

蛋白 S/髓系上皮细胞再生酪氨酸激酶减轻小胶质细胞的炎症反应的机制研究

谢飞^a, 孙佳昕^a, 舒进军^a, 张宏伟^a, 周术奎^b

四川省肿瘤临床医学研究中心, 四川省肿瘤医院研究所, 四川省癌症防治中心, 电子科技大学附属肿瘤医院 a. 麻醉科, b. 泌尿外科, 四川 成都 610041

【摘要】 **目的** 探讨髓系上皮细胞再生酪氨酸激酶(Mer)及其配体蛋白 S(ProS)对小胶质细胞 M1/M2 极化和神经炎症调节的影响。**方法** 用脂多糖(LPS)和 ProS 刺激野生型(WT)和 Mer 基因敲除(Mer^{-/-})小鼠的原代小胶质细胞,通过 Western 印迹、免疫荧光、酶联免疫吸附试验(ELISA)和流式细胞术评估炎症因子(IL-6 和 TNF- α)、TLR4/MyD88/NF- κ B 通路相关蛋白表达和小胶质细胞 M1/M2 极化。**结果** LPS 刺激通过 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路提高了 WT 细胞中 TNF- α 和 IL-6 的表达。ProS/Mer 激活会上调信号转导和转录激活因子 1(STAT1)和细胞因子信号转导抑制因子 1/3(SOCS1/3),从而持续抑制 LPS 诱导的细胞因子上调和 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路。ProS/Mer 激活还能显著增加小胶质细胞的 M2 样极化,而 Mer^{-/-}细胞在 LPS 刺激后的作用会减弱。**结论** ProS/Mer 通路的激活通过抑制 TLR 信号、激活 SOCS1/3 和 STAT1 以及增强小胶质细胞 M2 样极化,减少了 LPS 诱导的炎症反应。

【关键词】 小胶质细胞;配体蛋白 S;TAM 受体;Toll 样受体;神经炎症

【中图分类号】 R541.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-6170(2026)02-0061-06

Mechanism study on protein S/myeloid epithelial cell regenerative tyrosine kinase alleviates the inflammatory response of microglia XIE Fei^a, SUN Jia-xin^a, SHU Jin-jun^a, ZHANG Hong-wei^a, ZHOU Shu-kui^b a. Department of Anesthesiology, b. Department of Urology, Sichuan Provincial Clinical Medical Research Center for Tumor, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Sichuan Provincial Key Laboratory of Clinical Oncology, Affiliated Cancer Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effects of regenerating tyrosine kinase (Mer) and its ligand protein S (ProS) in myeloid epithelial cells on M1/M2 polarization and neuroinflammation regulation in microglia. **Methods** Primary microglia from wild-type (WT) and Mer gene knockout (Mer^{-/-}) mice were stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and ProS. The expression of inflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), TLR4/MyD88/NF- κ B pathway related proteins, and microglial M1/M2 polarization were evaluated by Western blotting, immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometry. **Results** LPS stimulation elevated TNF- α and IL-6 expressions in WT cells via the TLR4/NF- κ B pathway. ProS/Mer activation upregulated signal transduction and transcription activator 1 (STAT1) and cytokine signal transduction inhibitor 1/3 (SOCS1/3), but conversely inhibited LPS induced cytokine upregulation and TLR4/MyD88/NF- κ B pathway. ProS/Mer activation also significantly increased microglial M2-like polarization while the effect of Mer^{-/-} cells would be weakened after LPS stimulation. **Conclusions** The activation of the ProS/Mer pathway reduces the LPS induces inflammatory response by inhibiting TLR signaling, activating SOCS1/3 and STAT1, and enhancing M2 like polarization of microglia.

【Key words】 Microglia; ProS; TAM receptors; Toll-like receptors; Neuroinflammation

小胶质细胞是中枢神经系统先天性免疫系统的重要组成部分,通过对细菌产物做出反应,在保护中枢神经系统免受感染方面发挥着至关重要的作用^[1]。这些细胞通过病原体识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)检测一系列病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),触发肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)的释放^[2]。小胶质细胞具有高度的可塑性,可根据促炎和抗炎信号改变其形态。例如,小胶质细胞可从促炎反应过渡到抗炎反应,以减轻炎症^[3]。

小胶质细胞表达 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs),TLRs 可识别一系列病原体和病原体产物,在先天性免疫系统中发挥关键作用。以往的研究表明,TLR4 在调节炎症反应中至关重要,最终会导致下游 NF- κ B 的激活和促炎细胞因子的产生^[4, 5]。

髓系上皮细胞再生酪氨酸激酶(Mer)是受体酪氨酸激酶 Tyro-Axl-Mer (TAM)家族的成员,在调节中枢神经系统小胶质细胞的炎症反应中起着关键作用^[6, 7]。研究表明,缺乏 Mer 的小鼠无法抵御感染,在接受脂多糖(LPS)治疗后会表现出明显的不适症状^[8]。此外,TAM 受体及其配体——生长停滞特异性基因 6(Gas 6)和蛋白 S(ProS)已被证明可减少 LPS 刺激细胞中促炎细胞因子的释

放^[9, 10]。研究还发现, Mer 信号传导可促进巨噬细胞从 M1 样表型向 M2 样表型转变^[11]。例如, 通过 ProS 激活 Mer 可抑制腹膜巨噬细胞和肿瘤衍生巨噬细胞的 M1 样极化, 并增加骨髓衍生巨噬细胞中 M2 相关基因的表达^[12]。

此外, 既往研究表明, 小胶质细胞表达高水平的 Axl 和 Mer 受体, 但 Tyro3 的表达水平较低^[13]。虽然 ProS 和 Mer 已被证实在促进巨噬细胞抗炎反应中发挥重要作用, 但 ProS/Mer 是否能通过小胶质细胞中的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路调节炎症仍不清楚。因此, 本研究旨在探讨 ProS/Mer 是否能通过靶向小胶质细胞中的 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路来抑制 LPS 诱导的炎症。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验于 2021 年在四川省肿瘤医院·肿瘤研究所完成并通过四川省肿瘤医院动物伦理与使用委员会审查批准(批准号: 311-2019)。实验小鼠购买自广州赛业公司(Cyagen Co., Ltd), 其中野生型(Wild type, WT)小鼠 50 只(C57/BL, 2 月龄, 体重范围: 230~250 g), Mer 敲除小鼠 6 只并自行繁殖(C57/BL, 2 月龄, 体重范围: 230~250 g)。实验前一周, 小鼠以每笼四只的方式饲养于特定病原体无菌室中, 环境条件标准化[(25 ± 2) °C, 60% 湿度, 12 小时明暗周期]。所有小鼠均可自由摄取食物和饮水。

1.2 药物及试剂 脂多糖(LPS, L6529, Sigma-Aldrich)、ProS(HPS, Annoron) TNF- α 与 IL-6 ELISA 试剂盒(KE10002 和 KE10007, Proteintech)、BCA 试剂盒(A55864, Thermo Fisher)、SDS-PAGE 浓缩胶和分离胶(4561095, Bio-Rad)、PVDF 膜(IPVH00010, Millipore)。所用试剂货号 and 厂家如下表 1 所示。

表 1 所用试剂

抗体名称	货号	生产厂家
CD11b	65055-1	Proteintech
CD45	30-F11	BioLegend
Arg1	PA5-29645	Thermo Fisher
iNOS	53-5920-80	Thermo Fisher
Mer	365499	Santa Cruz Biotechnology
TLR4	AF7017	Affinity Biosciences
MyD88	AF5195	Affinity Biosciences
p-STAT1	AF3293	Affinity Biosciences
p-65NF- κ B	AF2006	Affinity Biosciences
SOCS1	AF5378	Affinity Biosciences
SOCS3	AF6133	Affinity Biosciences
β -actin	47778	Santa Cruz Biotechnology

1.3 方法

1.3.1 原代小胶质细胞的分离和培养 小鼠原代小胶质细胞是从新生(P1-P3)小鼠(WT 和 Mer^{-/-})的脊髓中分离纯化^[14]。采用高浓度 CO₂ 处死小鼠后, 将整条脊髓从蛛网膜上剥离并切成小块。用 0.1% 胰蛋白酶在 37 °C 含 5% CO₂ 的孵育箱中消化 20 分钟分离神经胶质细胞, 然后将细胞悬浮液放入预先涂有 5 mg/ml 聚-D-赖氨酸的 75 cm² 组织培养瓶中培养, 培养液为含 15% FCS、1% 青霉素/链霉素(P/S)和 1% 谷氨酰胺的 DMEM。培养 2~3 天后, 将培养基换成 DMEM/10% FCS, 细胞再培养 10~14 天。将烧瓶抽吸 10~20 次, 将小胶质细胞从星形胶质细胞单层中移出, 并将其播种到涂有聚-D-赖氨酸的细胞培养板上, 以供进一步使用。小鼠原代小胶质细胞的纯度是通过抗-CD11b 染色免疫细胞化学法测定的, 其纯度始终 $\geq 95\%$ 。

WT 和 Mer^{-/-} 原代小胶质细胞的生长密度达到 80% 后进行下一步实验。两种细胞分别先使用 LPS (10 ng/ml) 刺激 8 小时使其成为促炎状态, 然后再给予 ProS (10 μ g/ml) 孵育 8 小时, 同时使用溶剂作为阴性对照。

1.3.2 流式细胞术 采用流式细胞术评估小胶质细胞在 LPS 和 ProS 处理后的极化情况^[15]。首先, 将细胞播种到孔中, 让其粘附 1~2 天。然后, 更换培养基并加入处理剂。LPS 和 ProS 处理后, 收集细胞并用 Ultra V 阻滞剂阻滞。然后用两种抗体组合孵育细胞: PE anti-CD45 和 FITC anti-CD11b 是常用的小胶质细胞标记物, 而 PE anti-Arg1 和 FITC anti-iNOS 则分别是 M2 类和 M1 类极化的标记物。孵育后, 固定细胞并使用 Guava easy Cyte 8 Millipore 流式细胞仪进行分析。

1.3.3 炎症因子测定 将抗小鼠 TNF- α 或 IL-6 抗体涂布在平板上, 室温孵育 2 小时。清洗样品后, 加入检测抗体并孵育 1 小时。随后再次清洗平板, 使用辣根过氧化物酶进行检测。在 450nm 波长下测量光密度。

1.3.4 蛋白印迹分析 蛋白裂解液经 8000 \times g、4 °C 离心 8 分钟后得到上清液。使用 BCA 蛋白检测试剂盒(BioTech 生物技术研究)测定总蛋白浓度。蛋白质经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜(Millipore, Billerica)上。室温(26 °C)下用 5% 脱脂牛奶在 TBS 中阻断 1 小时后, 用一抗在 4 °C 孵育膜过夜, 一抗包括抗-Mer (1 : 500)、抗-TLR4 (1 : 500)、抗-MyD88 (1 : 400)、抗-p-STAT1 (1 : 500), 抗 p-P65

(1:500)、抗 SOCS 1(1:500)、抗 SOCS 3(1:500)和 β -actin(1:1,000)。清洗后,在 37 °C 下用二抗(山羊抗兔:1:1000,ZB-2301;山羊抗鼠:1:1000,ZB-2305,ZSGB-BIO)孵育膜 1 小时。用增强化学发光试剂盒(江苏省贝奥泰姆生物技术研究)显色,并用 Image J 软件测量条带强度。 β -actin 用于蛋白质水平的归一化。

1.3.5 免疫荧光测定 准备染色时,先用 1%的 BSA 溶液阻断盖玻片,然后用一抗(包括抗 Iba1(1:300;ab178847,Abcam)和抗 TLR4(1:500;sc-293072,Santa Cruz Biotechnology))在 4 °C 下孵育过夜。清洗后,盖玻片与 1%BSA 中的二抗在室温下孵育 1 小时。使用的二抗为抗兔 AlexaFluor 488(1:1000;Invitrogen)和抗鼠 Cy3(1:1000;Invitrogen),染色剂 DAPI 的浓度为 1:400(Invitrogen Molecular Probes)。然后用 PBS 冲洗盖玻片并将其安装到透明玻璃显微载玻片上。用激光扫描

共聚焦显微镜(Zeiss LSM 710)采集图像。

1.4 统计学方法 统计分析使用 SPSS 17.0 进行。计量资料以均数 \pm 标准差表示,使用单因素方差分析比较 24 小时细胞因子血浆水平和蛋白表达的组内差异,使用 Student-Newman-Keuls(SNK)-*q* 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ProS 对经 LPS 刺激后脊髓小胶质细胞炎症因子的影响 与未处理的细胞相比,ProS 处理可明显降低 WT 小胶质细胞中 TNF- α 和 IL-6 的浓度($P < 0.05$)。与未处理的细胞相比,ProS 处理可明显降低 Mer^{-/-}小胶质细胞中的 IL-6 和 TNF- α 浓度($P < 0.05$)。与 ProS 处理的 WT 小胶质细胞相比,ProS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞的 IL-6 和 TNF- α 浓度明显增加($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 ProS 可减轻小胶质细胞在 LPS 处理后的炎症因子表达

分组	处理方式	炎症因子 (pg/ml)	
		IL-6	TNF- α
WT	LPS (+), ProS (-)	150.3 \pm 23.6	155.2 \pm 12.8
WT	LPS (+), ProS (+)	80.1 \pm 15.5*	75.6 \pm 18.3*
Mer ^{-/-}	LPS (+), ProS (-)	130.8 \pm 20.8	165.7 \pm 15.9
Mer ^{-/-}	LPS (+), ProS (+)	100.4 \pm 14.2#	130.2 \pm 17.1#

*与 WT LPS (+), ProS (-) 组比较, $P < 0.05$; #与 Mer^{-/-} LPS (+), ProS (-) 组比较, $P < 0.05$

2.2 ProS 对经 LPS 刺激后脊髓小胶质细胞极化水平的影响 与未处理的 WT 小胶质细胞相比,ProS 处理的 WT 小胶质细胞中 CD11b⁺ 和 CD45⁺ 细胞的百分比显著下降($P < 0.05$, 图 1a)。与 NS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞相比,ProS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞中 CD11b⁺ 细胞的百分比也明显下降($P < 0.05$, 图 1a)。与 ProS 处理的 WT 小胶质细胞相比,ProS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞中 CD45⁺ 细胞的百分比明显增加($P < 0.05$, 图 1a)。

与未处理的细胞相比,ProS 处理的 WT 小胶质细胞中 iNOS⁺ 细胞的百分比显著增加($P < 0.05$, 图 1b)。在经 ProS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞中,iNOS⁺ 细胞的数量与未处理的 Mer^{-/-}细胞相比明显增加($P < 0.05$, 图 1b),而经 ProS 处理后,Mer^{-/-}和 WT 细胞中 Arg-1 的数量均有所增加($P < 0.05$, 图 1b)。这些结果表明,ProS/Mer 在调节小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 极化中起着重要作用,Mer 表达的缺失会促进小胶质细胞/巨噬细胞的促炎 M1 样表型激活。

2.3 ProS 对经 LPS 刺激后脊髓小胶质细胞 TLR4 表达水平的影响 经 LPS 处理后,在 Mer^{-/-}和 WT 细胞中都观察到了活化的小胶质细胞(Iba-1⁺),其 TLR4 免疫反应很强(图 2a)。ProS 处理抑制了 WT 细胞中 TLR4 阳性小胶质细胞的增加($P < 0.05$, 图 2b),尽管 Mer^{-/-}细胞中的小胶质细胞仍显示出反应性形态。

2.4 ProS 对 LPS 刺激后脊髓小胶质细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路中蛋白表达的影响 LPS 处理 8 小时后,与没有经过 ProS 处理的 Mer^{-/-}小胶质细胞相比,ProS 处理导致 TLR4 和 MyD88 蛋白表达显著下降($P < 0.05$, 图 3a)。WT 小胶质细胞经 LPS 处理 8 小时后,TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白表达明显增加($P < 0.05$, 图 3a),经 ProS 处理后,TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白明显降低($P < 0.05$, 图 3a)。

与 WT 小胶质细胞相比,Mer^{-/-}小胶质细胞在 LPS 处理后 SOCS-1/3 和 STAT1 的蛋白表达明显减少($P < 0.05$, 图 3b)。

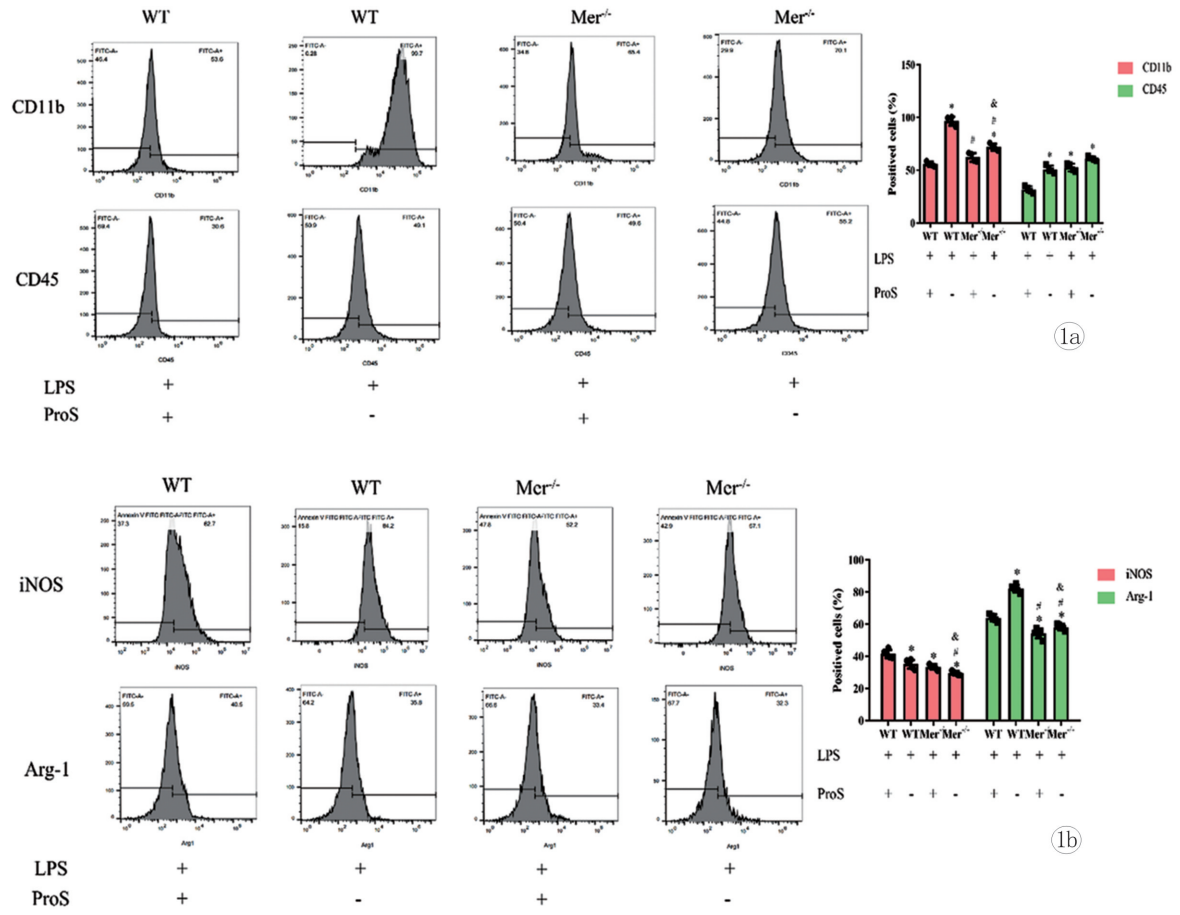


图1 ProS可调节LPS处理后小胶质细胞的M1/M2极化 a:流式细胞数据显示,WT细胞经LPS处理后CD45⁺和CD11b⁺阳性细胞的百分比显著增加,经ProS处理后进一步减少。此外,Mer^{-/-}细胞经ProS处理后,CD45⁺和CD11b⁺阳性细胞的百分比明显降低($n=5$,与Mer^{-/-}经LPS和ProS处理相比, $*P<0.05$;与Mer^{-/-}经LPS处理相比, $\#P<0.01$;与WT经LPS和ProS处理相比, $\&P<0.05$);b:定量显示,Mer^{-/-}和WT细胞经LPS处理后,iNOS阳性细胞的百分比显著增加,经ProS处理后进一步减少($n=5$, $*P<0.05$)

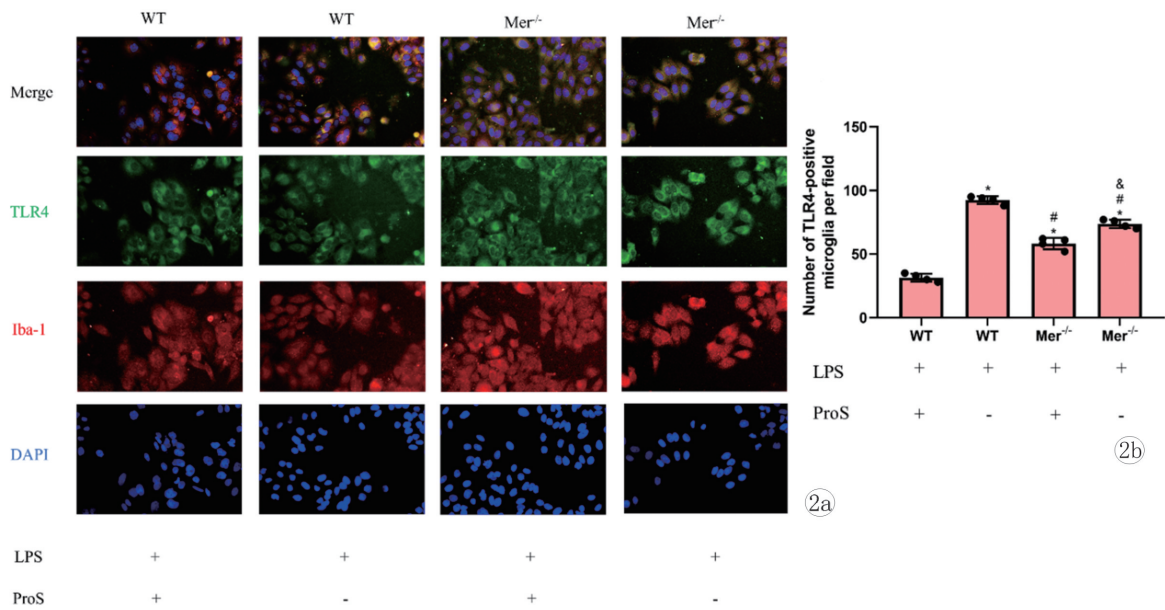


图2 ProS可降低LPS处理后脊髓小胶质细胞TLR4的表达 a: $\times 100$ (A)免疫荧光显示经LPS处理8h后与TLR4共标记的Iba-1阳性细胞代表图。b:定量显示,ProS处理的小胶质细胞中,与TLR4共标记的Iba-1阳性细胞明显少于Mer^{-/-}和WT小胶质细胞,但与Mer^{-/-}小胶质细胞相比,与TLR4共标记的Iba-1阳性细胞数量少于WT小胶质细胞。与TLR4共标记的Iba-1阳性细胞总数以每个视野的平均数量表示($n=5$, $*P<0.05$)

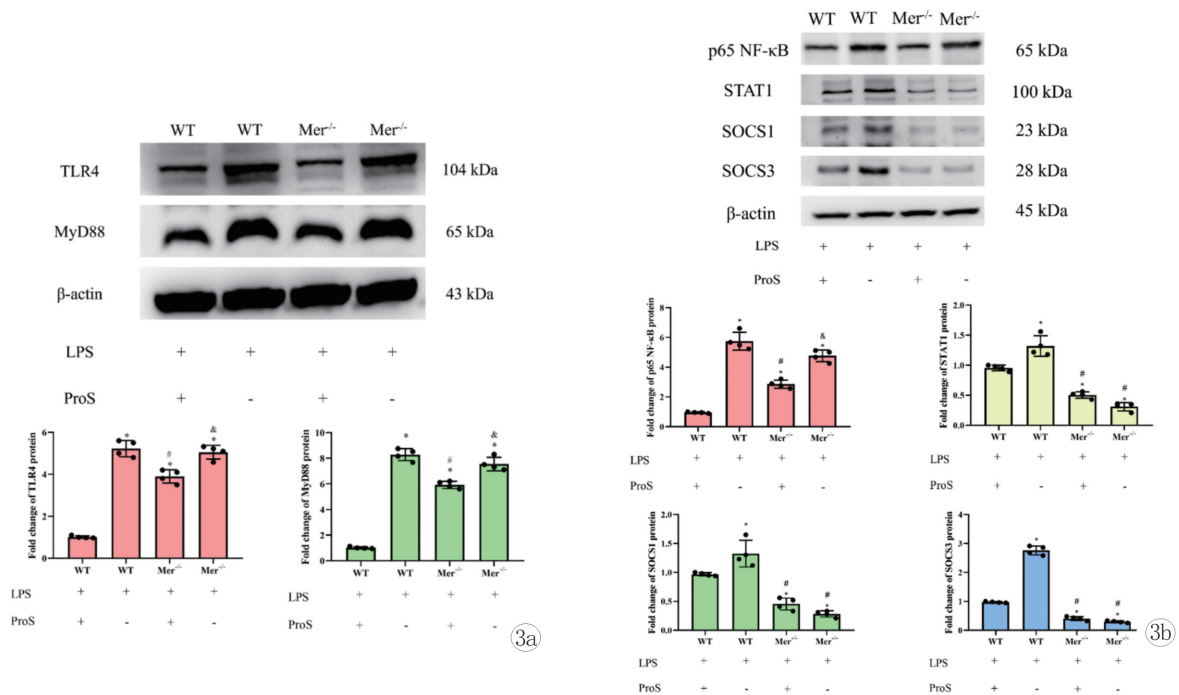


图3 ProS通过激活SOCS1/3抑制TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路蛋白表达(Western印迹检测)a:WT小胶质细胞中Mer蛋白表达明显高于Mer^{-/-}小胶质细胞;ProS处理后WT和Mer^{-/-}小胶质细胞中TLR4和MyD88蛋白表达明显降低;b:ProS处理后,WT和Mer^{-/-}小胶质细胞中p65 NF- κ B蛋白表达明显降低。WT小胶质细胞在LPS处理8小时后p-STAT3和SOCS1/3蛋白表达明显升高。(n=5, *P<0.05)

3 讨论

本研究结果表明,Mer通过激活STAT1/SOCS通路和抑制TLR4/MyD88/NF- κ B通路,在调节小胶质细胞极化和炎症方面发挥着至关重要的作用。Mer表达的缺失会导致小胶质细胞活化失衡,形成促炎症的M1样表型。然而,在缺乏Mer的情况下可能存在补偿机制,使小胶质细胞能够对促炎性刺激做出反应。要全面了解小胶质细胞活化和极化所涉及的复杂信号通路,还需要进一步的研究。

TAM受体(包括Tyro3、Axl和Mer)是受体酪氨酸激酶家族的一员,在炎症中发挥着重要作用。TAM受体被其配体Gas6和ProS激活后会产生下游信号,这些信号对细胞增殖、存活、分化、迁移和免疫功能至关重要^[17,18]。众所周知,ProS是蛋白C的辅助因子和凝血因子的抑制剂,其功能还包括激活TAM受体^[19]。此外,小胶质细胞Mer和Axl的缺乏会导致凋亡细胞的聚集,尤其是在中枢神经系统的神经源区域。已有研究表明,Axl和Mer能共同清除小胶质细胞凋亡的细胞体^[6],最近的证据表明,它们在相互协作的同时还能独立抑制炎症反应^[20]。

激活TAM受体(包括Tyro3、Axl和Mer)可产生抗炎作用。负调节因子在抑制炎症反应以防止病原体引起的炎症造成过度损伤方面非常重要^[21]。

已发现的炎症负调控因子包括SOCS家族和锌指蛋白A20。ProS/Mer系统也是负向调节炎症反应的关键,并在这一反应中发挥着至关重要的作用^[22,23]。

Tyro3和Axl主要在神经元中表达,而Mer则主要在中枢神经系统的小胶质细胞中表达^[24,25]。研究表明,Mer在调节小胶质细胞介导的免疫反应(包括吞噬凋亡细胞)中发挥着至关重要的作用^[26]。与具有完整Mer的小鼠相比,Mer^{-/-}小鼠对LPS反应的死亡率明显较高,这可能是由于内毒素诱导TNF- α 过度表达所致^[27]。

越来越多的证据表明,小胶质细胞的形态学变化与促炎或抗炎信号反应和细胞因子表达有关^[28,29]。我们的研究支持之前的发现,即ProS/Mer负向调节小胶质细胞中TLR4下游的炎症反应^[29,30]。Mer的激活通过JAK/STAT1途径促进SOCS 1/3的表达,而SOCS 1/3则通过促进TLR4降解负向调节NF- κ B的激活^[31]。NF- κ B活化的减少也会抑制炎症性细胞因子的表达。此外,SOCS 1/3表达的增加可抑制细胞因子受体的活化水平,导致下游炎症因子的级联反应减弱^[32,33]。

该研究仅利用Mer^{-/-}小胶质细胞调查促炎反应。然而,该研究虽阐明Mer在调节促炎和抗炎机制中的作用,但TAM受体参与TLR反应的关键机

制还需要进一步研究。其他敲除受体(如 Tyro3^{-/-}和 Axl^{-/-})可用于确认 TAM 受体在小胶质细胞基础条件下的配体依赖性作用。不过,本研究发现 ProS 在促炎条件下的明显调节作用。

总之,本研究证明了 ProS/Mer 在负向调节原代小鼠小胶质细胞促炎反应中的重要作用,细胞因子表达、小胶质细胞极化和 TLR4 信号下游的变化都证明了这一点。这些发现有助于我们了解各种神经退行性疾病的病理生理学,并有可能为开发新的治疗方法提供信息。

【参考文献】

- [1] Cowan M, Petri WA Jr. Microglia: immune regulators of neurodevelopment[J]. *Front Immunol*, 2018,9:2576.
- [2] Zhou MM, Zhang WY, Li RJ, et al. Anti-inflammatory activity of Khayandirobilide A from *Khaya senegalensis* via NF- κ B, AP-1 and p38 MAPK/Nrf2/HO-1 signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 and BV-2 cells[J]. *Phytomedicine*, 2018,42:152-163.
- [3] Tran V, Lee LP, Cho H. Neuroinflammation in neurodegeneration via microbial infections[J]. *Front Immunol*, 2022,13:907804.
- [4] Xie F, Min S, Chen J, et al. Ulinastatin inhibited sepsis-induced spinal inflammation to alleviate peripheral neuromuscular dysfunction in an experimental rat model of neuromyopathy[J]. *J Neurochem*, 2017,143:225-235.
- [5] Wang YM, Ji R, Chen WW, et al. Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/NF- κ B pathway[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019,13:3391-3404.
- [6] Fourgeaud L, Través PG, Tufail Y, et al. TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology[J]. *Nature*, 2016,532:240-244.
- [7] Tondo G, Perani D, Comi C. TAM receptor pathways at the crossroads of neuroinflammation and neurodegeneration[J]. *Dis Markers*, 2019,2019:2387614.
- [8] Tan X, Zheng Y, Zeng H, et al. Inhibition of Mer exacerbates early brain injury by regulating microglia/macrophage phenotype after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2022,31:106659.
- [9] Healy LM, Perron G, Won SY, et al. MerTK is a functional regulator of myelin phagocytosis by human myeloid cells[J]. *J Immunol*, 2016,196:3375-3384.
- [10] Gilchrist SE, Pennelli GM, Hafizi S. Gas6/TAM signalling negatively regulates inflammatory induction of GM-CSF in mouse brain microglia[J]. *Cells*, 2021,10(12):3281.
- [11] Myers KV, Amend SR, Pienta KJ. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment[J]. *Mol Cancer*, 2019,18:94.
- [12] Kim SY, Lim EJ, Yoon YS, et al. Liver X receptor and STAT1 cooperate downstream of Gas6/Mer to induce anti-inflammatory arginase 2 expression in macrophages[J]. *Sci Rep*, 2016,6:29673.
- [13] Goudarzi S, Gilchrist SE, Hafizi S. Gas6 induces myelination through anti-inflammatory IL-10 and TGF- β upregulation in white matter and glia[J]. *Cells*, 2020,9(8):1779.
- [14] Tamashiro TT, Dalgard CL, Byrnes KR. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue[J]. *J Vis Exp*, 2012,66:e3814.
- [15] Plastira I, Bernhart E, Goeritzer M, et al. 1-Oleyl-lysophosphatidic acid (LPA) promotes polarization of BV-2 and primary murine microglia towards an M1-like phenotype[J]. *J Neuroinflammation*, 2016,13:205.
- [16] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. *Br J Pharmacol*, 2016,173:649-665.
- [17] Lisi L, Ciotti GM, Braun D, et al. Expression of iNOS, CD163 and ARG-1 taken as M1 and M2 markers of microglial polarization in human glioblastoma and the surrounding normal parenchyma[J]. *Neurosci Lett*, 2017,645:106-112.
- [18] Zheng J, Sun Z, Liang F, et al. AdipoRon attenuates neuroinflammation after intracerebral hemorrhage through AdipoR1-AMPK pathway[J]. *Neuroscience*, 2019,412:116-130.
- [19] van der Meer JH, van der Poll T, van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis [J]. *Blood*, 2014,123:2460-2469.
- [20] Tutusaus A, de Gregorio E, Cucarull B, et al. A functional role of GAS6/TAM in nonalcoholic steatohepatitis progression implicates AXL as therapeutic target [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020,9:349-368.
- [21] Nikolakopoulou AM, Montagne A, Kisler K, et al. Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss[J]. *Nat Neurosci*, 2019,22:1089-1098.
- [22] Ma Q, Chen S, Hu Q, et al. NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. *Ann Neurol*, 2014,75:209-219.
- [23] Godinho B, Henninger N, Bouley J, et al. Transvascular delivery of hydrophobically modified siRNAs: gene silencing in the rat brain upon disruption of the blood-brain barrier[J]. *Mol Ther*, 2018,26:2580-2591.
- [24] Batsaikhan B, Wang JY, Scerba MT, et al. Post-Injury neuroprotective effects of the thalidomide analog 3,6'-dithiothalidomide on traumatic brain injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(3):502.
- [25] Zhu HL, Liu ZP, Yang WY, et al. Liraglutide ameliorates β -Amyloid deposits and secondary damage in the ipsilateral thalamus and sensory deficits after focal cerebral infarction in rats [J]. *Front Neurosci*, 2018,12:962.
- [26] Caplan HW, Cox CS, Bedi SS. Do microglia play a role in sex differences in TBI[J]. *J Neurosci Res*, 2017,95:509-517.
- [27] Tong LS, Shao AW, Ou YB, et al. Recombinant Gas6 augments Axl and facilitates immune restoration in an intracerebral hemorrhage mouse model [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017,37:1971-1981.
- [28] Kalakh S, Mouihate A. Androstenediol reduces demyelination-induced axonopathy in the rat corpus callosum: impact on microglial polarization[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017,11:49.
- [29] Wu G, McBride DW, Zhang JH. Axl activation attenuates neuroinflammation by inhibiting the TLR/TRAF/NF- κ B pathway after MCAO in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2018,110:59-67.