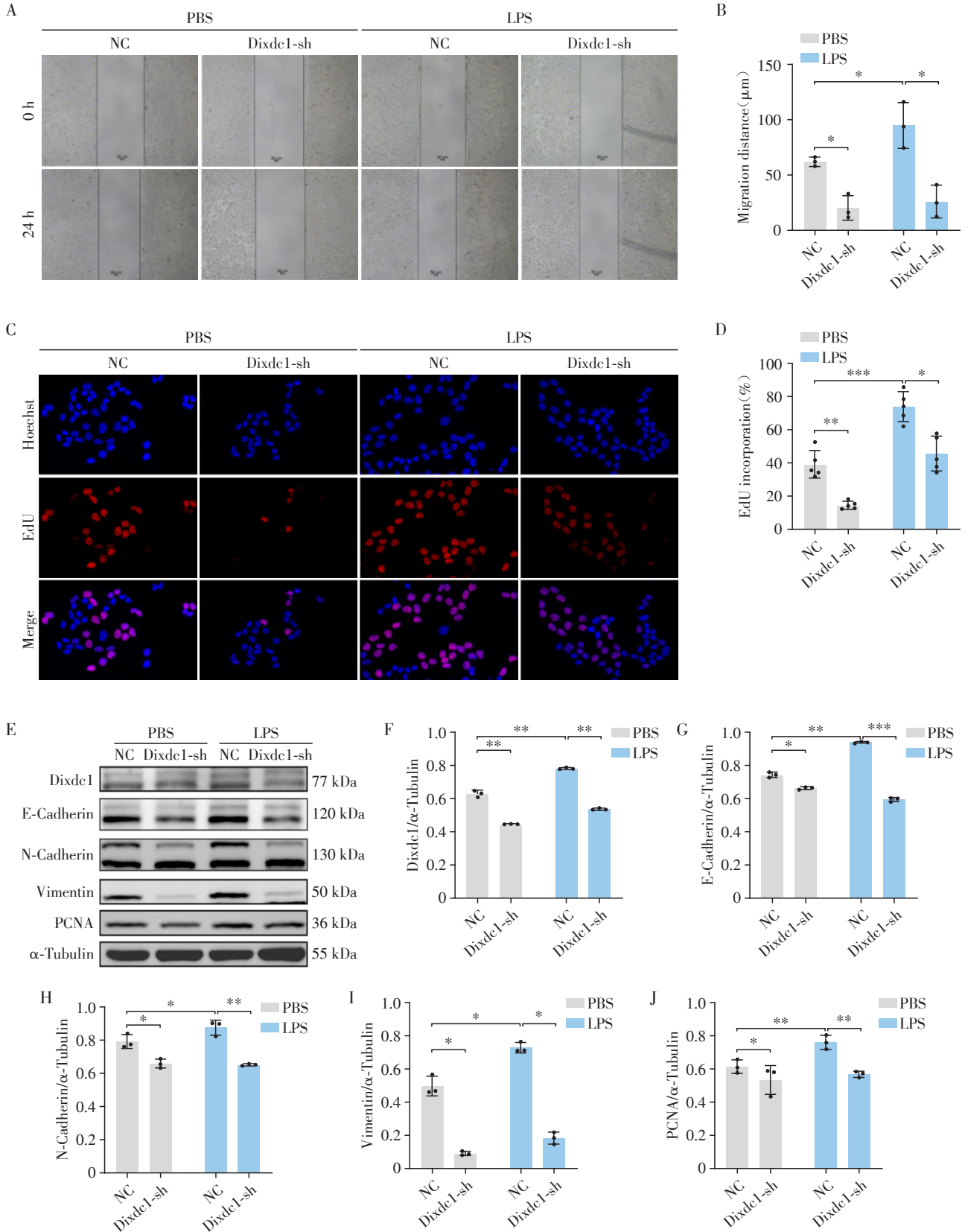
图3 LPS刺激促进星形胶质细胞中Dixdc1蛋白表达

Figure 3 LPS stimulation promotes Dixdc1 protein expression in astrocytes

后 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、PCNA 的蛋白表达较 PBS 处理组增加, Dixdc1-sh 组 Dixdc1 敲低抑制 LPS 的诱导作用(图 4E~J)。提示 Dixdc1 敲低抑

制星形胶质细胞增殖迁移能力。

2.5 敲低 Dixdc1 抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞周期细胞周期是检测细胞增殖的重要检测指标<sup>[18]</sup>,



A, B: Scratch assay to assess astrocyte migration (×40). C, D: EdU assay to measure astrocyte proliferation (×200). E-J: Western blot analysis (E) of Dixdc1 (F), E-Cadherin (G), N-Cadherin (H), Vimentin (I), and PCNA (J) reveals significant changes after LPS (1 μg/mL, 24 h) treatment. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, and \*\*\**P* < 0.001 (*n*=3).

图4 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的星形胶质细胞增殖和迁移

Figure 4 Knockdown of Dixdc1 inhibits LPS-induced proliferation and migration of astrocytes

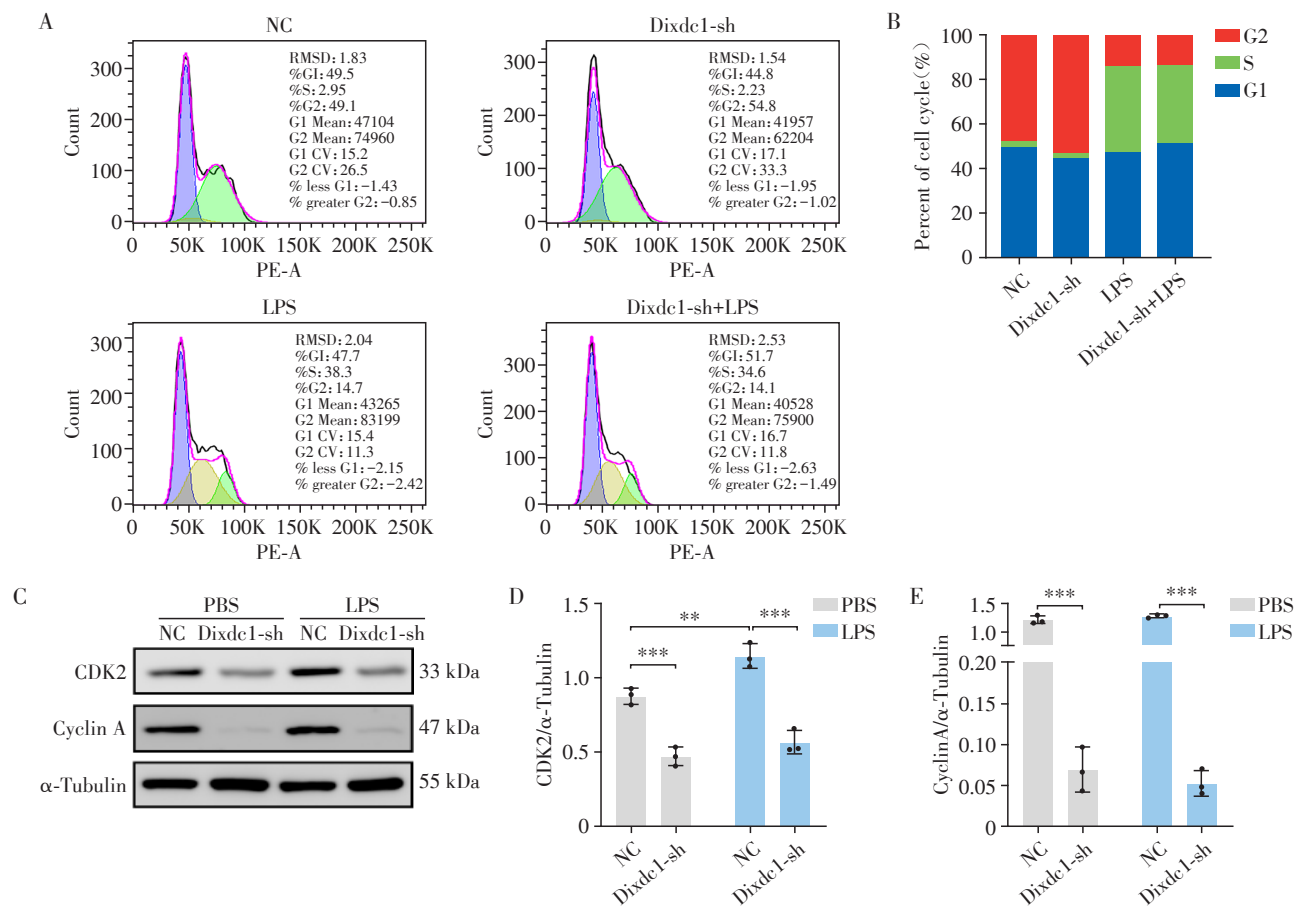
采用流式细胞术分析细胞周期, LPS组中S期星形胶质细胞的比例显著增加, Dixdc1-sh组中S期的细胞比例减小, 细胞分裂被抑制(图5A、B)。根据细胞周期的检测结果, Western blot检测S期相关蛋白CDK2、Cyclin A的表达, LPS组中CDK2、Cyclin A蛋白表达增加, Dixdc1-sh组中其蛋白水平降低(图5C~E)。提示Dixdc1敲低抑制星形胶质细胞的细胞周期, 减少星形胶质细胞增殖。

## 2.6 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的A1型星形胶质细胞极化

采用Western blot检测小鼠脑损伤后星形胶质细胞A1、A2表型极化的标志物C3及S100A10的表达情况。C3蛋白在损伤前期表达水平增加, 后期减少, 而S100A10蛋白在损伤前期表达水平减少, 后期增加(图6A~C)。同时Dixdc1的表达水平也是在损伤初期有所增加, 后期减少, 这与神经毒性星形胶质细胞的表达存在一致性, 因此合理推测Dixdc1对星形胶质细胞表型极化具有重要作用。

Western blot检测Dixdc1敲低后星形胶质细胞A1、A2表型相关标志物的表达水平。与PBS处理组相比, LPS处理组GFAP、C3的蛋白表达水平明显增加, 而S100A10蛋白表达水平降低, Dixdc1-sh组中C3表达量降低, 而S100A10表达量增加(图6D~G)。结果表明, Dixdc1敲低抑制A1表型极化, 促进星形胶质细胞向A2表型的转化。在RNA水平上, 热图显示Dixdc1-sh明显抑制了包括Serping1、H2.D1、Gbp2在内的多种基因表达。与之相反, Dixdc1-sh组显著上调包括S100A10、Clef1、Emp1在内的A2相关基因的表达(图6H)。同样, 用细胞免疫荧光染色验证Dixdc1敲低对星形胶质细胞表型极化的影响, Dixdc1敲低后C3的荧光强度增加而S100A10的强度降低(图6I)。

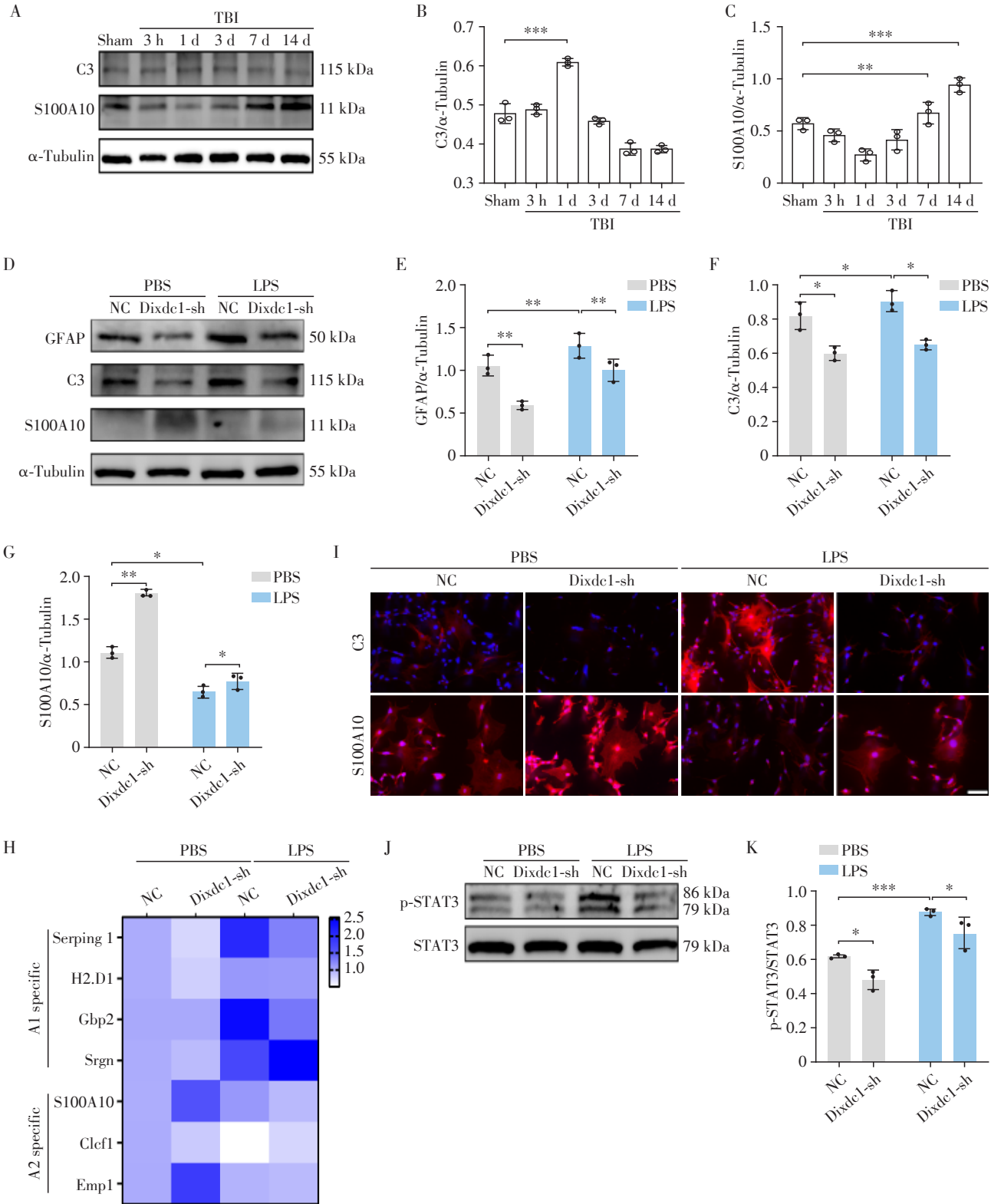
研究表明, 脑损伤后STAT3已被确定为星形胶质细胞反应的关键调控因子<sup>[19]</sup>。因此, 通过Western blot检测发现Dixdc1-sh组中STAT3磷酸化水平下降(图6J、K)。提示Dixdc1敲低可能通过抑制STAT3



A, B: Cell cycle analysis of astrocytes by flow cytometry. C~E: Western blot detection (C) of CDK2 (D) and Cyclin A (E) in astrocytes after LPS (1 μg/mL, 24 h) treatment. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  ( $n=3$ ).

图5 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的星形胶质细胞的细胞周期

Figure 5 Knockdown of Dixdc1 inhibits LPS-induced cell cycle in astrocytes



A–C: Expression levels of C3(B) and S100A10(C) were detected by Western blot(A). D–G: Expression levels of GFAP(E), C3(F), and S100A10 (G) were detected by Western blot(D) in astrocytes. H: mRNA expression levels of A1 and A2 phenotype-related genes by RT-PCR. I: Expression levels of C3 and S100A10 in astrocytes were stained with immunofluorescence (C3: red/Hoechst: blue and S100A10: red/Hoechst: blue;  $\times 200$ ). J, K: Expression levels of STAT3 were detected by Western blot after LPS(1  $\mu$ g/mL, 24 h) treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ ( $n=3$ ).

图6 敲低Dixdc1抑制LPS诱导的A1星形胶质细胞极化

Figure 6 Knockdown of Dixdc1 inhibits LPS-induced A1 astrocyte polarization

磷酸化来抑制星形胶质细胞 A1 表型极化。

### 3 讨论

星形胶质细胞活化是 TBI 后关键的病理生理表现之一,其中星形胶质细胞胶质瘢痕形成、表型转变在中枢神经系统病理损伤后起着神经损伤和修复的双重作用<sup>[20]</sup>。在 LPS 诱导的小鼠神经炎症模型中, A1 型星形胶质细胞释放促炎因子(IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ )和补体成分(C3),直接诱导神经元死亡,抑制损伤部位的神经功能恢复<sup>[10]</sup>,此外在小鼠缺血性卒中模型中, A1 型星形胶质细胞会破坏血脑屏障,加重脑水肿<sup>[21]</sup>;而在大鼠脊髓损伤模型中, A1 型星形胶质细胞极化具有潜在的保护作用,早期能够清除细胞碎片,为神经修复提供微环境<sup>[22]</sup>。因此,星形胶质细胞表型向着有利的方向发展对神经保护与功能恢复至关重要。

本研究发现脑损伤后皮质中星形胶质细胞内 Dixdc1 蛋白表达水平升高,且与星形胶质细胞活化标志物 GFAP 表达具有相关性,由此推测 Dixdc1 可能参与 TBI 后星形胶质细胞活化过程, LPS 诱导的星形胶质细胞活化模型也呈现类似的表达趋势。本研究进一步在体外细胞实验中采用 shRNA 敲低 Dixdc1 表达,探讨 Dixdc1 对星形胶质细胞迁移、增殖及极化的影响,检测细胞的迁移和增殖能力,分析细胞周期时相及细胞周期相关蛋白表达变化,同时评估 A1、A2 型星形胶质细胞表型标志物的表达。上述实验结果显示 Dixdc1 表达下调可减轻星形胶质细胞活化,具体表现在 Dixdc1 敲低后星形胶质细胞迁移至损伤中心的能力下降,增殖形成胶质瘢痕的能力下降,以及抑制星形胶质细胞 A1 型转变,减少补体成分 C3 的释放。

本研究聚焦于 Dixdc1 在星形胶质细胞 A1 型极化中的体外调控作用,其体内功能需通过构建星形胶质细胞条件性敲除 Dixdc1 小鼠进一步验证。另外,本研究主要关注 Dixdc1 对 TBI 后星形胶质细胞活化介导神经炎症发生的影响,实验结果提示 Dixdc1 可能通过促进星形胶质细胞 A1 型极化及神经炎症反应,释放补体成分 C3,进而可能发生突触吞噬,间接加剧 TBI 后神经元损伤,但其介导的神经元-胶质细胞“对话”的具体分子机制需进一步解析。研究报道称 STAT3 已被确定为星形胶质细胞反应性的关键调节因子,在病理过程中发挥双重作用<sup>[23-24]</sup>。在 TBI 急性期, STAT3 过度激活加剧神经炎症和血脑屏障破坏,与神经元凋亡及神经功能障碍相关;在慢性

期, STAT3 可能通过调控胶质瘢痕的稳定性和神经营养因子释放,间接支持组织修复。本研究初步探索发现 Dixdc1 敲低可能通过抑制 STAT3 磷酸化来抑制星形胶质细胞 A1 表型极化的机制。后续研究将进一步探索 Dixdc1 与 JAK-STAT 信号通路之间的功能交互机制,特别是其调控 A1/A2 极化标志物转录的潜在作用<sup>[25]</sup>。

综上所述, TBI 后星形胶质细胞内 Dixdc1 蛋白表达上调,而减少 Dixdc1 表达可抑制 A1 型星形胶质细胞的活化,进而显著抑制 LPS 诱导的星形胶质细胞增殖迁移和 STAT3 磷酸化。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

#### Conflict of Interests:

All authors declare no conflicts of interests.

#### 作者贡献申明:

汤莉巧负责实验操作、数据分析及撰写文章初稿;段程伟负责文章校对、数据分析及实验设计;陈伟观负责文章修订及完善;郭宇和孙王妍参与动物实验及数据分析;宰添羽和刘梦琦参与动物实验及文献检索;张冬梅和卢红建负责项目设计、文章审阅及修订。

#### Author's Contributions:

TANG Liqiao was responsible for experimental operation, data analysis, and drafting the initial manuscript; DUAN Chengwei was responsible for manuscript proofreading, data analysis, and experimental design; CHEN Weiguan was responsible for manuscript revision and refinement; GUO Yu and SUN Wangyan participated in animal experiments and data analysis; ZAI Tianyu and LIU Mengqi participated in animal experiments and literature retrieval; ZHANG Dongmei and LU Hongjian were responsible for project design, manuscript review, and revision.

#### [参考文献]

- [1] MAAS A I R, MENON D K, MANLEY G T, et al. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(11): 1004-1060
- [2] CAPIZZI A, WOO J, VERDUZCO-GUTIERREZ M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 213-238
- [3] GALGANO M, TOSHKKEZI G, QIU X C, et al. Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(7): 1118-1130
- [4] SHENG R J, CHEN C C, CHEN H, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation for stroke rehabilitation: insights into the molecular and cellular mechanisms of

- neuroinflammation[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1197422
- [5] KARVE I P, TAYLOR J M, CRACK P J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 692–702
- [6] KALRA S, MALIK R, SINGH G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury(TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs [J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1153–1166
- [7] PURNELL B S, ALVES M, BOISON D. Astrocyte-neuron circuits in epilepsy [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 179: 106058
- [8] 王一凡, 谢金玉, 陈迎玉, 等. STK25在星形胶质细胞活化和EAE小鼠病变进程中的作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(3): 311–318  
WANG Y F, XIE J Y, CHEN Y Y, et al. The role of STK25 in astrocyte activation and pathological changes in EAE mice [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2023, 43(3): 311–318
- [9] CAMERON E G, NAHMOU M, TOTH A B, et al. A molecular switch for neuroprotective astrocyte reactivity [J]. *Nature*, 2024, 626(7999): 574–582
- [10] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481–487
- [11] SHIOMI K, UCHIDA H, KEINO-MASU K, et al. Ccd1, a novel protein with a DIX domain, is a positive regulator in the Wnt signaling during zebrafish neural patterning [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(1): 73–77
- [12] KWAN V, MEKA D P, WHITE S H, et al. DIXDC1 phosphorylation and control of dendritic morphology are impaired by rare genetic variants [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(7): 1892–1904
- [13] MARTIN P M, STANLEY R E, ROSS A P, et al. DIXDC1 contributes to psychiatric susceptibility by regulating dendritic spine and glutamatergic synapse density *via* GSK3 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(2): 467–475
- [14] LU H J, JIANG R, TAO X L, et al. Expression of Dixdc1 and its role in astrocyte proliferation after traumatic brain injury [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(6): 1131–1139
- [15] YU Y, SHEN T J, ZHONG X L, et al. NEK6 is an injury-responsive kinase cooperating with STAT3 in regulation of reactive astrogliosis [J]. *Glia*, 2022, 70(2): 273–286
- [16] YUE Q, XU Y S, LIN L G, et al. Canthin-6-one(CO) from *Picrasma quassioides*(D. Don)Benn. ameliorates lipopolysaccharide (LPS)-induced astrocyte activation and associated brain endothelial disruption [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154108
- [17] LI J L, YANG K H, YAO F C, et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting HMGB1 modulates AQP1 to reduce pain induced by chronic compression of the dorsal root ganglia [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1469223
- [18] MATTHEWS H K, BERTOLI C, DE BRUIN R A M. Cell cycle control in cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 74–88
- [19] BALIC J J, ALBARGY H, LUU K, et al. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 $\beta$  expression [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3816
- [20] 陈贝宁, 杨清湖, 袁增强, 等. 亨廷顿舞蹈症中星形胶质细胞转录异质性分析 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2025, 45(4): 487–497  
CHEN B N, YANG Q H, YUAN Z Q, et al. The transcriptional heterogeneity of astrocytes in Huntington's disease [J]. *Journal of Nanjing Medical University (Natural Sciences)*, 2025, 45(4): 487–497
- [21] ZHANG Q, LIU C, SHI R B, et al. Blocking C3d<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> A1 astrocyte conversion with semaglutide attenuates blood-brain barrier disruption in mice after ischemic stroke [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(3): 943–959
- [22] LV J W, YU H, SHAN F L, et al. Effect of myelin debris on the phenotypic transformation of astrocytes after spinal cord injury in rats [J]. *Neuroscience*, 2024, 547: 1–16
- [23] CUI D M, ZENG T, REN J, et al. KLF4 knockdown attenuates TBI-induced neuronal damage through p53 and JAK-STAT3 signaling [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(2): 106–118
- [24] DING W, CAI C, ZHU X M, et al. Parthenolide ameliorates neurological deficits and neuroinflammation in mice with traumatic brain injury by suppressing STAT3/NF- $\kappa$ B and inflammasome activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108913
- [25] LIANG P Y, ZHANG X Y, ZHANG Y H, et al. Neurotoxic A1 astrocytes promote neuronal ferroptosis *via* CXCL10/CXCR3 axis in epilepsy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195: 329–342  
(收稿: 2025-04-28; 修回: 2025-07-02; 录用: 2025-07-12)  
(本文编辑: 陈汐敏)