



工程化转化生长因子 β 1仿生血小板 纳米颗粒靶向治疗缺血性脑卒中*

陈丽琦^{1,2)} 亢天放^{1,2)} 黄国俊¹⁾ 尹婷¹⁾ 马爱青^{1)**} 蔡林涛^{1,2)**} 潘宏^{1,2)**}

(¹⁾ 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 518055; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 **目的** 缺血性脑卒中后, 急性炎症反应和持续性免疫微环境失衡会加剧神经损伤, 严重限制神经功能恢复。针对这一关键病理过程, 本研究旨在构建并系统评价一种兼具病灶靶向递送与免疫微环境重塑功能的仿生纳米体系——转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 工程化血小板膜包被脂质纳米颗粒 (PLP)。通过验证其在缺血病灶中的精准富集、炎症调控及神经保护作用, 解决缺血性脑卒中治疗中“如何实现病灶定向、免疫调节与神经功能恢复的协同一体化干预”这一关键科学问题。**方法** 采用动态光散射、zeta电位分析和透射电子显微镜技术, 表征了PLP的物理化学特性, 包括流体动力学粒径、zeta电位、结构稳定性和形态。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 对PLP与天然血小板膜的蛋白质谱进行比较分析, 证实PLP保留了来源于血小板膜的黏附和免疫调节蛋白。在体外利用脂多糖 (LPS) 诱导的M1型分化的RAW264.7巨噬细胞评估炎症调节能力; 采用氧糖剥夺/再灌注 (OGD/R) 诱导的BV2小胶质细胞及SH-SY5Y神经元细胞研究神经炎症调控与神经元保护作用。建立小鼠短暂性大脑中动脉闭塞 (tMCAO) 模型以模拟脑缺血-再灌注损伤, 通过活体荧光成像监测PLP在脑内的时空分布, 并结合2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 染色、神经胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫荧光以及体重变化和神经功能缺损评分 (NSS), 综合评估PLP的脑靶向富集能力、炎症与胶质反应调控作用以及对神经功能的改善效果。**结果** PLP为粒径均一、形貌规整且表面带负电的稳定纳米颗粒, 并成功保留多种血小板膜黏附与免疫调节相关蛋白, 显示出良好的仿生特性, 并通过OGD/R诱导BV2细胞评估了最佳给药浓度。PLP能够在体外显著抑制RAW264.7细胞向M1促炎表型极化, 并使缺氧/复氧条件下神经元凋亡减少。在tMCAO小鼠中, PLP可在给药早期靶向富集于缺血半球, 并在7 d内维持高水平脑内滞留。与对照组相比, PLP治疗显著减轻脑梗死范围, 降低星形胶质细胞的激活程度, 并促进神经功能评分恢复。**结论** 本研究构建了一种基于血小板膜仿生修饰的TGF- β 1递送纳米平台, 实现了“血小板膜-缺血内皮黏附分子”介导的主动靶向与TGF- β 1的免疫调节、抑制炎症、抗氧化和神经保护作用的有机整合。PLP不仅能快速定向归巢和长效滞留于脑缺血区域, 还能通过抑制炎症性细胞活化、减轻神经元凋亡和限制星形胶质细胞过度激活, 从而从多层次协同调控脑卒中后的炎症微环境, 显著降低组织损伤并改善行为学功能。研究表明, 利用血小板膜仿生技术实现“缺血灶靶向+免疫调控”的联合干预策略具有明显的逆转炎症微环境和改善神经功能的效果, 为开发兼具靶向与免疫调节能力的新型脑卒中干预方案提供了坚实的实验基础。

关键词 缺血性脑卒中, 血小板膜仿生纳米颗粒, 转化生长因子 β 1, 脑靶向递送, 免疫微环境调控

中图分类号 Q819, R743.3

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0541

CSTR: 32369.14.pibb.20250541

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 是全球范围内致残率和病死率最高的脑血管疾病之一, 给患者及卫生体系带来沉重且持续的疾病负担^[1-2]。尽管静脉溶栓和机械取栓等血管再通疗法已显著改善了IS急性期患者预后^[3-4], 但血流恢复过程中往往诱发严重的脑缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤^[5-6], 伴随持续神经炎症^[7-9]、氧化应激^[10]和血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 破坏^[11-13]等病理改变, 进而导致大量炎性细胞浸润

与小胶质细胞/巨噬细胞的促炎极化^[14-15], 最终加剧迟发性神经元死亡, 引发长期功能障碍。因此,

* 国家自然科学基金 (92581114), 深圳市医学研究专项 (A2303057), 国家重点研发计划 (2023YFA0915400), 广东省自然科学基金 (2024A1515010825) 和广东省科技计划 (粤港澳联合实验室) (2025B1212150002) 资助。

** 通讯联系人。

潘宏 Tel: 0755-86585204, E-mail: hong.pan@siat.ac.cn

蔡林涛 Tel: 0755-86392210, E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

马爱青 Tel: 0769-22896322, E-mail: aqma@gdmu.edu.cn

收稿日期: 2025-12-09, 接受日期: 2026-02-06

在IS的治疗中,再灌注后炎症微环境的重塑仍是亟待解决的关键挑战。然而,常规药物难以实现对缺血病灶的精准靶向递送及长效滞留,严重限制了患者长期预后的康复进程。基于此,开发一种兼具病灶靶向递送与免疫微环境调控功能的新型治疗系统,已成为突破当前治疗困境的迫切需求。

转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 是一类具有多效性免疫与组织修复调控功能的细胞因子,可通过抑制促炎细胞因子释放^[16]、诱导免疫细胞向抗炎/修复表型极化以及缓解缺血后过度自噬等多途径发挥神经保护和微环境稳态维持作用^[17]。然而,游离TGF- $\beta 1$ 静脉给药存在体内半衰期短、血药浓度波动大及缺乏病灶特异性富集等局限,使其临床转化受到显著制约^[18]。受天然生物系统的启发,近年兴起的细胞膜仿生策略通过模拟内源性细胞的结构与功能^[19-21],为解决上述问题提供了新的技术路径。将血小板膜完整包覆于纳米载体表面,赋予了人工合成材料天然的生物伪装。大量研究证实,血小板膜表面高表达的P选择素(P-selectin)、糖蛋白Ib血小板亚基 α (platelet glycoprotein Ib alpha chain precursor, GPIb α)及整合素(integrin,如 α Ib β 3)等生物分子,能与缺血部位的血管内皮上特异性上调的配体,如P选择素糖蛋白配体1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)及细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)发生高亲和力结合^[22-23]。且血小板在体内半衰期约为30 h,其较长的循环时间部分源于血小板表面表达的整合素相关蛋白(CD47)。CD47作为一种自身标志物,能与免疫细胞表面的信号调节蛋白 α (signal regulatory protein α , SIRP α)发生相互作用,进而抑制自身被免疫系统清除^[24]。这种天然的仿生策略不仅赋予了纳米载体逃避单核吞噬系统清除的能力,更使其具备了向缺血病灶主动靶向的特性,从而显著延长体内循环时间并实现对微环境的精准靶向富集^[25-27]。

鉴于缺血区域药物递送的困难以及炎症微环境的复杂性,本研究构建了血小板膜修饰的TGF- $\beta 1$ 负载脂质纳米粒子(platelet membrane-camouflaged lipid nanoparticles, PLP)。该仿生纳米平台利用血小板膜对受损脑内皮和暴露基质的天然黏附特性,实现对脑缺血灶的主动靶向,同时整合了TGF- $\beta 1$ 的免疫微环境重塑功能,从而减轻脑

组织损伤并促进神经功能恢复。本研究通过M1型巨噬细胞极化模型和BV2、SH-SY5Y氧糖剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)损伤模型系统评估了PLP的免疫调节与神经保护效果,并在小鼠短暂性大脑中动脉阻塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型中验证了其对脑灌注恢复、梗死体积、胶质细胞激活和神经行为学表现的改善作用。结果显示,PLP给药显著缓解了IS损伤,促进了缺血部位血流恢复,并提升了小鼠的神经功能。该策略突破了传统药物在脑卒中治疗中靶向性不足和微环境调控能力的局限,为开发兼具精准递送与免疫重塑功能的新型脑卒中治疗药物提供了可行的技术路径与重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的血小板膜提取物来自同源动物血源并经标准化处理以保持膜结构完整性与膜蛋白活性。实验所用培养基、血清、抗体、染色试剂以及相关缓冲液等均遵循各自厂家说明书的标准操作程序,并在文献中对关键参数提供对照。所有动物实验均按照中国科学院深圳先进技术研究院实验动物伦理委员会批准的伦理准则(YSB-20250624-PH-A4091)进行。脂质材料、膜片来源及生物活性因子等来源如下。

TGF- $\beta 1$ 细胞因子购自MedChem Express (Monmouth Junction, NJ, USA); 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC),胆固醇(cholesterol),磷脂-聚乙二醇(DSPE-PEG), 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); SPF级C57BL/6小鼠,6~8周龄,购自拓普生物科技有限公司;小鼠CD86抗体,CD11b抗体,AnnexinV/PI细胞凋亡检测试剂盒购自BioLegend (San Diego, CA, USA); DiR膜染料购自上海碧云天生物技术股份有限公司(中国); GFAP抗体购自Proteintech (中国); 磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM培养基、无糖DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素溶液等购自GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)。

1.2 PLP的制备与表征

取小鼠全血,100g离心20 min,分离出富血小板血浆;再以相同离心条件处理,获得血小板沉

淀, 弃去上清液后用 1 mmol/L EDTA PBS 重悬, -80°C 冷冻后室温解冻, 重复 3 次, 随后以 4 000g 离心 3 min 回收血小板膜沉淀。膜沉淀重悬于去离子水中, 置于带盖玻璃瓶中, 使用超声仪 (42 kHz, 100 W) 超声处理 5 min 以获得膜片段。脂质载体方面, 将 3 种脂质按摩尔比溶于氯仿, 旋蒸并真空干燥 4 h, 形成干燥脂质膜; 再加入 2 ml PBS 分散脂质膜, 65°C 水浴下使膜脱落并形成乳白悬浊液, 随后超声分散并进行冻融 5 次以提高分散均匀性。将 TGF- $\beta 1$ 与血小板膜提取物混合, 表征时加入 DiR 染料, 转入脂质体挤出器, 按 200 nm/100 nm 的孔径连续挤压各 10 次, 获得粒径均一、表面修饰血小板膜的 PLP 纳米粒子, 超滤洗去多余染料, 4°C 避光储存。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 鉴定关键膜蛋白, 使用马尔文粒径仪测量 PLP 的粒径分布、zeta 电位, 使用扫描电子显微镜观察 PLP 的微观形貌。采用透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察 PLP 的微观形貌, 样品滴在铜网上经室温通风干燥后成像。体外释放实验采用离心法: 取 PLP 溶液 (含 10 g/L PLP, 1 mg/L TGF- $\beta 1$) 置于离心管中, 于 37°C 恒温培养。在预定时间点 (1、2、4、8、12、24、48、72 h) 离心取样并补充新鲜介质, 通过酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒测定释放介质中的 TGF- $\beta 1$ 浓度。

1.3 体外细胞实验模型

1.3.1 M1型小胶质细胞极化模型

为模拟缺血再灌注引发的神经炎症微环境并筛选 PLP 的最佳给药浓度, 本研究采用 OGD/R 方法诱导 BV2 细胞活化。将对数生长期的 BV2 细胞以适宜密度接种于 24 孔板, 待细胞贴壁后, 弃去原有培养基, PBS 洗涤 1 次, 更换为无糖 DMEM 培养基, 置于三气培养箱 ($0.1\% \text{O}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $94\% \text{N}_2$) 中进行 OGD 处理 4 h。缺氧结束后, 取出细胞, 更换为含不同浓度 PLP (5、10、20 mg/L) 的完全培养基, 置于常规细胞培养箱中复氧培养 24 h。处理结束后收集细胞, 孵育荧光标记的 CD86 抗体, 通过流式细胞术检测 CD86 阳性细胞比例, 以评估 M1 型小胶质细胞的极化水平及 PLP 的量效关系。

1.3.2 M1型巨噬细胞极化模型

取对数生长期的鼠单核巨噬细胞 RAW264.7

细胞系, 以 5×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔细胞培养板, 置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中孵育 24 h, 待细胞融合度达 70%~80% 后进行诱导。弃去原有培养基, 每孔加入 1 ml 含脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS, 终浓度 100 $\mu\text{g/L}$, Sigma-Aldrich) 的新鲜 DMEM 培养基, 继续置于相同培养条件下孵育 24 h, 诱导 RAW264.7 细胞向 M1 型巨噬细胞极化。诱导结束后, 通过流式细胞术验证诱导效果: 弃去培养基, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, F4/80, CD11b, CD86 染色测量 M1 型极化率。将 PLP 以 10 mg/L 的终浓度加入到培养基中, 与细胞共孵育 24 h。

1.3.3 SH-SY5Y细胞OGD/R模型

选用人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 构建模型。取对数生长期细胞, 以 2×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 每孔 1 ml 培养基, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 孵育 24 h 至融合度 70%~80%。每孔加 1 ml 无糖 DMEM, 转移至 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $0.1\% \text{O}_2$ 厌氧培养箱, OGD 处理 4 h, 其间监测气体浓度。OGD 结束后, 弃无糖培养基, 预温正常培养基洗 2 次, 每孔加 1 ml 新鲜正常培养基, 常氧培养箱再灌注 24 h。于 OGD/R 处理结束后立即进行细胞干预, 此时神经元处于缺血再灌注损伤后修复关键期, 可更精准评估 PLP 的修复作用。将 PLP 以 10 mg/L 的终浓度加入到培养基中, 与细胞共孵育 24 h。收集各组 SH-SY5Y 细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法, 按试剂盒说明书处理后, 流式细胞仪检测凋亡细胞比例, 分析 PLP 对 OGD/R 神经元凋亡的抑制作用。

1.4 小鼠脑缺血-再灌注 (tMCAO) 模型建立

小鼠经异氟烷气体麻醉后, 仰卧固定于手术台, 颈部备皮消毒; 沿颈部正中线切开皮肤, 分离右侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA)、颈外动脉 (external carotid artery, ECA) 与颈内动脉 (internal carotid artery, ICA); 结扎 ECA 远心端, 在 CCA 近心端放置动脉夹, 于 CCA 分叉处剪一小口, 插入带硅胶涂层的尼龙线栓, 缓慢推进至 ICA 颅内段; 缺血 1 h 后拔除线栓实现再灌注, 构建 tMCAO 模型。缝合皮肤, 待小鼠苏醒后常规饲养。通过术后 2 h 神经功能缺损评分 (神经功能评分 (neurological severity score, NSS) 评分) 验证模型构建成功。

1.5 体内治疗效果的评估

在治疗后第 3 天处死小鼠, 快速断头取脑。用脑组织切片模具将大脑冠状切成 5 片 (每片厚度约

2 mm); 将脑片放入含 0.5% TTC 生理盐水溶液的培养皿中, 37°C 恒温孵育 10 min (避光), 其间轻轻翻动脑片确保染色均匀; 染色结束后, 用 4% 多聚甲醛固定 20 min。

取整个脑组织置于 4% 多聚甲醛固定液中, 4°C 固定 24 h, 转入含 30% 蔗糖的溶液, 在 4°C 避光浸泡 48~72 h 逐级脱水。脱水完成后将脑组织取出, 嵌入 OCT 包埋剂, -80°C 快速冷冻 30 min, 随后在切片机上切制 10 μ m 冠状切片, 贴附于多聚赖氨酸涂覆的载玻片上。PBS 洗涤后, 以 5% BSA+0.3% Triton X-100 的封闭液封闭 1 h。以封闭液稀释 (1:500) 的一抗在 4°C 避光孵育过夜, 次日用 PBS 洗涤 3 次后, 室温孵育荧光二抗 (1:500, PBS 稀释) 1 h。最后用含 DAPI 防猝灭剂进行核染色并封片后, 在荧光显微镜下观察。

1.6 实验重复性与统计学分析

采用 GraphPad Prism 与 Origin 软件进行数据处理, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PLP 的理化性质、稳定性与释放特征

血小板膜蛋白修饰可赋予纳米颗粒识别并黏附 IS 病灶血管内皮的能力, 其受损血管结合效率在很大程度上取决于血小板膜蛋白在载体表面的融合程度^[28]。本研究采用薄膜水化-挤出联合工艺制备血小板膜包被的 TGF- β 1 脂质纳米颗粒, 并通过 SDS-PAGE 分离不同分子质量的血小板膜蛋白, 检测整合素相关蛋白 CD47、衰变加速因子 CD55、补体膜攻击复合物抑制因子 CD59, 整合素 α IIb、 α 2、 α 5、 α 6、 β 1、 β 3 以及糖蛋白 Ib (platelet glycoprotein Ib alpha chain precursor, GPIb α)、血小板糖蛋白 IV、V、VI、X (platelet glycoprotein, GPIV、GPV、GPVI、GPIX)、C 型凝集素样受体 2 (C-type lectin-like receptor 2, CLEC-2) 等关键膜蛋白在 PLP 上的保留情况。结果显示, PLP 与天然血小板膜在膜蛋白谱上高度一致 (图 1a), 说明血小板膜已完整转位并包覆于纳米载体表面。使用动态光散射法测量 PLP 在 PBS 缓冲液体系中的尺寸, 结果显示, PLP 流体动力学直径约为 190 nm, 粒径分布相对集中且处于 50~200 nm 的常用纳米载体范围内 (图 1b), 该尺寸有助于延长循环时间、降低网状内皮系统清除率, 并能促进纳米颗粒在病变组织中

的富集, 从而有利于后续的体内递送与组织渗透^[29]。zeta 电位分析结果显示, PLP 带有约为 -21.83 mV 的表面负电荷 (图 1c), 可有效抑制颗粒间聚集, 有利于在水相体系中维持较好的胶体稳定性^[30]。扫描电子显微镜结果 (图 1d) 进一步证实, PLP 呈均一球球形貌, 其粒径与动态光散射 (dynamic light scattering, DLS) 测定的结果一致, 表明所构建的纳米体系具有良好的形貌稳定性与结构可控性。

进一步利用 TEM 观察了不同纳米颗粒的形貌 (图 1e), 制备的空白脂质纳米粒子 (lipid nanoparticles, LP) 与 PLP 均呈均匀的圆形。与未包覆膜的纳米颗粒 LP (粒径 (158.33 $\pm$ 18.91) nm, 图 1f) 相比, 包覆后的 PLP 直径略有增加, 为 (172.17 $\pm$ 11.29) nm, 证实了包覆的成功。值得注意的是, DLS 测得的 PLP 平均粒径 (约 190 nm) 略大于 TEM 统计得出的粒径结果。这可能是由于 DLS 测定包含水化层及表面蛋白的流体动力学直径, 而 TEM 干燥制样使颗粒收缩。数据均合理反映了 PLP 在不同状态下的结构特征^[31]。考虑到缺血脑组织通常伴随缺氧导致的微酸性环境^[32-33], 在 pH 6.7 的条件下, 体外研究了 PLP 纳米颗粒中 TGF- β 1 的释放曲线。72 h 内, PLP 中 TGF- β 1 的累积释放量约为 74% (图 1g), 表明 PLP 能够在缺血病灶处实现有效的药物释放。另外, 通过将 PLP 置于含有 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 监测了 PLP 在生理条件下长达 72 h 的粒径与多分散系数 (polydispersity index, PDI) 变化。如图 1h 所示, 在 72 h 内仅观察到粒径和 PDI 的轻微波动, 未出现明显的聚集或沉淀现象, 说明 PLP 在血液循环中具有稳定性。

2.2 PLP 的体外疗效

2.2.1 PLP 对 M1 型小胶质细胞的调控作用

小胶质细胞是中枢神经系统的主要免疫效应细胞, TGF- β 1 在此类细胞中的主要功能是调节免疫极化及维持细胞存活。已有研究明确指出, 在 OGD 环境下, 低浓度 (0.5~5 μ g/L) 不足以显著增强原代小胶质细胞的抵抗力, 而 10 μ g/L TGF- β 1 则能显著地保护细胞活力, 且有效减少脂滴积累, 促进抗炎表型转化^[34]。我们设置了 PLP 浓度梯度 (5、10、20 mg/L, 等效 5、10、20 μ g/L TGF- β 1), 处理 OGD/R 后的 BV2 细胞。流式细胞术结果显示, PLP 对 M1 型 BV2 的抑制作用呈现明显的剂量依赖性 (图 2)。当浓度达到 10 mg/L 时, PLP 表现出显

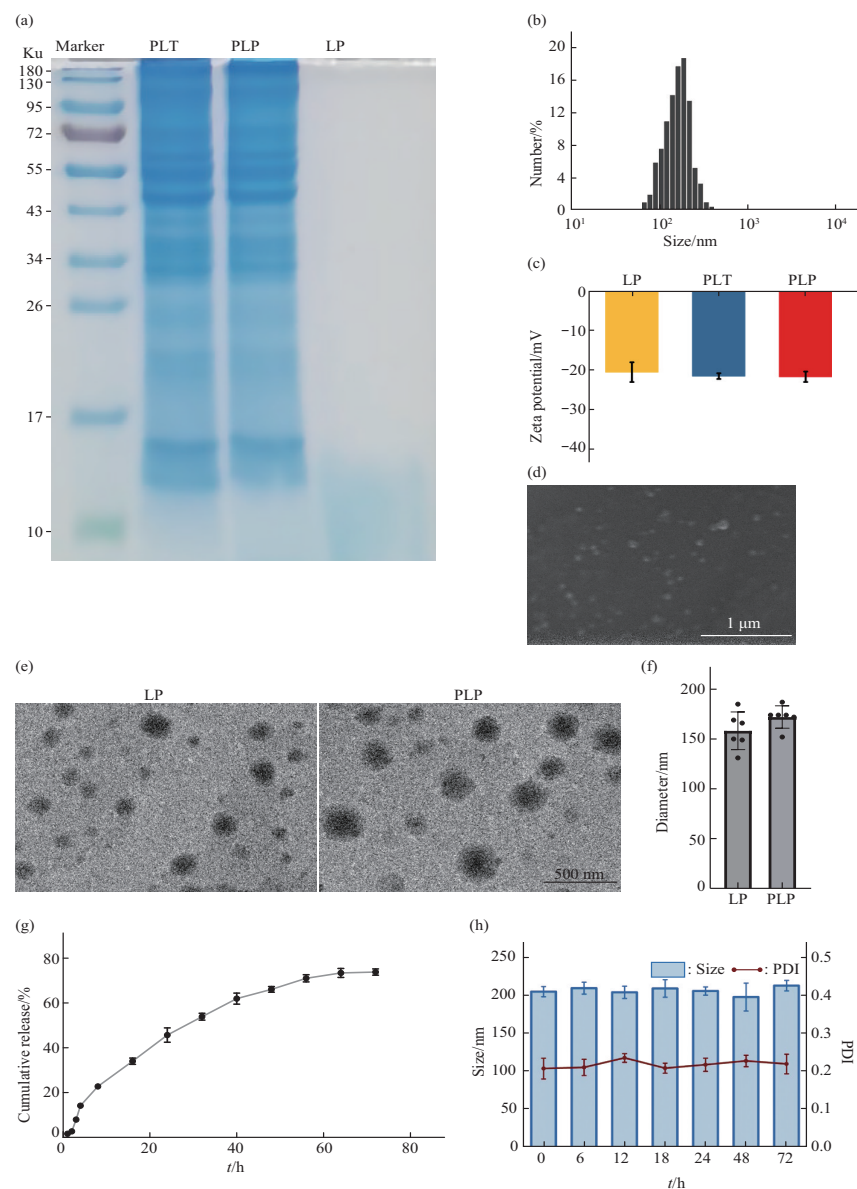


Fig. 1 Characterization of platelet membrane-camouflaged lipid nanoparticles (PLP)

(a) SDS-PAGE bands showing that key platelet membrane proteins are retained on PLP compared with native platelet membrane. (b) Size distribution of PLP determined by DLS, indicating a mean hydrodynamic diameter of around 190 nm. (c) Zeta potential of PLP showing a negative surface charge consistent with good colloidal stability. (d) SEM images demonstrating that PLP exhibits a uniform spherical morphology at the nanoscale. (e) TEM images of LP and PLP indicating the successful preparation of PLP. (f) Quantification of diameters of LP and PLP. (g) *In vitro* release profiles of TGF-β1 from PLP in PBS at pH 6.7. (h) Stability of PLP in physiological conditions (DMEM+10% FBS) characterized by size and PDI changes over 72 h.

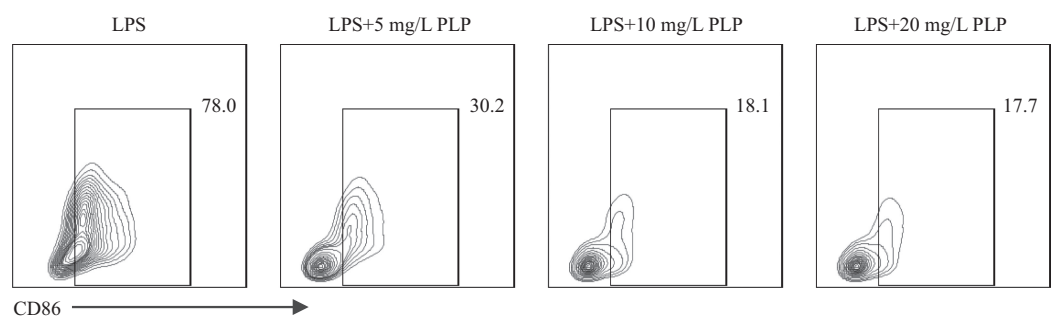


Fig. 2 The concentration of 10 mg/L PLP can significantly mitigate OGD/R-induced BV2 M1 cell ratio

著且接近平台期的抗炎效果。因此,以10 mg/L为平衡疗效与安全性的最佳治疗浓度。

2.2.2 PLP调控巨噬细胞极化并调控免疫稳态

IS发生后,单核巨噬细胞会向病灶聚集并转化为M1促炎表型^[35-36],阻碍组织修复并加速炎症进程。有证据表明,TGF- β 1可以影响巨噬细胞的表型转化^[37-39]。为探讨PLP对体外诱导的M1型极化巨噬细胞的调节作用,本研究采用LPS诱导M0型RAW264.7细胞向M1表型转化,并通过流式细胞术检测巨噬细胞CD86与CD11b双阳性细胞比例,评估PLP在巨噬细胞表型转化中发挥的作用。结果

显示,未经刺激的RAW264.7细胞中,CD86⁺CD11b⁺细胞比例23.3% (图3a),代表M0型巨噬细胞的基线水平经100 μ g/L LPS刺激24 h后,M1型极化显著增强,LPS组的阳性细胞比例上升至50.0%,表明成功地构建了巨噬细胞M1型极化模型。与经诱导的LPS组相比,PLP干预后CD86⁺CD11b⁺细胞比例降低至34.8%,较阳性对照组下降约30%,表明其具有显著的抑炎作用并有助于恢复免疫稳态。该结果证实,PLP可有效抑制M1型巨噬细胞过度极化,为在IS治疗中缓解神经炎症提供了细胞学依据。

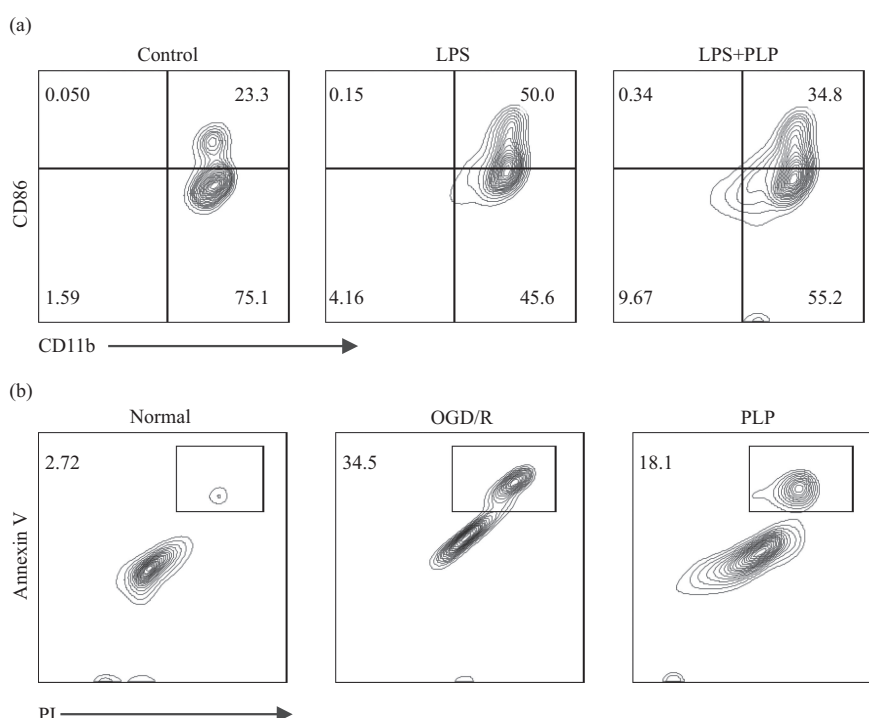


Fig. 3 *In vitro* anti-inflammatory and neuroprotective effects of PLP

(a) PLP significantly reduces the percentage of CD86⁺CD11b⁺ M1 macrophages compared with LPS-induced M1 controls. (b) PLP markedly decreases OGD/R-induced apoptosis of SH-SY5Y cells compared with the OGD/R group, while the Normal group shows minimal baseline apoptosis.

2.2.3 PLP减少OGD/R诱导的SH-SY5Y细胞凋亡并缓解缺血再灌注样损伤

缺血再灌注后,神经元经历能量代谢崩溃、线粒体功能障碍和离子稳态紊乱,再灌注阶段还伴随活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 暴增及程序性细胞死亡通路的持续激活^[40]。为进一步探讨PLP如何调控脑卒中微环境,本研究构建OGD/R处理的SH-SY5Y细胞模型^[41],模拟缺血再灌注损伤,研究在缺氧和复氧条件下的药物作用机制。采用Annexin V/PI双染流式细胞术评估细胞凋亡水平。结果表明,正常组 (Normal) 细胞凋亡率处

于较低的基线水平,仅为2.72%,表明细胞在正常培养体系下保持良好的存活状态 (图3b)。与对照组相比,OGD/R模型组凋亡率显著升至34.5%,这种差异表明该模型可稳定诱导缺血-再灌注相关损伤。在此基础上,PLP干预将凋亡率降低至18.1%,仅为OGD/R组的52%,流式图中凋亡细胞群体比例明显缩小,表明PLP对OGD/R诱导的神经元凋亡具有显著保护作用。

2.3 PLP的体内疗效

2.3.1 PLP的脑缺血灶靶向与长效滞留

为进一步验证血小板膜修饰是否赋予纳米载体

缺血灶靶向能力, 本研究采用体内荧光成像动态监测 PLP 与未修饰脂质纳米粒子 (LP) 在 tMCAO 小鼠体内的时空分布。如图 4a 所示, 给药后 0.5 h, PLP 组小鼠头部即出现清晰的荧光信号, 而 LP 组仅见较弱且分布弥散的颅部荧光, 证明血小板膜包被使纳米载体在早期即靶向富集于缺血脑区。随着时间推移 (6~12 h), PLP 组头部荧光信号强度进一步升高并达到峰值, 荧光信号主要集中分布于缺血侧脑区, 边界清晰; 而 LP 组虽仍可见颅部信号, 但强度明显较低且定位不够集中。在 2~4 d 乃至 3~6 d 的观察窗口内, PLP 组缺血脑区的荧光信号虽略有下降, 但整体仍维持在较高水平, 而 LP 组头部荧光信号逐渐减弱, 与背景对比度显著降低。即便在给药后 3~7 d, PLP 组脑部仍可检测到持续的荧光残留, 而 LP 组则接近背景水平。经过定量以后, 可看出 PLP 组平均荧光强度均比 LP 组高 (图 4b)。上述结果表明, 血小板膜仿生修饰不仅显著提高了纳米载体对缺血脑区的定向富集能力, 还明显延长了其在病灶组织的滞留时间, 为 TGF- $\beta 1$ 在

局部的持续释放和发挥治疗效应提供了有利的时间基础。

2.3.2 PLP 显著缩小脑梗死体积

TTC 染色依赖线粒体脱氢酶活性区分存活脑组织与不可逆梗死区, 是 tMCAO 模型评价急性脑损伤的经典方法^[42]。Sham 为假手术组, 作为阴性对照; Saline 组造模后仅注射生理盐水, 为阳性对照。术后 3 d 的 TTC 染色结果 (图 4c) 显示, Sham 组脑组织均呈均一红色, 未见梗死区, 说明无梗死灶形成。Saline 组右侧大脑半球出现大面积白色缺血坏死灶, 表明存在显著的脑组织损伤。游离 TGF- $\beta 1$ 组的脑梗死体积与 Saline 组相比无显著差异, 均出现大面积白色梗死灶。这证实了, 由于半衰期短且无法有效跨越 BBB, 游离 TGF- $\beta 1$ 无法在脑病灶区域达到有效治疗浓度。空白载体 NP 组同样未显示出明显的神经保护作用, 其梗死体积与 Saline 组接近。这表明, 单靠血小板膜的生物黏附作用并不足以逆转缺血损伤, 必须依赖其负载的治疗药物。相比较, PLP 处理组的梗死范围明显缩

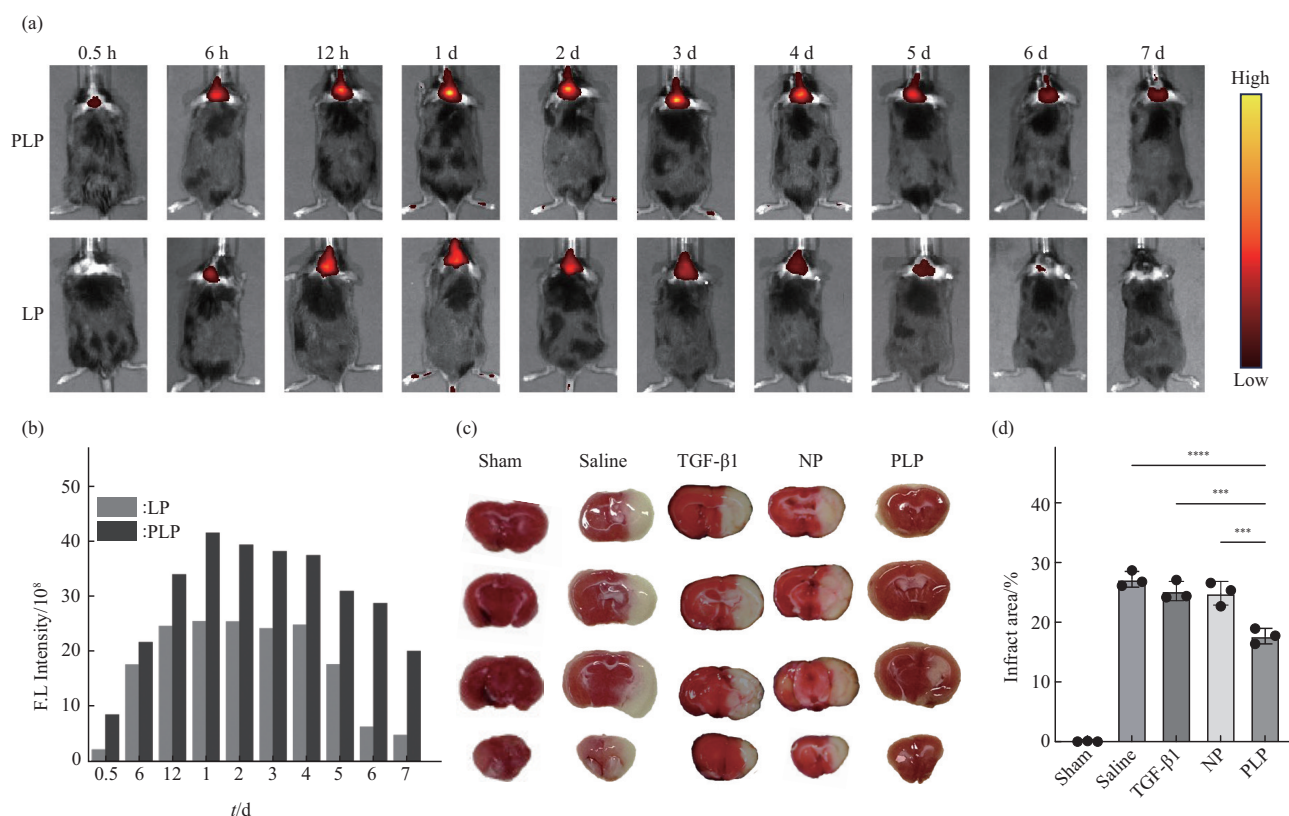


Fig. 4 Neuroprotective and brain-targeting effects of PLP in tMCAO mice

(a) Fluorescence intensity analysis shows consistently higher accumulation of PLP compared to LP. (b) *In vivo* imaging demonstrates the effective targeting and prolonged retention of PLP in the ischemic brain. (c) TTC staining showing that PLP treatment visibly reduces infarct areas compared with Saline, free TGF- $\beta 1$, and empty NP groups, while sham brains show no infarction. (d) Quantitative analysis confirming that PLP significantly lowers infarct volume percentage relative to Saline, TGF- $\beta 1$, and NP groups. **** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n=3$).

小，仅在局部病灶区域可见残余白色梗死灶。定量分析结果（图4d）进一步表明，PLP组梗死面积比例显著降低，仅为18%左右（ $P<0.05$ ），明显小于Saline与其他对照组。上述结果证实，PLP能有效减轻急性缺血导致的不可逆性脑组织坏死，从组织学层面验证了其显著的IS保护作用，这一效果与体外实验观察到的抑炎和抗凋亡效应一致。说明PLP的神经保护作用可能通过抑制促炎反应、改善细胞存活及增强缺血灶靶向性等多重机制共同实现。

2.3.3 PLP抑制星形胶质细胞活化

为进一步评估PLP对缺血后脑内炎症与胶质反应的调控作用，本研究采用胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein, GFAP）免疫荧光染色分析tMCAO小鼠脑组织中星形胶质细胞的激活

程度。结果显示，Sham组GFAP信号极弱，仅呈现正常生理状态下的基线表达，Saline组的缺血半球GFAP荧光信号显著增强，并伴随细胞体积增大和突起增粗等典型的反应性星形胶质增生特性（图5），说明脑组织处于高度炎症和胶质瘢痕形成阶段。空白载体NP组与游离TGF- β 1组同样表现出明亮的荧光信号，与TTC染色的结果相呼应，证实了病灶组织的恢复与炎症反应的减轻需要靶向和细胞因子的共同作用。而PLP处理组的GFAP荧光信号减弱，星形胶质细胞反应性增生程度显著低于Saline与其他对照组，其形态和分布更接近正常状态。这些结果均表明PLP能有效抑制缺血后星形胶质细胞的过度活化，减轻局部炎症反应和胶质瘢痕形成。该结果与PLP在体外表现出的抗炎作用及其在体内的组织修复特性相一致，进一步说明PLP通

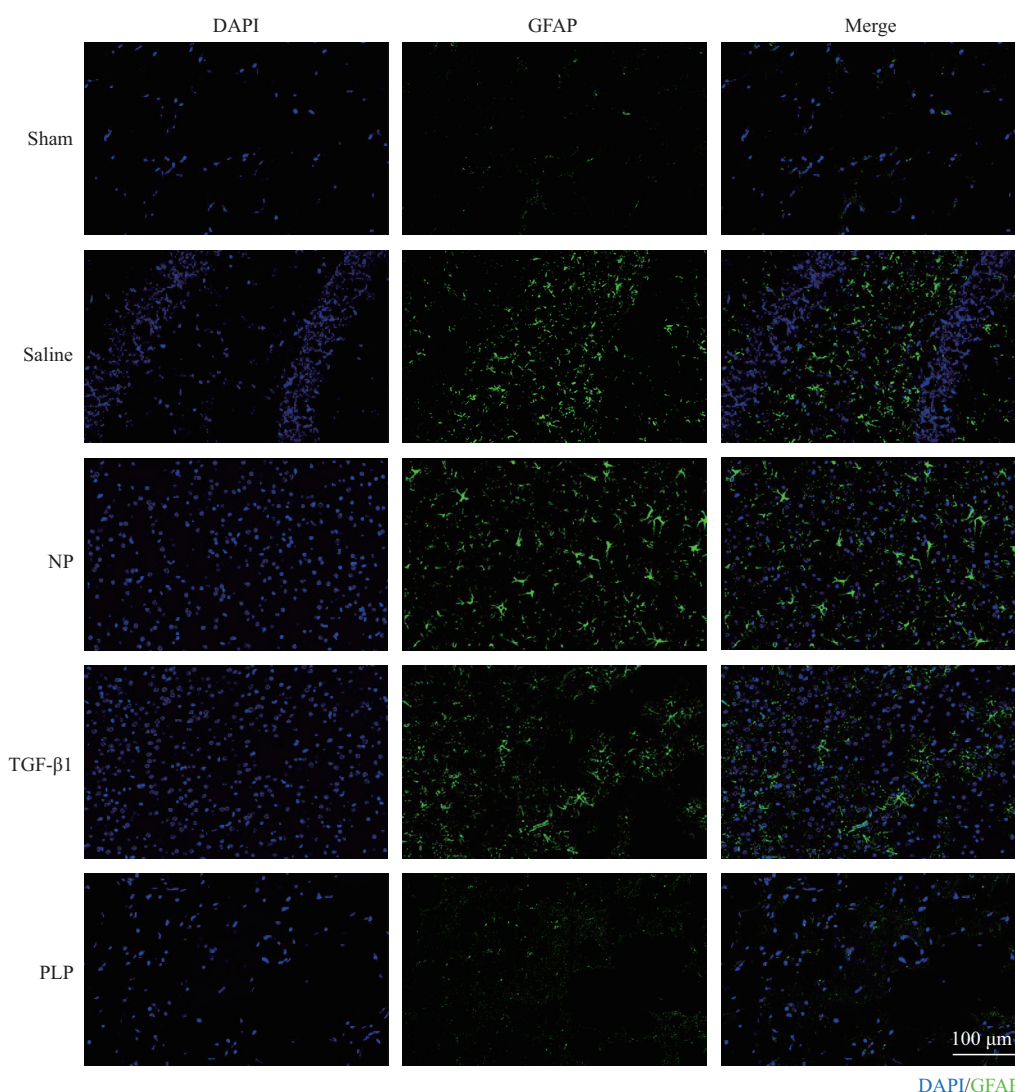


Fig. 5 GFAP immunofluorescence indicated that PLP attenuated astrocyte activation in peri-infarct regions compared with other groups

过调控神经胶质细胞活化改善缺血性脑组织的微环境,从而协同神经保护与组织修复。

2.4 PLP改善术后体重下降并促进tMCAO小鼠的神经功能恢复

为系统评估PLP对tMCAO小鼠整体生理状态及神经功能恢复的影响,本研究监测了术后7 d内的小鼠体重变化和NSS。体重变化作为反映缺血后代谢压力和全身状况的综合指标,如图6a所示,Sham组体重在实验期间保持相对稳定,而Saline组自术后第2天起体重持续下降,表明缺血损伤导致显著的全身应激反应及生理功能受损。相比较,PLP处理组的体重下降趋势明显减缓,说明该治疗在一定程度上减轻了缺血相关的全身性代谢压力与系统性应激反应。

NSS作为多维度神经行为学指标,综合评价运

动协调、平衡、牵引能力及感觉反射功能等^[43]。实验结果显示,Sham组在整个观察期间评分维持0分,表现为完全正常的神经功能,Saline组评分持续维持在8~10分,表明其存在严重且持续的神经功能缺损(图6b)。PLP组在术后第1天评分与Saline相近,但自第2天起出现持续下降,并在第7天降至约2分,表明神经功能恢复过程更快、幅度更大。此外,PLP还显著降低了小鼠的死亡率(图6c)。Saline组的小鼠生存率急剧下降,在第6天死亡率达100%,相比较,PLP组最终死亡率仅为60%,明显优于对照组。上述结果表明,PLP不仅在组织和细胞水平发挥神经保护作用,还可显著促进IS后的神经功能恢复,改善运动协调和平衡能力,提高术后存活率,从功能结局层面进一步证实其在IS治疗中的潜在价值。

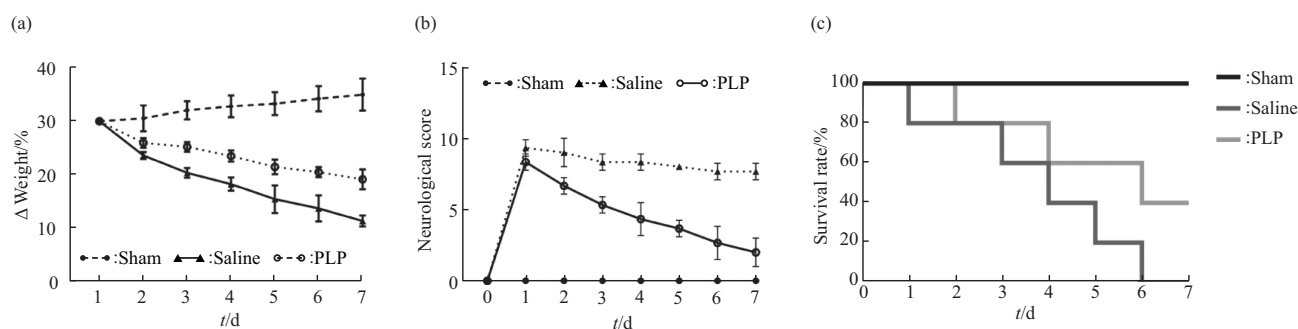


Fig. 6 PLP improves systemic condition and neurological function in tMCAO mice

(a) Body weight curves showing that PLP partially alleviates post-stroke weight loss compared with saline-treated mice. (b) Neurological severity scores indicating that PLP significantly accelerates functional recovery and reduces neurological deficits over 7 d. (c) Survival analysis reveals a higher survival rate in PLP-treated mice compared to the saline group.

3 讨 论

IS后的病理进程高度复杂,涉及急性炎症放大、免疫微环境失衡、神经元凋亡以及胶质细胞反应性增生等多重损伤机制^[44-45],使得单一靶点干预难以获得持续而有效的治疗效果。本研究基于血小板膜的天然损伤识别特性和TGF- $\beta 1$ 的免疫调控与神经保护功能,构建了兼具病灶主动靶向和微环境重塑能力的仿生纳米平台PLP,并在多个层面验证了其协同治疗潜力。结果显示,PLP能高效富集于缺血区域、抑制促炎巨噬细胞极化、减轻神经元凋亡、抑制星形胶质细胞异常活化,进而缩小梗死体积并改善神经行为表现与生存率。上述发现表明,通过整合血小板膜的靶向优势与TGF- $\beta 1$ 的多维

保护作用,PLP实现了从免疫调控到神经功能恢复的多层级干预,为构建具有精准递送和机制协同特点的卒中治疗策略提供了新的思路。

PLP的综合治疗效应可归因于其独特的多机制协同作用。在靶向递送层面,PLP表面完整保留了血小板膜关键黏附蛋白如P选择素、GPIIb α 及 α IIb β 3,能够特异识别缺血后暴露的胶原、vWF及炎症内皮,从而实现对缺血半暗带的主动靶向富集,为提高TGF- $\beta 1$ 的局部有效浓度提供了关键前提。另外,TGF- $\beta 1$ 作为重要的免疫调控因子,能抑制M1型巨噬细胞和小胶质细胞的促炎极化,阻断炎症风暴,促进免疫微环境从破坏性向修复性转变。与此同时,TGF- $\beta 1$ 可通过调控下游信号通路,如磷脂酰肌醇3/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase

(PI3K)/Akt) 调控线粒体稳态、减轻氧化应激和改善细胞生存信号, 缓解因缺血再灌注导致的神经元损伤。因此, 通过将血小板膜介导的靶向特性与 TGF- β 1 的免疫与神经保护功能整合, PLP 构建了一个覆盖炎症抑制、组织保护和功能修复的连续性机制网络。

体外实验证实, PLP 能够显著抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞向 M1 表型极化, 并降低缺氧复氧条件下 SH-SY5Y 细胞的凋亡率, 更在 OGD/R 诱导的 BV2 小胶质细胞模型中表现出显著的剂量依赖性调控效应。GFAP 是反应性星形胶质增生的经典标志物, 可敏感反映缺血性脑损伤后胶质细胞的活化水平, 从而间接评估炎症状态及胶质瘢痕形成^[46]。由于 PLP 有效遏制了免疫细胞的过度活化, GFAP 阳性星形胶质细胞的显著减少, 降低了次生炎症造成的损伤。同时直接的神经保护作用使缺血半暗带的神经元免于损伤, 显著缩小 TTC 染色中梗死面积。此外, 活体成像显示 PLP 在脑部的滞留时间长达 7 d, 为上述持续性的免疫调节和组织修复提供了必要的时间基础, 通过精准递送, 将细胞层面的保护机制拓展到疾病整体的治疗与改善。体重监测、NSS 及生存率分析则从康复效果的角度系统性地评估小鼠损伤的恢复, 证实 PLP 可减轻缺血相关的全身应激反应、加速神经功能恢复, 显著降低死亡率。从细胞层面的机制验证到动物层面的疗效确认, 实验结果相互支撑, 全面证实了 PLP 在抑制炎症、保护细胞、改善组织损伤及促进功能恢复等多方面的协同作用。

与现有卒中治疗策略相比, PLP 所展现的综合优势凸显了其显著的创新性与临床潜力。当前的卒中药物多依赖单一的治疗机制, 且难以跨越 BBB, 缺乏病灶靶向能力^[47], 导致治疗窗口短、有效浓度不足且副作用明显; 而直接给药 TGF- β 1 又面临体内半衰期短、血药浓度波动大、非特异性免疫抑制等问题。以往仅利用血小板膜递送惰性药物的研究, 聚焦于单一病理环节, 缺乏对免疫微环境的主动重塑能力^[25, 48]。本研究通过血小板膜仿生包覆, 使 PLP 保留了血小板精准的导航能力, 同时负载了 TGF- β 1 这一强效免疫调节因子, 使 TGF- β 1 可以在缺血区域实现高效富集与持续作用, 主动调控免疫微环境, 同时避免系统性给药带来的非特异性免疫抑制, 区别于单纯的载体递送或单一靶点干预。这种设计模拟了机体自身的靶向机制, 通过外源性因子的强化作用, 突破了传统单靶点治疗的局限。

尽管 PLP 在小鼠 tMCAO 模型中显示出明确的组织保护和功能改善作用, 但其分子作用机制仍然不完善、不明确。尽管在表型上观察到了明确的抗炎和抗凋亡效应, 但本研究尚未通过蛋白质印迹 (Western blotting) 等手段直接检测这些通路中关键蛋白质 (如 Smad2/3、Akt) 的磷酸化水平, 以确证其具体的激活状态。此外, 对于 PLP 抑制星形胶质细胞过度活化的具体胞内分子路径, 主要提供了基于 GFAP 表达的组织表型证据, 仍需在未来的研究中结合长期动物模型进行更为系统的评估。因此, 在后续研究中将利用 ELISA 等定量检测手段完善数据, 并对分子机制的精细调控进行解析, 拟通过基因敲除或特异性阻断剂实验进一步深入探讨, 并结合复杂行为学 (如水迷宫) 和主要脏器病理评价, 以全面评估 PLP 的长期转化潜力, 进一步提升研究的科学性与转化价值。

4 结 论

本研究构建了血小板膜修饰的 TGF- β 1 递送脂质纳米粒子 (PLP), 并系统评价其在 IS 中的脑靶向性能和神经保护效应。PLP 保留了血小板膜关键黏附与免疫调控蛋白, 能够与缺血后上调的内皮黏附分子发生特异性相互作用, 从而在体内实现对缺血脑区的快速富集与长时滞留。体内外实验结果表明, PLP 可有效抑制缺氧环境诱导的小胶质细胞极化和巨噬细胞 M1 极化, 降低 OGD/R 条件下神经元的凋亡率、减轻反应性星形胶质增生, 并显著缩小缺血性梗死体积。同时, PLP 明显改善 tMCAO 小鼠的神经功能评分, 进一步显示其在组织保护、微环境调控与功能恢复方面具有协同效应。总体而言, PLP 通过“仿生靶向-抗炎免疫调节-神经保护与修复”连续作用链条, 实现了对缺血脑组织的多维度保护, 展现出机制上合理且具有转化潜力的 IS 纳米治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Langhorne P, O'Donnell M J, Chin S L, *et al.* Practice patterns and outcomes after stroke across countries at different economic levels (INTERSTROKE): an international observational study. *Lancet*, 2018, **391**(10134): 2019-2027
- [2] Collaborators G 2 S. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol*, 2021, **20**(10): 795-820
- [3] Hilkens N A, Casolla B, Leung T W, *et al.* Stroke. *Lancet*, 2024,

- 403(10446):2820-2836
- [4] Nguyen T N, Abdalkader M, Fischer U, *et al.* Endovascular management of acute stroke. *Lancet*, 2024, **404**(10459): 1265-1278
 - [5] Yang S, Li X, Yan J, *et al.* Disulfiram downregulates ferredoxin 1 to maintain copper homeostasis and inhibit inflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Sci Rep*, 2024, **14**(1): 15175
 - [6] Premilovac D, Sutherland B A. Acute and long-term changes in blood flow after ischemic stroke: challenges and opportunities. *Neural Regen Res*, 2023, **18**(4): 799-800
 - [7] Alawieh A, Langley E F, Tomlinson S. Targeted complement inhibition salvages stressed neurons and inhibits neuroinflammation after stroke in mice. *Sci Transl Med*, 2018, **10**(441): eaao6459
 - [8] Eltzschig H K, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*, 2011, **17**(11): 1391-1401
 - [9] Li Z, Liu B, Lambertsen K L, *et al.* USP25 inhibits neuroinflammatory responses after cerebral ischemic stroke by deubiquitinating TAB2. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, **10**(28): e2301641
 - [10] Lu T, Li H, Zhou Y, *et al.* Neuroprotective effects of alisol A 24-acetate on cerebral ischaemia-reperfusion injury are mediated by regulating the PI3K/AKT pathway. *J Neuroinflammation*, 2022, **19**(1): 37
 - [11] Nakahashi-Oda C, Fujiyama S, Nakazawa Y, *et al.* CD300a blockade enhances efferocytosis by infiltrating myeloid cells and ameliorates neuronal deficit after ischemic stroke. *Sci Immunol*, 2021, **6**(64): eabe7915
 - [12] Yang C, Hawkins K E, Doré S, *et al.* Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, **316**(2): C135-C153
 - [13] Sandoval K E, Witt K A. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis*, 2008, **32**(2): 200-219
 - [14] Han D, Liu H, Gao Y. The role of peripheral monocytes and macrophages in ischemic stroke. *Neurol Sci*, 2020, **41**(12): 3589-3607
 - [15] Dasari R, Bonsack F, Sukumari-Ramesh S. Brain injury and repair after intracerebral hemorrhage: the role of microglia and brain-infiltrating macrophages. *Neurochem Int*, 2021, **142**: 104923
 - [16] Li Z R, Wang Y Y, Wang Z H, *et al.* The positive role of transforming growth factor- $\beta 1$ in ischemic stroke. *Cell Signal*, 2024, **121**: 111301
 - [17] Wang J, Zhao X, Wan Y Y. Intricacies of TGF- β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cell Mol Immunol*, 2023, **20**(9): 1002-1022
 - [18] Massagué J, Sheppard D. TGF- β signaling in health and disease. *Cell*, 2023, **186**(19): 4007-4037
 - [19] Zhao Y, Li Q, Niu J, *et al.* Neutrophil membrane-camouflaged polyprodrug nanomedicine for inflammation suppression in ischemic stroke therapy. *Adv Mater*, 2024, **36**(21): e2311803
 - [20] Pan J, Wang Z, Huang X, *et al.* Bacteria-derived outer-membrane vesicles hitchhike neutrophils to enhance ischemic stroke therapy. *Adv Mater*, 2023, **35**(38): e2301779
 - [21] Peng B, Mohammed F S, Tang X, *et al.* Nanotechnology approaches to drug delivery for the treatment of ischemic stroke. *Bioact Mater*, 2025, **43**: 145-161
 - [22] Hu C J, Fang R H, Wang K C, *et al.* Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking. *Nature*, 2015, **526**(7571): 118-121
 - [23] Wang S, Duan Y, Zhang Q, *et al.* Drug targeting via platelet membrane-coated nanoparticles. *Small Struct*, 2020, **1**(1): 2000018
 - [24] Olsson M, Bruhns P, Frazier W A, *et al.* Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood*, 2005, **105**(9): 3577-3582
 - [25] Wang P, Lv X, Tian S, *et al.* Platelet membrane-based nanoparticles for targeted delivery of deferoxamine to alleviate brain injury induced by ischemic stroke. *Int J Nanomedicine*, 2025, **20**: 7533-7548
 - [26] Han H, Bártolo R, Li J, *et al.* Biomimetic platelet membrane-coated nanoparticles for targeted therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, **172**: 1-15
 - [27] Li Y, Wu C, Yang R, *et al.* Application and development of cell membrane functionalized biomimetic nanoparticles in the treatment of acute ischemic stroke. *Int J Mol Sci*, 2024, **25**(15): 8539
 - [28] Tang L, Yin Y, Liu H, *et al.* Blood-brain barrier-penetrating and lesion-targeting nanoplatforms inspired by the pathophysiological features for synergistic ischemic stroke therapy. *Adv Mater*, 2024, **36**(21): e2312897
 - [29] Belyaev I B, Griaznova O Y, Yaremenko A V, *et al.* Beyond the EPR effect: intravital microscopy analysis of nanoparticle drug delivery to tumors. *Adv Drug Deliv Rev*, 2025, **219**: 115550
 - [30] Serrano-Lotina A, Portela R, Baeza P, *et al.* Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catal Today*, 2023, **423**: 113862
 - [31] Filippov S K, Khusnutdinov R, Murmiliuk A, *et al.* Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. *Mater Horiz*, 2023, **10**(12): 5354-5370
 - [32] Cui W, Liu R, Jin H, *et al.* pH gradient difference around ischemic brain tissue can serve as a trigger for delivering polyethylene glycol-conjugated urokinase nanogels. *J Control Release*, 2016, **225**: 53-63
 - [33] Dehaini D, Wei X, Fang R H, *et al.* Erythrocyte-platelet hybrid membrane coating for enhanced nanoparticle functionalization. *Adv Mater*, 2017, **29**(16): 1606209
 - [34] Xin W, Pan Y, Wei W, *et al.* TGF- $\beta 1$ decreases microglia-mediated neuroinflammation and lipid droplet accumulation in an *in vitro* stroke model. *Int J Mol Sci*, 2023, **24**(24): 17329
 - [35] Hu X, Li P, Guo Y, *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, **43**(11): 3063-3070
 - [36] Hourani T, Sharma A, Luwor R B, *et al.* Transforming growth factor- β in tumor microenvironment: understanding its impact on

- monocytes and macrophages for its targeting. *Int Rev Immunol*, 2025, **44**(2): 82-97
- [37] Gauthier T, Yao C, Dowdy T, *et al.* TGF- β uncouples glycolysis and inflammation in macrophages and controls survival during sepsis. *Sci Signal*, 2023, **16**(797): eade0385
- [38] Zhang F, Wang H, Wang X, *et al.* TGF- β induces M2-like macrophage polarization *via* SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 2016, **7**(32): 52294-52306
- [39] Peng Y, Zhou M, Yang H, *et al.* Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*, 2023, **2023**: 8821610
- [40] Chen D Q, Guo Y, Li X, *et al.* Small molecules as modulators of regulated cell death against ischemia/reperfusion injury. *Med Res Rev*, 2022, **42**(6): 2067-2101
- [41] Guan J, Du S, Lv T, *et al.* Oxygen-glucose deprivation preconditioning protects neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion induced injury *via* bone morphogenetic protein-7 mediated ERK, p38 and Smad signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, **43**(1): 125-134
- [42] Buana G R, Makkiyah F A, Wahyudi D P. Comparative analysis of infarct volumes in permanent and transient MCAO models using TTC staining: a review of current research and future directions. *Health Res J*, 2025, **2**(1): 14-19
- [43] Bieber M, Gronewold J, Scharf A C, *et al.* Validity and reliability of neurological scores in mice exposed to middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 2019, **50**(10): 2875-2882
- [44] Wu F, Zhang Z, Ma S, *et al.* Microenvironment-responsive nanosystems for ischemic stroke therapy. *Theranostics*, 2024, **14**(14): 5571-5595
- [45] Shi K, Tian D C, Li Z G, *et al.* Global brain inflammation in stroke. *Lancet Neurol*, 2019, **18**(11): 1058-1066
- [46] Ito M, Komai K, Mise-Omata S, *et al.* Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery. *Nature*, 2019, **565**(7738): 246-250
- [47] Patel M M, Patel B M. Crossing the blood-brain barrier: recent advances in drug delivery to the brain. *CNS Drugs*, 2017, **31**(2): 109-133
- [48] Pei W, Huang B, Chen S, *et al.* Platelet-mimicking drug delivery nanoparticles for enhanced chemo-photothermal therapy of breast cancer. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 10151-10167

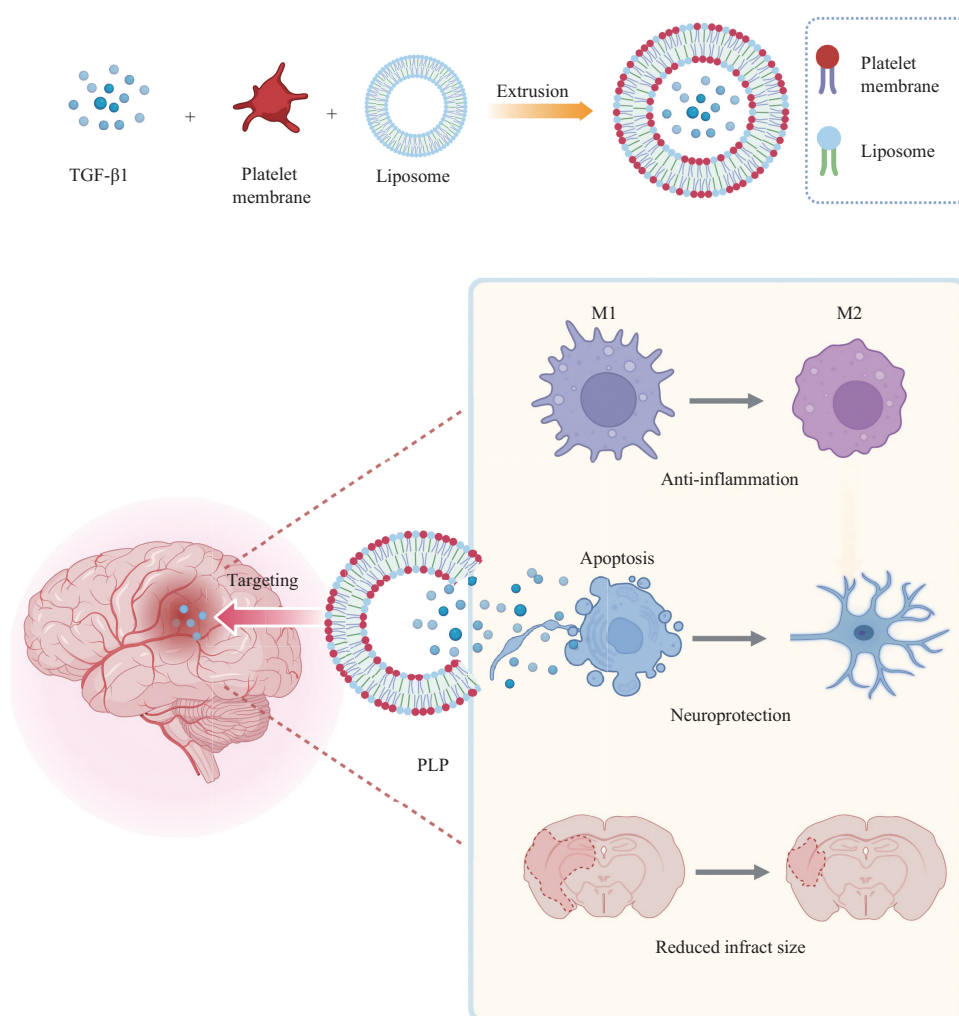
TGF- $\beta 1$ -engineered Biomimetic Platelet Nanoparticles for Targeted Therapy of Ischemic Stroke*

CHEN Li-Qi^{1,2)}, KANG Tian-Fang^{1,2)}, HUANG Guo-Jun¹⁾, YIN Ting¹⁾, MA Ai-Qing¹⁾**,
CAI Lin-Tao^{1,2)}**, PAN Hong^{1,2)}**

⁽¹⁾Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China;

⁽²⁾University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (92581114), the Shenzhen Medical Research Fund (A2303057), the National Key Research and Development Program of China (2023YFA0915400), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2024A1515010825), and Guangdong Province Science and Technology Program (2025B1212150002).

** Corresponding author.

PAN Hong. Tel: 86-755-86585204, E-mail: hong.pan@siat.ac.cn

CAI Lin-Tao. Tel: 86-755-86392210, E-mail: lt.cai@siat.ac.cn

MA Ai-Qing. Tel: 86-769-22896322, E-mail: aqma@gdmu.edu.cn

Received: December 9, 2025 Accepted: February 6, 2026

Abstract Objective Post-ischemic acute inflammation and the subsequent persistent dysregulation of the immune microenvironment represent major pathological drivers that aggravate neuronal injury and severely restrict functional recovery following ischemic stroke. Although current reperfusion therapies partially restore blood flow, they fail to effectively modulate the secondary inflammatory cascade and oxidative stress, which remain critical barriers to neurological restoration. To address this challenge, this study aimed to engineer and systematically evaluate a biomimetic nanosystem composed of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-loaded platelet membrane-camouflaged lipid nanoparticles (PLP). This nanosystem was designed to achieve dual lesion-targeted delivery and immune microenvironment remodeling. By verifying its spatiotemporal accumulation, anti-inflammatory activity, and neuroprotective efficacy, we sought to establish an integrated therapeutic strategy that simultaneously enables lesion targeting, immune regulation, and functional recovery after ischemic injury.

Methods The physicochemical properties of PLP, including hydrodynamic particle size, zeta potential, structural stability, and morphology, were characterized using dynamic light scattering, zeta potential analysis, and transmission electron microscopy. The preservation of platelet membrane-derived adhesion and immunoregulatory proteins was confirmed by SDS-PAGE through comparative analysis of protein band profiles between PLP and native platelet membranes. The *in vitro* biological activities of PLP were evaluated using two complementary cellular models. LPS-induced M1-polarized RAW264.7 macrophages were employed to assess inflammatory modulation, while oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced BV2 microglial cells and SH-SY5Y neuronal cells were utilized to investigate neuroinflammatory regulation and neuronal protection. For *in vivo* validation, a transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) mouse model was established to mimic ischemia-reperfusion injury. The spatiotemporal biodistribution and lesion-targeting capability of the PLP were monitored through live fluorescence imaging. Therapeutic efficacy was comprehensively evaluated by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunofluorescence analysis, body weight monitoring, and neurological severity score (NSS) assessment.

Results PLP nanoparticles displayed a uniform spherical morphology, nanoscale particle size distribution, and stable negative surface charge, indicating favorable colloidal stability and circulation potential. SDS-PAGE results confirmed the effective retention of key platelet membrane proteins associated with endothelial adhesion, immune evasion, and inflammatory regulation, demonstrating the successful biomimetic construction. Optimal therapeutic concentrations were determined in OGD/R-induced BV2 cells, where PLP exhibited excellent cytocompatibility and anti-inflammatory activity. *In vitro* experiments demonstrated that PLP significantly inhibited the polarization of RAW264.7 macrophages toward the pro-inflammatory M1 phenotype and markedly reduced neuronal apoptosis under ischemia-reperfusion conditions. *In vivo* fluorescence imaging revealed that PLP rapidly accumulated in the ischemic brain hemisphere and maintained prolonged retention for up to 7 d, suggesting enhanced lesion-specific targeting and sustained drug release. Compared with control group, PLP treatment significantly reduced cerebral infarct volume, attenuated reactive astrogliosis, improved weight recovery, and accelerated neurological functional restoration, as reflected by significantly improved NSS scores.

Conclusion This study establishes a multifunctional biomimetic nanoplatform that integrates platelet membrane-mediated active targeting with the anti-inflammatory, antioxidative, and neuroprotective properties of TGF- β 1. The PLP system enables rapid lesion homing and long-term retention while synergistically regulating the post-stroke inflammatory microenvironment by suppressing pro-inflammatory immune activation, reducing neuronal apoptosis, and limiting excessive astrocyte reactivity. Importantly, this study proposes a conceptually therapeutic paradigm that combines targeted delivery with immune microenvironment remodeling to achieve comprehensive neurovascular protection. These findings provide strong experimental evidence supporting the translational potential of biomimetic nanotherapeutics as next-generation precision interventions for ischemic stroke.

Key words ischemic stroke, biomimetic platelet membrane nanoparticles, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), brain-targeted delivery, immune microenvironment modulation

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0541

CSTR: 32369.14.pibb.20250541