基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003540

小胶质细胞膜伪装的纳米粒用于缺血性脑卒中的治疗

成睿琪，张融融，秦新月
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：制备一款由小胶质细胞膜（microglia cell membrane，MiCM）伪装和装载相变材料全氟己烷（perfluorohexane，PFH）的多功能脂质体（liposome，Lipid）纳米粒（MiCM@PFH@Lipid），并研究其基本性质，检测特异性靶向卒中后的损伤部位和实现栓塞部位血管再通的能力。**方法：**采用旋蒸法制备脂质体球载体，通过超声融合法将PFH和MiCM融合至脂质体形成MiCM@PFH@Lipid，透射电镜（transmission electron microscope，TEM）观察纳米粒的形样貌，马尔文粒径分析仪检测纳米粒第1天的粒径分布，和其在第1、3、5、7 d的电位分布，检测其稳定性。Western blot和考马斯亮蓝染色检测MiCM的包被情况，通过2，3，5—三苯基氯化四氮唑（2，3，5-triphenyltetrazolium chloride，TTC）、动物行为学测试检测小鼠脑功能状态。**结果：**表征结果显示，MiCM@PFH@Lipid呈球形，粒径为（234.800 ± 3.143）nm，平均电位为（-33.433 ± 1.550）mV，具有良好的分散性，在7 d内具有较好的稳定性，MiCM成功包被在纳米粒上。小鼠离体荧光结果显示，纳米粒可以快速地在损伤部位蓄积，并且与非靶向组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。动物行为学实验和脑TTC染色结果显示，MiCM@PFH@Lipid纳米粒可以实现血管再通，恢复部分神经功能（$P<0.05$）。病理学检查显示，纳米粒治疗后没有对重要脏器造成明显损伤，而血常规检测与正常对照组并未见明显异常（$P<0.05$）。**结论：**本实验成功制备了多功能纳米粒MiCM@PFH@Lipid，其可以靶向至缺血性卒中后脑损伤区域并破坏血栓，用于缺血性卒中疾病的治疗。

【关键词】脂质体；小胶质细胞膜；全氟己烷；缺血性脑卒中
【中图分类号】R743.3 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-01-18

Microglial cell membrane-camouflaged nanoparticles for the treatment of ischemic stroke

Cheng Ruiqi，Zhang Rongrong，Qin Xinyue
（*Department of Neurology，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To prepare MiCM@PFH@Lipid，a multifunctional liposome（Lipid）nanoparticles camouflaged with microglial cell membrane（MiCM）and loaded with the phase change material Perfluorohexane（PFH），to study its basic properties，and to test its ability to specifically target the site of injury after stroke and to achieve revascularization at the site of thrombus. ***Methods*：**Liposome sphere carriers were prepared by rotary evaporation method. MiCM and PFH were fused with the liposome to form MiCM@PFH@Lipid using the ultrasonic fusion method. Transmission electron microscopy was used to observe the morphology of the nanoparticles. The particle size distribution of nanoparticles at day 1 and their potential distribution at days 1，3，5，and 7 were measured using a Malvern particle size analyzer to detect their stability. Western blot and Coomassie brilliant blue staining were used to detect the encapsulation of nanoparticles with MiCM. The functional state of the mouse brain was detected using brain staining with 2，3，5-triphenyltetrazolium chloride and animal behavior test. ***Results*：**MiCM@PFH@Lipid nanoparticles were spherical in shape，with a particle size of（234.800 ± 3.143）nm and an average potential of（-33.433 ± 1.550）mV. The nanoparticles were well dispersed and stable within 7 days. MiCM was successfully encapsulated on the nanoparticles. Mouse ex vivo fluorescence image showed that the nanoparticles could rapidly accumulate at the site of injury，which was significantly different as compared with the non-targeted group（$P<0.05$）. Animal behavior test and brain staining showed that MiCM@PFH@Lipid nanoparticles could achieve vascular recanalization and partly restore neurological functions（$P<0.05$）. Pathological examination showed that there was no significant damage to important organs after nanoparticle treatment. Routine blood test showed no significant abnormality as compared with the normal control group（$P<0.05$）. ***Conclusion*：**In this study，multifunctional nanoparticles（MiCM@PFH@Lipid）were successfully prepared. These nanoparticles can target the injured brain area after ischemic stroke and destroy thrombus，and thus can be used for the treatment of ischemic stroke.

【Key words】liposome；microglial cell membrane；perfluorohexane；ischemic stroke

作者介绍：成睿琪，Email：Crqi1998@163.com，研究方向：脑血管疾病。
通信作者：秦新月，Email：qinxinyuecqchina@hotmail.com。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240717.0954.006（2024-07-18）

缺血性脑卒中是一类常见的疾病，是全球第二大死因和第三大致残性疾病，严重危害了全球公共卫生健康[1-2]。目前药物溶栓是主要的血管再通治疗方式[3]，然而这些药物存在药物靶向能力差，累计效率低[4]，可能会引发不必要的出血[5]，甚至可能诱发其他的疾病[6]，因此更准确高效地输送药物和新的血管再通方式就显得尤为重要。近些年来，纳米医学因为其无创、便捷、可编辑性，被广泛用于多种疾病的诊断与治疗，这种新方式对脑卒中治疗是有希望的[7]。

脂质体是一种由脂质分子构成的微小囊泡，由于与生物膜相似的结构构成，这有助于脂质体与生物膜相融合，从而在脂质体表面引入生物膜特异性配体，而表面配体的存在有助于实现对特定细胞或组织的靶向传递[8]。此外，由于主要由生物体内天然存在的脂质构成，故具有良好的生物安全性，从而降低了免疫反应的风险[9]。

小胶质细胞是中枢神经系统的免疫细胞，作为“保卫者”可以在疾病发生时做出最迅速的响应[10]。近些年来提出“血管相关小胶质细胞（Vessel-associated microglia，VAM）”的概念，用高表达CX3CR1来描述这一类细胞，并用实验验证了脑血管受损后VAM向损伤部位延伸，介导血脑屏障（blood brain barrier，BBB）关闭，证实了小胶质细胞向脑缺血损伤部位迁移的能力[11-12]。全氟己烷（perfluorohexane，PFH）是一种具有相变能力的液态氟碳，其可以在声波等多种条件的改变下发生“液态-气态”的改变，这种由于形态改变带来的体积变化可以使其破坏血栓，实验证实超声溶栓增加了血管再通的可能性，并且未增加明显的风险[13-14]。

因此，本研究通过小胶质细胞膜（microglia cell membrane，MiCM）靶向，脂质体作为载体，携带PFH，制备纳米粒MiCM@PFH@Lipid。该纳米材料可以通过仿生细胞膜靶向缺血损伤部位，利用PFH声致相变的特性实现血管再通，并通过体内外实验验证其表征、靶向能力、血管再通能力，有希望为缺血性脑卒中的治疗提供一种新方式。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 RE-2000旋转蒸发仪（上海亚荣，中国）；低强度聚焦超声[（low intensity focused ultrasound，LIFU），重庆医科大学超声影像研究所，中国]；电子分析天秤（mettler toledo，瑞士）；ZS90激光粒度分析仪（马尔文公司，英国）；JEM 2100透射电镜（捷欧路科贸有限公司，日本）；酶标仪（Bio-Tek仪器公司，美国）。

1.1.2 试剂 PFH（北京科技有限公司，中国）；二棕榈酰磷脂酰胆碱（1，2-dimpalmiyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine，DPPC，西安瑞禧，中国）；磷脂酰乙醇胺（1，2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy（polyethylene glycol）-2000]，DSPE-PEG2000，西安瑞禧，中国）；胆固醇（西安瑞禧，中国）；三氯甲烷（$CHCl_3$，重庆川东化工，中国）；anti-TMEM119、anti-CX3CR1抗体（三鹰生物技术有限公司，中国）；DIR（AAT Bioquest，美国）。

1.1.3 实验细胞 小鼠小胶质细胞系BV-2细胞来自重庆市神经病学重点实验室。

1.1.4 实验动物 C57小鼠，雄性，6~8周龄，体质量18~25 g，由重庆医科大学实验动物中心饲养，动物饲养及操作均遵循实验动物的3R原则，并获得重庆医科大学动物伦理委员会通过（许可编号：IACUC-CQMU-2023-0144）。

1.2 方法

1.2.1 小胶质细胞膜MiCM提取 将小胶质细胞消化为单细胞悬液，离心提取细胞后使用含有PMSF（1∶100）的NaCl溶液重悬，放入-80 ℃中30 min后取出，于37 ℃下解冻，反复3次得到破碎细胞。在4 ℃下，700 g离心5 min后，收集所得上清液，在15 000 g离心30 min后得到细胞膜MiCM。

1.2.2 MiCM@PFH@Lipid的制备 将DPPC、DSPE-PEG2000、胆固醇按照3∶1∶1的比例称取20 mg加入圆底烧瓶，加入10 mL三氯甲烷至溶解后安装至旋转蒸发瓶，形成乳白色薄膜，旋蒸结束后用4 mL的PBS水化得到脂质体。1 mL脂质体溶液在冰浴条件下与200 μL的PFH进行乳化反应[100 W，6 min（on: 5 s，off: 5 s）]，在4 ℃下，6 000 r/min离心5 min 3次得到PFH@Lipid。随后将提取的MiCM与PFH@Lipid混合，在冰浴条件下超声处理1 min（40 W）[15]，15 000 r/min离心15 min得到MiCM@PFH@Lipid。

1.2.3 MiCM@PFH@Lipid电镜、粒径、电位检测 将MiCM@PFH@Lipid溶解在双蒸馏水中后，使用透射电镜观察其内部结构。采用激光粒度分析仪在25 ℃环境下，对制作第1天的纳米颗粒进行粒径分布检测，对制作第1、3、5、7天的纳米粒进行电位检测。

1.2.4 MiCM@PFH@Lipid表面蛋白分析 采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）SDS-PAGE对MiCM、PFH@Lipid、MiCM@PFH@Lipid进行全蛋白分析。所有样品在14 000 r/min下离心10 min，用蛋白（600 mg/mL）与4X上样缓冲液混合制备，95 ℃加热10 min，将蛋白（10 μL）上样于10%的bis-tris蛋白凝胶上进行考马斯亮

蓝染色。为了进行Western blot分析，将蛋白转移到0.45 μm的PVDF膜上，用anti-TMEM119和anti-CX3CR1的一抗以及HRP偶联的抗小鼠/兔IgG二抗进行处理。

1.2.5 动物模型建立 造模组与干预组均采用小鼠血栓栓塞大脑中动脉脑梗死（embolic middle cerebral artery occlusion，eMCAO）动物模型[16]。首先制作血栓，采集小鼠血液转入PE-50管，试管在室温下保存2 h以凝血，然后在4 ℃下保存22 h。小鼠戊巴比妥（50 mg/kg）麻醉后，显露颈总动脉（common carotid artery，CCA）、颈外动脉（external carotid artery，ECA）和颈内动脉（ICA，internal carotid artery）。将含有血块的改良PE-8导管插入切口，并通过ECA进入ICA的管腔，直到它遇到大脑中动脉（Middle Cerebral Artery，MCA）的起源，在3 min内注射血凝块和生理盐水（10 μL），取出导管。在整个手术过程中，将小鼠置于加热灯下，体温保持在37 ℃。

1.2.6 MiCM@PFH@Lipid体内靶向验证 将eMCAO小鼠分为PFH@Lipid组和MiCM@PFH@Lipid组，经尾静脉注射DIR标记的纳米粒（200 μL，1 mg/mL）。3组小鼠在注射后120 min注射过量戊巴比妥（160 mg/kg）处死，取脑进行离体荧光成像。

1.2.7 小鼠行为学检测与脑TTC染色 实验前根据改良神经功能损害评分（modified neurological severity scores，mNss）评分标准和实验设备说明对小鼠进行转棒测试的训练。训练3 d后，选择训练成功的小鼠进行实验。分为sham组、eMCAO组、PFH@Lipid组和MiCM@PFH@Lipid组，每组3只。eMCAO小鼠造模后，经尾静脉注射不同的药物，在60 min后，以2 W/cm^{2}的强度对小鼠患侧脑部进行LIFU刺激3 min（on: 2s，off: 2s），治疗后第1、7天分别进行mNss评分和行为测试。然后处死小鼠，采集大脑，在-20 ℃冷冻，并解剖成2 mm厚的切片。新鲜脑切片用TTC溶液在37 ℃下染色30 min，4%多聚甲醛浸泡24 h。图像中的梗死区域（白色部分）用Image J软件定量。

1.2.8 小鼠重要器官H&E染色 将MiCM@PFH@Lipid、PFH@Lipid（2 mg/mL，200 μL）和生理盐水经尾静脉注射至正常C57小鼠体内，14 d后取心、肝、脾、肺、肾进行苏木精—伊红染色（hematoxylin and eosin staining，H&E）染色。

1.2.9 小鼠血常规检测 将MiCM@PFH@Lipid（2 mg/mL，200 μL）和生理盐水经尾静脉注射至正常C57小鼠体内，3 d后取小鼠血液进行血常规检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS 22.0（Chicago，Illinois，USA）和GraphPad Prism 7.0（San Diego，CA，USA）进行统计分析。所有数据均以至少3个独立检验的均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。2组间比较采用独立样本t检验。多组数据之间的比较，采用单因素方差分析和Turkey检验法统计。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 MiCM@PFH@Lipid表征

使用旋蒸法成功制备了MiCM@PFH@Lipid纳米粒，透射电镜呈球形（图1A），马尔文粒径分析（图1B）测得MiCM@PFH@Lipid纳米粒的粒径为（234.800±3.143）nm，粒径多分散指数（polymer dispersity index，PDI）为0.330±0.024。如图1C、D所示，MiCM@PFH@Lipid纳米粒在1、3、5、7天内的电位分别为（-33.433±1.550）mV、（-34.267±4.488）mV、（-34.633±2.316）mV、（-34.967±1.704）mV，差异无统计学意义（F=0.169，P=0.914），说明该纳米粒具有良好的稳定性。特异性蛋白（TMEM119、CX3CR1）和考马斯亮蓝显示（图1E、F）PFH@Lipid没有蛋白表达，而MiCM@PFH@Lipid与MiCM有相似的蛋白表达，提示小胶质细胞膜成功转移至PFH@Lipid。

2.2 MiCM@PFH@Lipid的靶向验证

将造模后的小鼠尾静脉注射DIR标记的PFH@Lipid和MiCM@PFH@Lipid纳米粒，2 h后进行离体荧光成像，实验结果证明在造模后小鼠的栓塞区域，纳米粒的聚集明显高于非栓塞区域（图2A、B）。

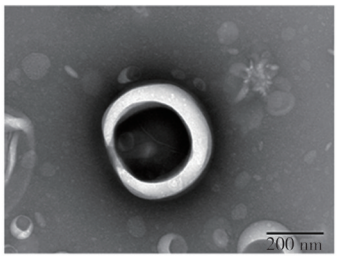
2.3 MiCM@PFH@Lipid的治疗验证

首先验证了纳米粒对小鼠行为的影响：小鼠转棒实验是对小鼠运动平衡能力和疲劳程度的检测实验，mNss评分是对小鼠运动的综合测试[17]。小鼠转棒实验显示[F=5 023，P<0.001]（图3A）MiCM@PFH@Lipid治疗组（120.833±1.976）s与Model组（68.033±3.921）s、PFH@Lipid非靶向组（101.600±2.553）s相比差异均有统计学意义（P<0.001）；mNss行为学评分[F=227.7，P<0.001]（图3B）显示MiCM@PFH@Lipid治疗组（9.000±1.000）s与Model组（17.333±0.577）s相比有明显差异（P<0.001），且与PFH@Lipid非靶向组（12.000±1.000）s也有明显差异（P=0.009）；行为学的结果说明治疗后小鼠的神经运动功能有所恢复。脑组织TTC染色（图3C、D）显示正常小鼠梗死体积为0%，Model组梗死体积为（43.427±9.860）%，纳米粒治疗后梗死面积显著减少，为（10.343±0.425）%，且治疗效果优于非靶向组（17.650±1.176）%。

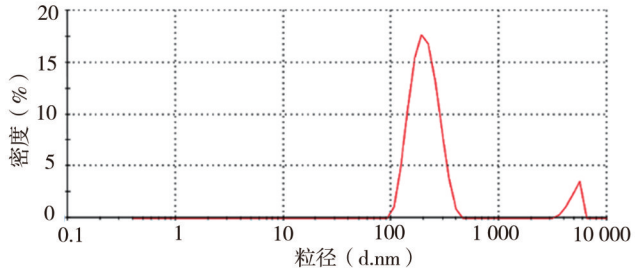
2.4 MiCM@PFH@Lipid生物安全评估

生物安全性对于新的药物以及材料的临床转化具有重要意义。在单次注射MiCM@PFH@Lipid和PFH@Lipid 14 d后，用HE染色（图4A）评估了纳米粒对小鼠不同实质性器官（心脏、肝脏、脾脏、肺、肾）的毒性，可以看到，重要脏器并未出现细胞或组织的损伤、坏死、炎性反应。随后，对正常C57小鼠，在注射纳米粒后3 d后的血液标本进行血常规的检测，结果显示，Sham组与MiCM-NPs组相比，小鼠血液中各细胞的数目没有明显差异（t=2.541，P=0.085），其中，白细胞、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞数目分别为[（4.000±1.587）×10^9/L vs.（5.500±1.229）×10^9/L]（t=1.415，P=0.293）、[（3.267±1.159）×10^9/L vs.（4.167±1.185）×10^9/L]（t=1.199，P=0.353）、[（0.067±0.058）×10^9/L vs.（0.200±0.100）×10^9/L]（t=1.512，

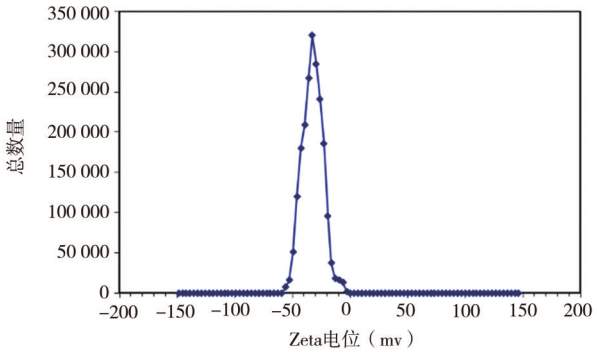
P=0.270）、[（0.667 ± 0.404）×10^9/L vs.（1.133 ± 0.115）×10^9/L]（t=1.575，P=0.256）。此外，各细胞数目比例亦无明显差异（t<0.000 1，P>0.05），其中，淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞比例分别为[（82.633 ± 5.865）% vs.（75.000 ± 6.851）%]（t=1.725，P=0.227）、[（2.100 ± 0.721）% vs.（3.833 ± 0.833）%]（t=2.726，P=0.112）、[（15.267 ± 5.168）% vs.（21.167 ± 6.144）%]（t=1.532，P=0.265），提示纳米粒具有较好的生物安全性（图4B、C）。



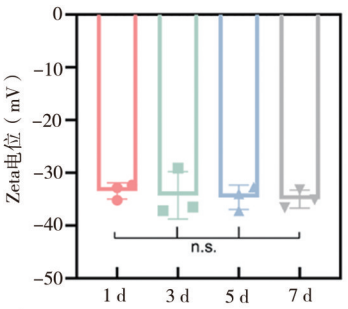
A. MiCM@PFH@Lipid透射电镜



B. MiCM@PFH@Lipid粒径分布图(第1天)

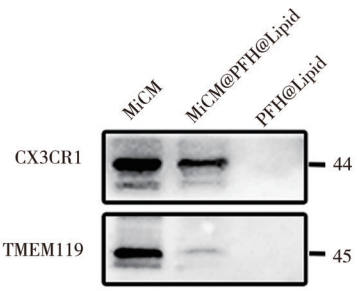


C. MiCM@PFH@Lipid电位分布图(第1天)

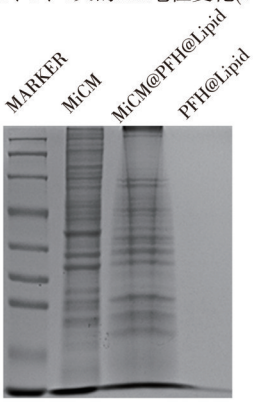


注：n.s，P>0.05

D. 在7 d的稳定性试验中，MiCM@PFH@Lipid在第1、3、5、7天的zeta电位变化($\bar{x} \pm s$, n=3)

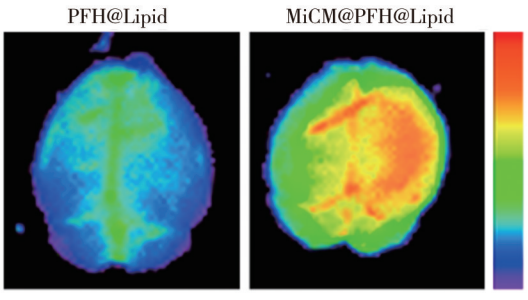


E. MiCM、MiCM@PFH@Lipid和MiCM@PFH@Lipid特征性蛋白 (TMEM119和CX3CR1)

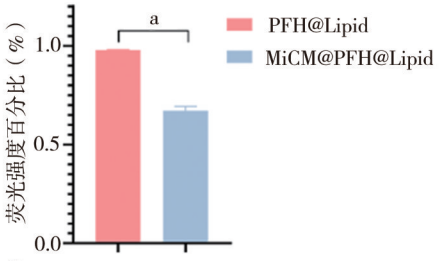


F. MiCM、MiCM@PFH@Lipid和MiCM@PFH@Lipid考马斯亮蓝染色

图1　MiCM@PFH@Lipid表征



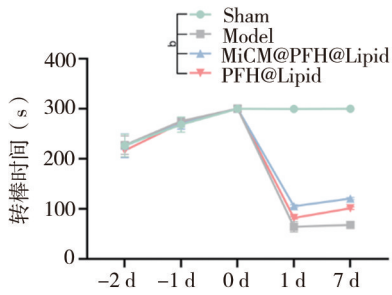
A. 小鼠经尾静脉注射DiR标记注射MiCM@PFH@Lipid和PFH@Lipid的离体荧光图片



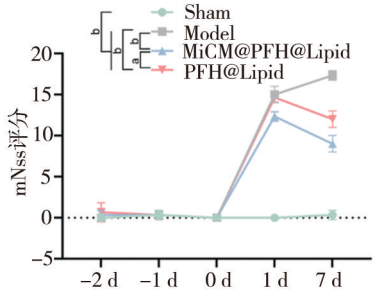
注：a，P<0.001

B. 离体荧光定量 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

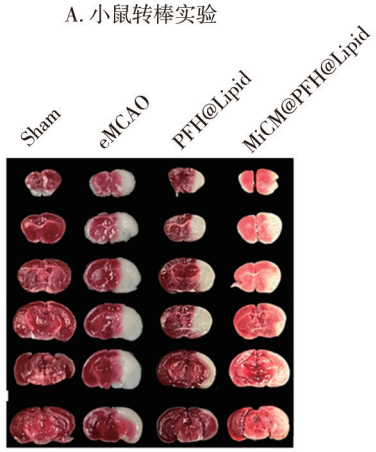
图2　MiCM@PFH@Lipid离体荧光成像



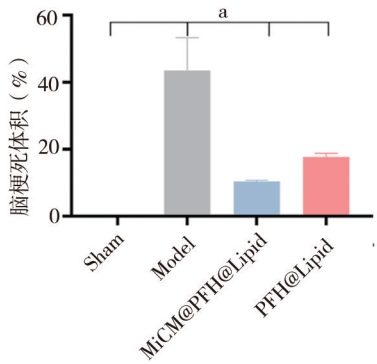
A. 小鼠转棒实验



B. 小鼠mNss行为学评分



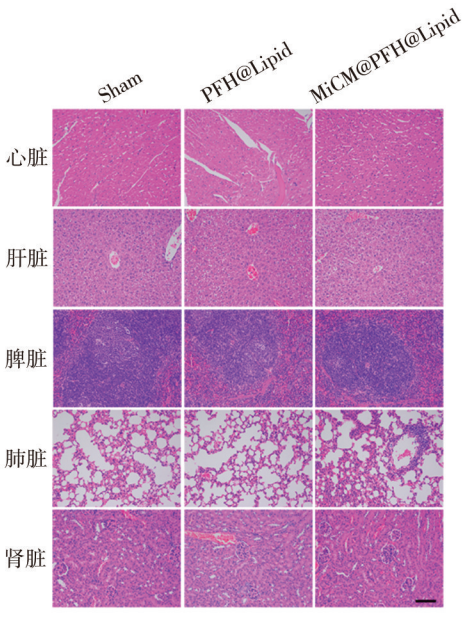
C. 小鼠脑TTC染色，白色代表梗死区域



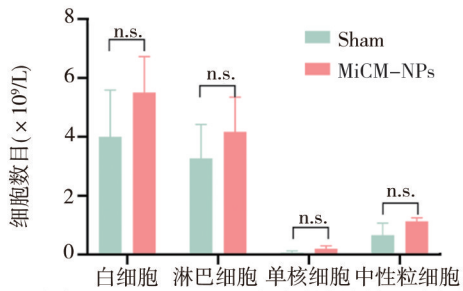
注：a，$P<0.001$

D. 小鼠脑TTC染色定量统计($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

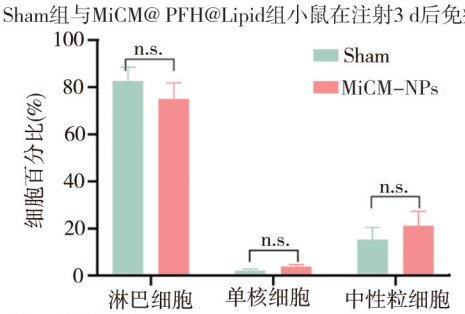
图3　MiCM@PFH@Lipid纳米粒治疗评估



A. 各组小鼠在注射14 d后重要器官
（HE染色，200×，比例尺100 μm）



B. Sham组与MiCM@ PFH@Lipid组小鼠在注射3 d后免疫细胞数目



注：数据显示$\bar{x}\pm s$；n.s，$P>0.05$

C. Sham组与MiCM@ PFH@Lipid组小鼠在注射3 d后细胞百分比

图4　小鼠生物安全性评估

3　讨　论

缺血性脑卒中作为严重危害全球公共卫生健康的疾病之一，目前的治疗方式主要为药物溶栓，但是药物的非特异性会带来出血等不良反应[18]。如今将配体缀合至脂质体表面的方法在生物医学应用进行了广泛的研究，靶向配体可以提高合成的纳米粒至患病组织和细胞的浓度并将其保留在配体在脂质体中的特异性[19]。

本研究通过旋蒸法合成脂质体，利用超声技术装载 PFH 并融合小胶质细胞膜，从而制备了 MiCM@PFH@Lipid 纳米粒。MiCM@PFH@Lipid 纳米粒在透射电镜下呈现球形，其粒径为（234.800 ± 3.143）nm，平均电位为（−33.433 ± 1.550）mV，并具有良好的分散性。同时，MiCM@PFH@Lipid 与小胶质细胞膜具有相似的膜蛋白表达，其中 CX3CR1 是小胶质细胞膜发挥迁移的重要表面蛋白[20]，这使得纳米粒可以快速的靶向缺血损伤病灶区域，离体荧光实验证明包裹有小胶质细胞膜的纳米粒可以快速提高缺血部位的药物浓度。

本研究制备的纳米粒同时装载了相变材料 PFH，其“液态-气态”相变的能力可以机械破坏血栓，实现血管再通。在动物实验中设置了对照组和干预组，小鼠行为学和脑 TTC 染色作为治疗评估标准。实验中发现，2 组干预组较对照组具有明显的差异，在干预组中 MiCM@PFH@Lipid 靶向组较 PFH@Lipid 非靶向组具有更好的行为学结果和更小的 TTC 梗死面积。

生物安全性对于新药物的研究具有重要意义，在本研究中观察了 PFH@Lipid 与 MiCM@PFH@Lipid 2 种纳米粒对重要器官的影响，实验结果表明 2 种纳米粒对小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏没有明显的损伤。

本研究证实了 MiCM@PFH@Lipid 纳米粒中小胶质细胞膜靶向缺血性脑卒中病灶和超声 PFH 血管再通的能力，这对于脑卒中治疗研究具有重要的意义。此外，小胶质细胞与中枢神经系统多种细胞的联系或许可以成为“分级靶向”、从而实现“精准释药”的可能。目前缺血性脑卒中治疗提倡血管再通后快速地给予神经保护治疗[21]，而脂质体作为一种载体或许可以实现血管再通与装载神经保护药物相结合，这为脑卒中治疗提供新策略。

参 考 文 献

[1] Ding QQ, Liu SW, Yao YD, et al. Global, regional, and national burden of ischemic stroke, 1990-2019[J]. Neurology, 2022, 98(3): e279-e290.

[2] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Neurol, 2021, 20(10): 795-820.

[3] Jahan R, Saver JL, Schwamm LH, et al. Association between time to treatment with endovascular reperfusion therapy and outcomes in patients with acute ischemic stroke treated in clinical practice[J]. JAMA, 2019, 322(3): 252-263.

[4] Rajendran R, Kunnil A, Radhakrishnan A, et al. Current trends and future perspectives for enhanced drug delivery to central nervous system in treatment of stroke[J]. Ther Deliv, 2023, 14(1): 61-85.

[5] Huang Y, Li M, Li JY, et al. The efficacy and adverse reaction of bleeding of clopidogrel plus aspirin as compared to aspirin alone after stroke or TIA: a systematic review[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65754.

[6] Crispo JAG, Thibault DP, Fortin Y, et al. Association between medication-related adverse events and non-elective readmission in acute ischemic stroke[J]. BMC Neurol, 2018, 18(1): 192.

[7] Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, et al. Neuronanomedicine: an up-to-date overview[J]. Pharmaceutics, 2019, 11(3): 101.

[8] Sych T, Levental KR, Sezgin E. Lipid-protein interactions in plasma membrane organization and function[J]. Annu Rev Biophys, 2022, 51: 135-156.

[9] Go YK, Leal C. Polymer-lipid hybrid materials[J]. Chem Rev, 2021, 121(22): 13996-14030.

[10] Qin C, Zhou LQ, Ma XT, et al. Dual functions of microglia in ischemic stroke[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(5): 921-933.

[11] Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(12): 1512-1519.

[12] Lou NH, Takano T, Pei Y, et al. Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(4): 1074-1079.

[13] Zhong YX, Zhang Y, Xu J, et al. Low-intensity focused ultrasound-responsive phase-transitional nanoparticles for thrombolysis without vascular damage: a synergistic nonpharmaceutical strategy[J]. ACS Nano, 2019, 13(3): 3387-3403.

[14] Ricci S, Dinia L, Del Sette M, et al. Sonothrombolysis for acute ischaemic stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 10: CD008348.

[15] Wu HH, Jiang XC, Li YS, et al. Engineering stem cell derived biomimetic vesicles for versatility and effective targeted delivery[J]. Adv Funct Materials, 2020, 30(49): 2006169.

[16] Jin R, Zhu XL, Li GH. Embolic middle cerebral artery occlusion (MCAO) for ischemic stroke with homologous blood clots in rats[J]. J Vis Exp, 2014(91): 51956.

[17] Ruan JS, Yao Y. Behavioral tests in rodent models of stroke[J]. Brain Hemorrhages, 2020, 1(4): 171-184.

[18] Nisar T, Hanumanthu R, Khandelwal P. Symptomatic intracerebral hemorrhage after intravenous thrombolysis: predictive factors and validation of prediction models[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28(11): 104360.

[19] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery[J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 286.

[20] Camacho-Hernández NP, Peña-Ortega F. Fractalkine/CX3CR1-dependent modulation of synaptic and network plasticity in health and disease[J]. Neural Plast, 2023, 2023: 4637073.

[21] Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies[J]. Exp Neurol, 2021, 335: 113518.

（责任编辑：曾 玲）