

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.21.002

## CX3CL1 RNA 干扰慢病毒载体的构建包装与鉴定\*

柏秀娟 郭艳娥 时霄冰 孙博 吴卫平<sup>△</sup>

(中国人民解放军总医院第二医学中心神经内科 北京 100853)

**摘要 目的:** 构建包装趋化因子 CX3C 的配体 1(CX3CL1)RNA 干扰慢病毒载体。**方法:** 参考目的基因 CX3CL1 序列,设计 PCR 引物扩增相应的干扰序列,然后将干扰序列连接至 pLVX-shRNA2 酶切后的线性化载体上,通过酶切及测序鉴定获得阳性克隆,即为构建成功的 pLVX-shRNA2-CX3CL1 慢病毒干扰载体。将构建好的慢病毒干扰载体同慢病毒包装载体共同转染 293T 细胞,收集上清,纯化浓缩后即得 pLVX-shRNA2-CX3CL1 慢病毒。最后将慢病毒感染 BMSCs 细胞,QPCR 检测慢病毒的干扰效率。**结果:** 经过酶切能切出大小约为 6500bp 和 1350bp 的两条带,获得与预期结果相一致的 DNA 片段,并通过测序验证了序列的准确性,成功构建 CX3CL1 RNA 慢病毒干扰载体。然后经过包装、纯化浓缩后得到 pLVX-shRNA2-CX3CL1 慢病毒。QPCR 结果表明干扰组明显抑制了 CX3CL1mRNA 的表达,干扰效率在 70%以上。**结论:** 成功构建包装 CX3CL1 干扰慢病毒载体,并证实其显著沉默了 BMSCs 细胞 CX3CL1 的表达,为 CX3CL1 在 BMSCs 移植的大鼠缺血性脑卒中炎症反应的机制研究奠定基础。

**关键词:** CX3CL1;RNA 干扰;骨髓间充质干细胞;缺血性脑卒中;慢病毒

**中图分类号:** R-33;Q78;R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)21-4007-06

## Construction, Packaging and Identification of CX3CL1 RNAi Lentiviral Vector\*

BAI Xiu-juan, GUO Yan-e, SHI Xiao-bing, SUN Bo, WU Wei-ping<sup>△</sup>

(Neurological Department of the Second Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

**ABSTRACT Objective:** To construct and pack CX3CL1 RNAi lentiviral vector. **Methods:** With reference to the target gene CX3CL1 sequence, PCR primers were designed to amplify the corresponding interference sequence. Then the interference sequence was connected to pLVX-shRNA2 linearized vector. Positive clones were obtained by identification of PCR and digestion, which was a successful construction of pLVX-shRNA2-CX3CL1 Lentiviral interference vectors. The constructed RNAi lentiviral vector was transfected into 293T cells together with the packaging vectors. The supernatant was collected, purified and concentrated to pLVX-shRNA2-CX3CL1 lentivirus. Finally, BMSCs were infected with lentivirus, and the interference efficiency was detected by QPCR. **Results:** After digestion, two bands with 6500bp and 1350bp were obtained consistent with the expected results, and the sequence accuracy was verified by sequencing. The CX3CL1 RNAi lentiviral vector was successfully constructed. After packaging, purification and concentration, the pLVX-shRNA2-CX3CL1 lentivirus was obtained. QPCR results showed that the interference group significantly inhibited the expression of CX3CL1mRNA, and the interference efficiency was above 70%. **Conclusion:** The CX3CL1 RNAi lentiviral vector was successfully constructed and packed and significantly silenced the expression of CX3CL1 of BMSCs, which laid the foundation for the study of the mechanism of CX3CL1 on inflammatory response of ischemic stroke in BMSCs transplanted rats.

**Key words:** CX3CL1; RNA interference; BMSCs; Ischemic stroke; Lentivirus

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q78; R743 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)21-4007-06

### 前言

缺血性脑卒中是导致人类残疾、死亡的重要疾病之一<sup>[1,2]</sup>,是由血栓或栓塞导致血管阻塞引起脑组织缺血、缺氧,进一步可致脑组织神经元发生不可逆性死亡,同时启动了缺血局部组织的非特异性炎症反应,过度的炎症反应可进一步加剧脑组织的继发性损伤。近年来,已有研究证实间充质干细胞(MSC)可以改善脑卒中动物缺损的神经功能,但主要集中在神经再生及

修复方面<sup>[3,4]</sup>,对 MSC 能否调控卒中后炎症反应鲜有报道。据知小胶质细胞在脑缺血炎症反应中起着“双刃剑”的作用,促炎型小胶质细胞发挥组织防御、吞噬坏死组织等功能;抗炎型小胶质细胞起着脑保护和促进神经再生的作用<sup>[5-8]</sup>。因此,调控小胶质细胞从促炎型向抗炎型转化,将成为降低缺血性脑卒中损伤、促进神经修复潜在的治疗靶点<sup>[9,10]</sup>。

近年很多研究结果表明 MSC 对小胶质细胞的激活、增殖及功能均可产生一定的影响,但具体机制尚不十分清楚。据文

\* 基金项目:首都卫生发展专项科研合作项目(2016-1-1031)

作者简介:柏秀娟(1975-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:脑血管病,电话:13269330993,E-mail:baixiujuan1225@126.com

<sup>△</sup> 通讯作者:吴卫平,男,博士生导师,教授,主要研究方向:脱髓鞘疾病及脑血管病,E-mail:wuwp@vip.sina.com

(收稿日期:2020-05-18 接受日期:2020-06-15)

献报道, CX3CL1 可能参与了 MSC 对小胶质细胞的调控。在中枢神经系统, CX3CL1-CX3CR1 信号途径在维持小胶质细胞的功能发挥重要作用, 此信号途径激活后小胶质细胞主要表现为神经保护型, 而破坏此途径后小胶质细胞表现为神经毒型<sup>[11,12]</sup>。我们推测, MSC 能逆转缺血性脑卒中中小胶质细胞表型、功能的转化, 从而调控炎症反应。因此, 我们拟在构建大鼠 MCAO 模型的基础上移植 BMSCs, 以期阐明 BMSCs 能否通过分泌 CX3CL1 逆转抗炎型、促炎型小胶质细胞在脑组织的分布, 抑制脑卒中缺血区炎症反应。本实验成功构建包装 CX3CL1 干扰慢病毒载体, 为进一步研究 CX3CL1 在 BMSCs 移植的大鼠缺血性卒中炎症反应的机制方面奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

SD 大鼠, 3 周龄, 购于重庆医科大学实验动物中心。质粒 pLVX-shRNA2、质粒 psPAX2、质粒 pMD2.G 购自森灵生物。293T 细胞购自上海中科院细胞库。DMEM 培养基、DMEM-F12 培养基购自美国的 GIBCO 公司。PrimeSTART<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶购自日本的 TaKaRa 公司。质粒小量抽提试剂盒购自美国的 Promega 公司。DNase I (RNase-free)、Ex Taq<sup>TM</sup> R-PCR ver.2.1、RNase 抑制剂购自日本的 TaKaRa 公司。AMV Reverse Transcriptase 购自美国的 Promega 公司。DL2000 DNA ladder、*Bam*H I、*Not*I、*Eco*RI 购自日本的 TaKaRa 公司。T4 DNA ligase buffer 购于美国的 NEB 公司。Primer 购于上海生工。NucleoBond Xtra Midi Plus 购于德国的 MACHEREY-NAGEL 公司。制备感受态试剂盒购于美国的 BIOSCIENCES 公司。NED3000 购于重庆市威斯腾生物科技有限责任公司。R-CD29 PE 流式抗体、R-CD44 PE 流式抗体、R-CD31 eFluor660 式抗体、R-CD45 eFluor660 流式抗体购于美国的 ebioscience 公司。

### 1.2 pLVX-shRNA2- CX3CL1 质粒构建

1.2.1 pLVX-shRNA2 载体的线性化 pLVX-shRNA2 载体上 2439 位点和 2456 位点分别为 *Bam*HI 和 *Eco*RI 的酶切位点, 用限制性的内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI 酶切载体 pLVX-shRNA2。酶切反应条件: 37°C 酶切 4h 小时, 然后琼脂糖电泳, 使用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver2.0 进行纯化。

1.2.2 shRNA 模板的制备 参考大鼠的 CX3CL1 序列, 设计 PCR 引物扩增相应的干扰序列。靶序列为 GGAGACAAACCCAGTTCAT, 正义链模板的 5' 端添加了 GATCC, 与 *Bam*HI 酶切后形成的粘端互补, 反义链模板的 5' 端添加了 AATTC, 与 *Eco*RI 酶切后形成的粘端互补。

正义链序列: GATCCGGAGACAAACCCAGTTCATCTC-GAGATGAAGTGGGTTTGTCTCCTTTTTTG; 反义链序列: AATTCAAAAAGGAGACAAACCCAGTTCATCTCGAGATGAACTGGGTTTGTCTCCG。取正义链和反义链 oligo 溶液, 进行退火反应。反应条件: 95°C 5 min; 85°C 5 min; 75°C 5 min; 70°C 5 min; 4°C 保存。退火处理后得到浓度为 10 μM 的 shRNA 模板。将所得模板溶液稀释 50 倍, 终浓度为 200 nM, 用于连接反应。

1.2.3 连接反应及转化 将载体 pLVX-shRNA2 的线性化的

酶切产物与 shRNA 模板进行定向连接, 反应条件: 22°C 连接 1h。再将连接产物转化细菌感受态细胞, 用质粒小提试剂盒抽提质粒并做鉴定。

1.2.4 重组质粒的鉴定 将抽提好的质粒进行 *Xho*I 单酶切鉴定, 酶切 37°C, 1h 后电泳, 应该切出来大小约为 6500bp 和 1350bp 的两条带。取 200 μL 阳性克隆对应的菌液送测序, 并将剩余的菌液用甘油保存。将测序结果与目的基因序列进行对比, 正解无误后用保存的甘油菌液接菌 LB 培养基, 进行大量质粒抽提, 得到足够量的重组质粒。

### 1.3 CX3CL1 基因干扰慢病毒包装纯化

1.3.1 慢病毒载体系统 本实验采用的病毒包装系统为三质粒系统, 组成为 pLVX-shRNA2-CX3CL1, psPAX2, pMD2.G。其中穿梭质粒 pLVX-shRNA2-CX3CL1 上携带有 U6 转录干扰序列, 且能表达绿色荧光蛋白筛选标记基因; psPAX2, pMD2.G 含有病毒包装所必须的元件。

1.3.2 慢病毒生产 取两个离心管分别进行三质粒及转染试剂 NDE3000 的稀释, 分别稀释至 500 μL, 室温静置 5 分钟, 将转染试剂管中的混合液加入到质粒的管中, 充分混匀后室温静置 15 min, 用 1 mL 枪头来回吹打 3 次后均匀加入到 293T 细胞中, 十字交叉法或八字法充分摇匀后将细胞放回培养箱中继续培养。转染后 16-24 h 更换为完全培养基, 继续培养 48h, 第一次收集全部富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 往培养基中添加新鲜完全培养基继续培养 24h, 第二次收集全部富含慢病毒颗粒的细胞上清液; 然后收集全部富含慢病毒颗粒的细胞上清液。使用密理博 Amicon Ultra-15 100KDa 对病毒上清液进行超滤浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液。最后使用逐孔稀释滴度测定法对病毒进行滴度测定, 通过荧光显微镜或 FACS 计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度。

### 1.4 大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养及鉴定

采用密度梯度离心法行大鼠间充质干细胞的分离培养, 1:2 传代(接种密度  $1 \times 10^5/cm^2$ ), 其后一般 3-5d 传代 1 次, 选取生长良好的第三代细胞进行后续实验。通过流式细胞仪检测 BMSCs 细胞表面标记 CD29、CD31、CD44、CD45。

### 1.5 CX3CL1 干扰慢病毒感染 BMSCs 细胞

实验分为两组为 BMSCs+ 空载组和 BMSCs+ 干扰组。收集大鼠 BMSCs 细胞, 无血清培养基重悬, 调整细胞密度为  $1 \times 10^5/mL$ , 每孔 500 μL 细胞悬液, 进行病毒感染时细胞的融合度约为 70% 左右。取出 4°C 保存的病毒, 使用瞬时离心机离心 20 秒, 使病毒完全悬于离心管底部即可。吸取病毒液加入细胞中, 同时加入 5 μg/mL 的 Polybrene 助转染试剂, 以提高感染效率。感染 48~72h 后, 荧光显微镜观察荧光表达情况, 估计慢病毒感染目的细胞的效率。同时收集样本进行后续实验检测。

### 1.6 QPCR 验证目的基因 CX3CL1 的干扰情况

1.6.1 荧光定量 PCR 提取被空载组及干扰组感染的 BMSCs 细胞的 RNA, 用随机引物反转录成 cDNA, 反应条件: 25°C 10 分钟、42°C 50 分钟、85°C 5 分钟。参考 CX3CL1 ID89808 序列, 然后设计特异性的引物和 sybr green I 荧光染料进行荧光定量 PCR 检测。引物为: rCx3cl1F ATGGTGGCAAGTTTGA-GAAGC、rCx3cl1R TCCTGGGA AATAGCAGTCGG; rat actin fCCCATCTATGAGGGTTACGC、rat actin rTTTAATGTCACG-

CACGATTTC, 扩增产物分别为 145bp 和 150bp。荧光定量 PCR 反应条件:94℃ 4 分钟、94℃ 20 秒、60℃ 30 秒、72℃ 30 秒循环 35 次,72℃ 检测信号。SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染料,其与双链 DNA 结合后,荧光大大增强。随着扩增循环数的增加,荧光信号不断积累,因此,SYBR Green I 的荧光信号强度与双链 DNA 的数量相关,可以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量。

**1.6.2 统计分析** 所有原始数据核对后采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。通过单因素方差分析(One-way ANOVA 检验)来说明 BMSCs 组、BMSCs+ 空载体组及 BMSCs+ 干扰组这三组细胞 CX3CL1mRNA 的相对表达量( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )之间的差异, $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒酶切鉴定

限制性内切酶 *Xho* I 酶切位点在载体上有一个,干扰序列也存在一个,故能切出来大小约为 6500bp 和 1350bp 的两条带,如酶切图所示(图 1),能获得与预期结果相一致的 DNA 片段,两者中间出现一条杂带是未完全切割。

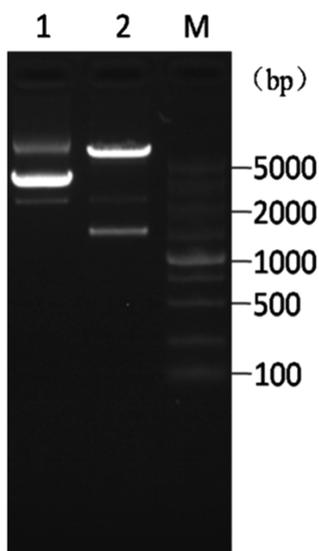


图 1 1.重组质粒;2.重组质粒的酶切鉴定;M:Marker 5000

Fig. 1 1.Recombinant plasmid; 2. Identification of recombinant plasmid digestion; M:Marker 5000

段,两者中间出现一条杂带是未完全切割。

### 2.2 重组质粒测定

取 200  $\mu$ L 阳性克隆对应的菌液送测序,并将剩余的菌液

用甘油保存。将测序结果与目的基因序列进行比对,序列完全一致(图 2)。

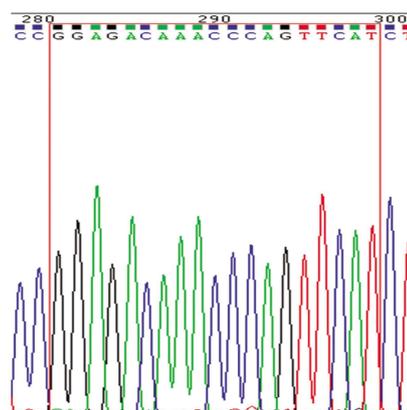


图 2 重组质粒的测序结果

Fig. 2 The sequencing results of recombinant plasmid

### 2.3 pLVX-shRNA2- CX3CL1 及阴性对照慢病毒滴度检测结果

空载体阴性对照及 pLVX-shRNA2- CX3CL1 病毒浓度的检测结果分别为  $6 \times 10^8$  TU/mL、 $5 \times 10^8$  TU/mL(图 3、图 4),病毒感染时间均为 72h。

### 2.4 BMSCs 细胞分离培养(图 5)

骨髓间充质细胞原代培养过程中,约 24 小时即可出现贴壁生长,细胞呈圆形、梭形、三角形生长缓慢。换液后细胞增殖明显,出现以梭形为主的多种形态,10 天左右 70%-80%可融合达到传代标准。传代细胞形态单一,呈梭形或扁平型,增殖至细胞融合时呈漩涡状和放射状排列,选取生长良好的第三代细胞进行实验。图 5 为 100 $\times$ 的各代细胞图片。

### 2.5 BMSCs 细胞的鉴定

流式细胞仪检测 BMSCs 细胞表面标记,结果提示 CD29、CD44 表达阳性,CD31、CD45 表达阴性,说明第三代 BMSCs 高表达抗原 CD29、CD44,基本不表达 CD31、CD34,符合 BMSCs 细胞表面标志物的特征<sup>[13]</sup>。图 6 结果解析:Q1-UL 代表 CD31<sup>+</sup> 的细胞,Q1-UR 代表 CD29<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> 共同标记上的细胞,Q1-LR 为 CD29<sup>+</sup> 的细胞,Q1-LL 为未被标记的细胞。图 7 结果解析:Q1-UL 代表 CD45<sup>+</sup> 的细胞,Q1-UR 代表 CD44<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> 共同标记上的细胞,Q1-LR 为 CD44<sup>+</sup> 的细胞,Q1-LL 为未被标记的细胞。

### 2.6 CX3CL1 干扰慢病毒感染的 BMSCs 细胞及感染空载体的 BMSCs 细胞的荧光图片

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
Titer test				
Test result	$6 \times 10^8$ TU/mL			

图 3 阴性对照检测结果

Fig. 3 Test results of negative control

病毒表达绿色荧光蛋白,带绿色荧光的为感染上的目的细胞,通过白光和荧光照片比对,感染效率在 90%以上,可用于后续实验(图 8、图 9(100×))。

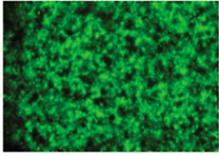
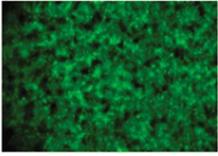
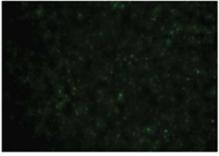
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Titer test				
Test result	5×10 <sup>8</sup> TU/mL			

图 4 pLVX-shRNA2- CX3CL1 的检测结果

Fig. 4 Test results of pLVX-shRNA2- CX3CL1 plasmid

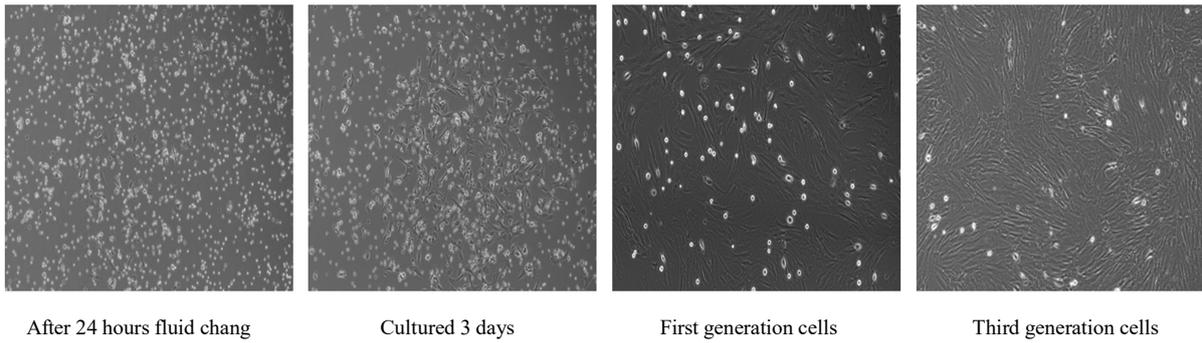


图 5 BMSCs 形态

Fig. 5 BMSCs shape

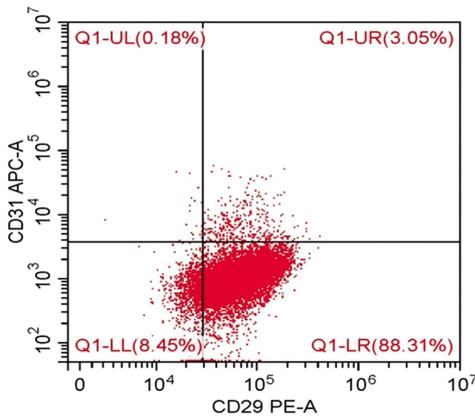


图 6 CD29、CD31 双标流式结果

Fig. 6 Flow cytometry results of CD29 and CD31

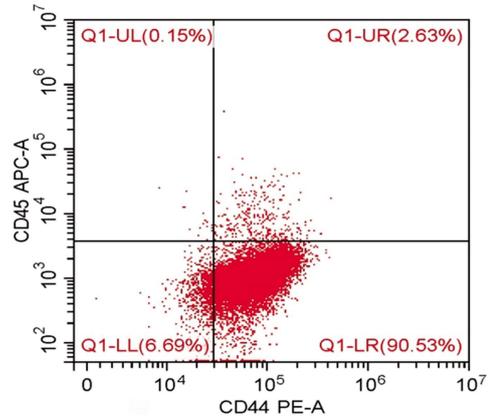


图 7 CD44、CD45 双标流式结果

Fig. 7 Flow cytometry results of CD44 and CD45

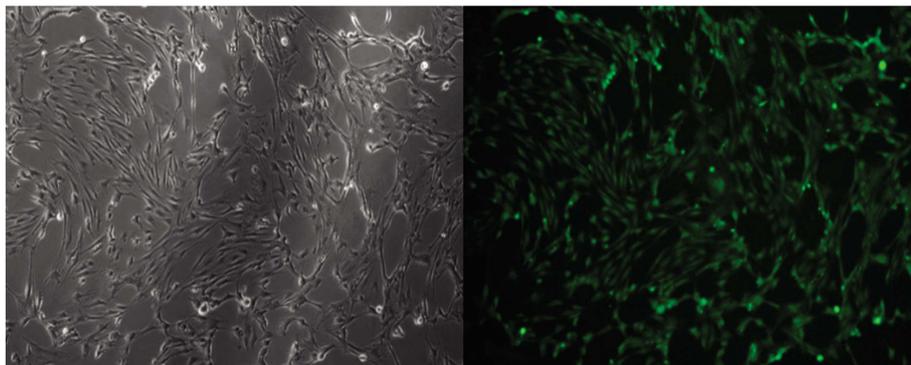


图 8 BMSC+ 空载组

Fig. 8 BMSC+empty vector group

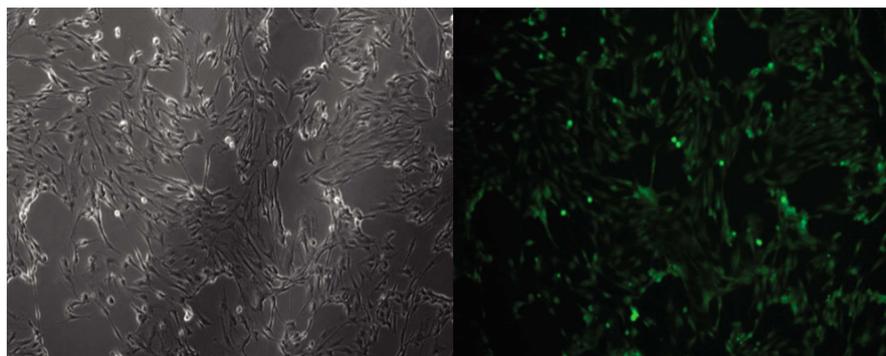


图 9 BMSC+ 干扰组

Fig. 9 BMSC+ interference group

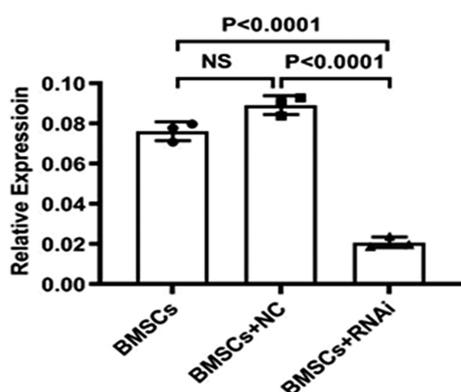


图 10 三组 BMSCs CX3CL1mRNA 相对表达量的单因素方差分析

Fig. 10 One-way ANOVA of three groups of BMSCs CX3CL1mRNA relative expression

### 2.7 QPCR 检测 BMSCs 细胞 CX3CL1mRNA 的表达情况

根据统计结果可见(图 10),与阴性对照组(空载体)比较,BMSCs 组的 CX3CL1mRNA 表达是无明显差异,而 BMSCs+干扰组的 CX3CL1mRNA 表达明显降低,其干扰效率在 70%以上。

## 3 讨论

近年,很多研究发现 MSC 体外可以调控小胶质细胞表型转化。培养实验发现人骨髓间充质干细胞(hBMSC)可以抑制 LPS 刺激时原代小鼠小胶质细胞的激活,同时下调 M1 型标记炎症因子 TNF- $\alpha$ 、iNOS 的表达<sup>[4]</sup>。研究还发现静脉移植 MSC 可降低 MCAO 小鼠缺血周围区域小胶质细胞 TGF- $\beta$  的表达,下调的 TGF- $\beta$  降低了星状胶质细胞 PAI-1 的表达,间接增强了 tPA 的活性,从而促进神经修复<sup>[15]</sup>。以上研究结果表明 MSC 可影响小胶质细胞的作用,但具体机制尚不明确。据文献报道,CX3CL1 可能参与了 MSC 对小胶质细胞的调控。那么,脑缺血时 MSC 能否通过分泌 CX3CL1 影响促炎型、抗炎症小胶质细胞在局部脑组织缺血区的分布,从而调控炎症反应,减轻缺血脑组织损伤,促进神经修复尚不十分清楚。因此我们推测, MSC 可能是通过分泌 CX3CL1 影响缺血性脑卒中小胶质细胞表型和功能的转化,从而减轻缺血后的炎症反应。本实验选择密度梯度离心法行大鼠 BMSCs 的分离培养,并对细胞进行鉴定证实其可以用于后续实验。以 CX3CL1 为作用靶点,建立以慢病毒为载体的 RNA 干扰体系,然后将慢病毒感染 BMSCs,

实现高效抑制 BMSCs 细胞 CX3CL1 基因的表达。

BMSCs 构成骨髓中的非造血细胞群体,处于未分化状态,含量极低,但自我更新及增殖能力强,可在体外进行培养扩增,且自体移植不会发生免疫排斥反应。本实验采用密度梯度离心法,用 3 周龄 SD 大鼠的股骨和胫骨的骨髓进行原代分离培养<sup>[6]</sup>。培养的 BMSCs 第三代细胞形态稳定,细胞活性较高,再次传代后逐渐表现出细胞老化迹象,故进一步实验可选用第三代的 BMSCs。从骨髓中提取的 BMSCs 混杂了许多细胞群,即便细胞来源一致,但无法明确 BMSCs 所占比例即细胞的纯度,因此非常有必要对 BMSCs 做鉴定。目前,BMSCs 的鉴定主要包括形态学特征、表面抗原、超微结构及多向分化能力等的检验<sup>[17]</sup>。BMSCs 是一种贴壁生长的细胞,形态为长梭形,并且具有很强的增殖能力<sup>[18]</sup>。现在许多研究报道,BMSCs 可以表达多种表面抗原,但没有特异性,目前认为 CD29、CD44 是 BMSCs 的重要抗原标志,CD31、CD45 是骨髓造血干细胞的表面抗原<sup>[19,20]</sup>。本实验通过流式细胞仪对培养的第三代 BMSCs 进行检测,结果提示 CD29 和 CD44 高表达,基本不表达 CD31 和 CD45,其符合 BMSCs 的表面标志物特征,说明培养的 BMSCs 可用于后续试验。

RNAi 技术是近些年发展起来的特异、高效、易操作的基因阻断技术,是通过抑制目的基因的转录或翻译而实现抑制该基因的表达。当细胞导入这种 shRNA 时,该目的基因的 mRNA 就会发生降解而导致基因的表达沉默<sup>[21]</sup>。RNAi 具备高特异性、高效性及内在生物学反应,因此已被广泛用于全基因组筛选、功能基因组学研究、生物技术研究及医学研究等<sup>[22,23]</sup>。RNAi 的关键是选择比较合适的载体使双链 RNA 进入宿主细胞,常用的载体系统有病毒载体和非病毒载体。病毒载体是近些年来研究的热点,具有低毒、高效等优点,主要包括慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体等。目前广泛应用的是慢病毒载体,具有操作技术成熟并能够实现高效转染,对于分裂和不分裂的细胞均有感染性,且能够长期稳定表达病毒基因等优点<sup>[24-26]</sup>。因此本实验采用慢病毒载体作为实施 RNAi 的工具,对目的基因 CX3CL1 进行了高效特异性的抑制。根据 PCR 及测序的结果判断,靶向基因的 shRNA 与载体 pLVX-shRNA2 连接情况符合预期设计,且通过高效的病毒包装系统得到了高滴度(5-6 $\times$ 10<sup>8</sup>TU/mL)的慢病毒颗粒。然后将慢病毒感染 BMSCs,使 BMSCs 的 CXCL1 得到了显著的沉默,为后续研究 CX3CL1 的作用机制奠定了基础。

## 参 考 文 献(References)

- [1] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394( 10204) : 1145-1158
- [2] Feigin V L, Forouzanfar M H, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 245-255
- [3] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8 (4): 315-317
- [4] Song M, Mohamad O, Gu X, et al. Restoration of intracortical and thalamocortical circuits after transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells into the ischemic brain of mice [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(11): 2001-2015
- [5] Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, et al. Defining GM-CSF and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models[J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5752-5765
- [6] Ma Y, Wang J, Wang Y, et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 157: 247-272
- [7] Wang J, Xing H, Wan L, et al. Treatment targets for M2 microglia polarization in ischemic stroke[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 518-525
- [8] Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (2): 1181-1194
- [9] Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair [J]. *Brain*, 2015, 138( Pt 5): 1138-1159
- [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] Luo P, Chu SF, Zhang Z, et al. Fractalkine/CX3CR1 is involved in the cross-talk between neuron and glia in neurological diseases [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 146: 12-21
- [12] Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor[J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9 (7): 917
- [13] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315- 317
- [14] Zhou C, Zhang C, Chi S, et al. Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide[J]. *Brain Res*, 2009, 1269: 23
- [15] Xin H, Chopp M, Shen LH, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells decrease transforming growth factor beta1 expression in microglia/macrophages and down-regulate plasminogen activator inhibitor 1 expression in astrocytes after stroke [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 542: 81
- [16] VIA A G, FRIZZIERO A, OLIVAF. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources [J]. *Muscles Ligaments Tendons*, 2012, 2(3): 154-162
- [17] PETERBAUER-SCHERB A, VAN G M, MEINLA, et al. Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2010, 12(4): 485-490
- [18] KOBOLAK J, DINNYESA, MEMICA, et al. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial microengineering of their niche[J]. *Methods*, 2016, 99(12): 62-68
- [19] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315- 317
- [20] De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow [J]. *Immunol Lett*, 2003, 89 (2-3): 267-270
- [21] Goyal BR, Patel MM, Soni MK, et al. Therapeutic opportunities of small interfering RNA[J]. *Fundamental Clinical Pharmacology*, 2010, 23(4): 367-386
- [22] Haussecker D. Current tissues of RNAi therapeutics delivery and development[J]. *J Control Release*, 2014, 195: 49-54
- [23] Swamy MN, Wu H, Shankar P. Recent advances in RNAi-based strategies for therapy and prevention of HIV-1/AIDS [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 103: 174-186
- [24] Ligtenberg MA, Picod CY, Shmushkovich T, et al. Self-delivering RNA interference targeting PD1 improves tumor specific T cell functionality for adoptive cell therapy of malignant melanoma[J]. *Mol Ther*, 2018, 26(6): 1482-1493
- [25] Scarborough RJ, Gatignol A. RNA interference therapies for an HIV1 functional cure[J]. *Viruses*, 2017, 10(1): pii: E8
- [26] Bobbin ML, Rossi JJ. RNA interference ( RNAi )-based therapeutics: delivering on the promise [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 56: 103-122