

间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的作用及机制研究

王道辉, 刘拥军, 刘广洋

脑卒中是全球第二大死亡原因, 成人致死率和致残率极高^[1]。其中, 缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 占比高达 85%^[2]。据统计, 世界上每年约有 1500 万人发生缺血性脑卒中, 其中 500 万人死亡, 500 万人致长期残疾^[3], 严重威胁人类健康, 给家庭生活带来巨大负担。缺血性脑卒中损伤区域从坏死区“核心”到围绕核心的“半暗带”^[4], 严重影响神经功能和行为表现^[5]。目前, 脑血管栓塞是缺血性脑卒中的主要诱因, 表现为暂时性的脑组织缺血, 导致氧气和营养物质输送不足, 引发脑组织损伤。并且, 脑血流再灌注还会造成不可逆的二次损伤。因此, 缺血性脑卒中仍是世界上有待解决的重大医学难题。基于发病机制, 目前常用治疗手段为溶栓治疗, 如重组组织型纤维蛋白溶酶原激活剂 (recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA) 和血管内再灌注。但是, 溶栓治疗具有严格的治疗时间窗——仅 4.5 h, 只有极少数患者能够在发病后及时使用药物, 完成干预治疗。并且, rt-PA 的副作用存在脑出血和加重脑卒中损伤的可能性^[6]。因此, 新的有效治疗药物和策略一直备受世界关注。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 可从多种来源的组织分离得到, 包括骨髓 (bone marrow, BM)、脂肪细胞 (adipose, AD) 和脐带血 (umbilical cord blood, UC) 等。近期一项研究表明, BM-MS-C 倾向于脑和脊髓损伤治疗, AD-MS-C 倾向于卵巢损伤治疗和皮肤再生, UC-MS-C 倾向于肺部疾病和急性呼吸窘迫综合征治疗^[7]。MS-C 的多元分化特性也是科学研究的重点内容, 可分化为成骨细胞、成软骨细胞和脂肪细胞等。并且, MS-C 也具有分化为神经元细胞的潜能^[8]。目前, 移植 MS-C 已成为缺血性疾病一种新的治疗手段, 主要包括脑卒中、冠状动脉疾病和外周动脉疾病等。多项研究表明, MS-C 出色的神经保护作用治疗缺血性脑卒中的重要原因^[9-10]。最近一项研究, 大鼠发生缺血性脑卒中, 静脉注射的 BM-MS-C 可迁移至大脑缺血边界区 (半暗带), 分化为神经元和星形胶质细胞, 减小梗死面积并恢复神经功能^[11]。缺血半暗带存在大量处于休眠或半休眠状态的神经元, 因此, 如何挽救半暗带细胞及其机制已经成为缺血性脑卒中临床治疗的关键和热点。本文就 MS-C 治疗缺血性脑卒中的作用及机制研究进展进行综述, 以期为基础研究和临床工作提供参考和指导。

1 MSC 治疗缺血性脑卒中的作用及机制

目前的研究报道表示, MS-C 主要通过旁分泌作用、免疫调节作用和抗细胞凋亡作用促进神经组织损伤修复, 恢复神经功能, 减少脑梗死面积, 促进神经和血管生成等, 从而发挥治疗缺血性脑卒中的作用。

1.1 MS-C 的旁分泌作用

干细胞研究初期, 人们将 MS-C 这种恢复性功能归因于干细胞的分化与再生, 替代损伤细胞。例如, 当用于治疗中枢神经系统疾病时, MS-C 可增殖成神经元和胶质细胞, 取代坏死细胞, 发挥神经保护作用^[12]。随着研究的不断深入, 以及 MS-C 难以穿透血脑屏障的特性, 更多的研究倾向于认为 MS-C 的旁分泌因子, 包括外泌体和胞外囊泡, 是发挥治疗作用的主要因素^[11, 13]。

在脑卒中损伤区域, MS-C 可诱导多种生长因子表达, 包括脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质细胞源性因子 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、神经胶质细胞源性神经营养因子和肝细胞生长因子等, 通过减少脑梗死面积和恢复神经功能改善脑卒中损伤。

研究表明, 相比于 MS-C, 外泌体具有更高的穿透血脑屏障的能力, 达到梗死区域发挥治疗作用^[14]。大鼠脑卒中 24 h 后, 静脉注射 MS-C 外泌体, 显著改善神经功能、增强神经突重塑、神经再生和血管再生^[15]。并且, MS-C 外泌体可通过介导 miR-133b 转移至星形胶质细胞和神经元细胞, 调控基因表达, 有助于脑卒中后的神经突重塑和神经功能恢复^[16]。此外, 使用 MS-C 胞外囊泡进行短期治疗, 也能达到与 MS-C 组类似的改善脑卒中治疗效果^[17]。即使是 19~20 月龄的老年大鼠, MS-C 胞外囊泡也可促进大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 后的神经功能恢复和梗死区域重塑^[18]。以上研究结果均表明, MS-C 旁分泌因子对缺血性脑卒中中具有较好的治疗效果。

下面对 MS-C 旁分泌因子进行分类表述。

1.1.1 BDNF 神经营养因子在缺血性脑损伤的修复中具

基金项目: 北京市科技计划课题 (Z221100007922028)

作者单位: 100176 北京贝来生物科技有限公司

通信作者: 刘广洋, Email: liugy04@163.com

收稿日期: 2022-08-09

有重要作用,以 BDNF 尤为突出。这是一种促进神经细胞增殖和存活的重要神经营养因子,尤其是海马区域,是重要的脑卒中调控因子^[19]。动物实验证明,通过颅内注射 BDNF 可有效减少脑梗死面积。并且,MSC 转染 BDNF 后治疗 MCAO 大鼠,可增加脑中的 BDNF 水平,减少病变面积,改善认知功能和行为能力^[20]。然而,新生大鼠 MCAO 后,与 MSC 治疗组相比,过表达 BDNF 的 MSC 治疗组效果稍有提升,但并无显著性差异^[21],可能是由于新生大鼠大脑处于活跃期,内源性修复是 MSC 的主要治疗机制。但是,这并不能证明 BDNF 减轻缺血性脑卒中的效果不明显。进一步的研究证明,新生小鼠缺氧缺糖诱发脑卒中,采用低温治疗手段,可诱导 BDNF 通过 p75 神经营养因子受体和酪氨酸激酶受体 B,激活丝裂原活化蛋白激酶,发挥神经源性作用,修复脑卒中损伤^[22]。由此可见,BDNF 在发挥神经修复方面具有重要作用。

1.1.2 VEGF 研究人员发现,缺血半暗带微血管密度较高的患者生存时间较长,提示血管生成在脑卒中患者预后中的重要地位^[23]。初步研究发现,MSC 胞外囊泡增加了内皮细胞的迁移,显著激活信号转导和转录激活因子 3,抑制自噬和促进血管生成,减轻脑卒中损伤^[24]。在血管生成方面,VEGF 既是主要血管重塑调控因子,也是 MSC 重要旁分泌因子。研究表明,MSC 可增加内源性 VEGF 水平,加速血管生成,增强血管稳定性,增加脑缺血边界区血管总表面积^[25-26]。进一步研究表明,MSC 不仅促进脑组织内皮细胞分泌 VEGF,促进血管再生和支持缺血后神经再生,还能激活 Notch 信号通路促进缺血性脑卒中后血管生成^[27],并激活 Akt/ERK 信号轴发挥抗凋亡作用^[28]。联合型实验发现,使用缺血性心脏提取物与 MSC 共培养,提取物中 IL-22 的上调促进 MSC 分泌 VEGF 和人恶性脑肿瘤缺失蛋白 1,并向内皮细胞传递,增强迁移和增殖活性,促进血管生成,修复脑卒中损伤^[29]。除 VEGF 外,MSC 分泌的基质金属蛋白酶 2 也在调控脑卒中后的血管生成中发挥重要作用,与 VEGF 协同改善脑卒中^[30]。以上研究表明,VEGF 介导血管生成在脑卒中修复中的不可或缺性。

1.1.3 色素上皮衍生因子 色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 是 MSC 重要外泌体,目前已有多项在众多领域的研究报道。在缺血性脑卒中疾病模型中,使用 siRNA 抑制 MSC 表达 PEDF,与 siRNA-NC 组相比,MSC 失去了保护氧糖剥夺再灌注处理的 N2a 细胞和 MCAO 大鼠免受高尔基体应激反应的作用^[31]。另外,MSC 分泌的 PEDF 可通过促进 PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化,调节细胞代谢和应激^[31-32]。由此可见, PEDF 调控应激是治疗缺血性脑卒中的主要作用机制。

1.1.4 SDF-1 除了直接性改善作用, MSC 的促归巢作用也得到深入研究。一项动物实验发现,脑卒中梗死区域的胶质细胞能够快速分泌 SDF-1,通过移植转染过表达 CXCR4 (SDF-1 的受体)的 MSC,可显著增强 MSC 向缺血区域的迁移程度,增强神经功能修复能力,减小脑梗死面积,缩

短治疗时间,短期内改善大鼠行为能力^[33]。这种现象的出现是因为, SDF-1 与 CXCR4 在调节脑卒中时发挥协同作用,尤其是在缺血半暗带尤为突出。这类基因修饰 MSC 的方式为治疗脑卒中提供新的策略。类似的研究报道,在大鼠发生 MCAO 后的 1、4 和 7 d 静脉注射等量 MSC,发现纹状体中的 SDF-1 水平随时间延长而增加,并且 MSC 也随着时间延长从皮质向纹状体缓慢迁移^[34]。不仅如此,脑卒中大鼠给予 MSC,可诱导内源性分泌的 bFGF 和 SDF-1 表达水平上调,共同发挥神经营养和保护作用^[35-36]。由此可见, SDF-1 不仅对 MSC 的迁移具有重要作用,加速治疗效果,而且还能促进 MSC 在病灶区域发挥更佳的修复作用。

1.1.5 其他旁分泌因子 评价缺血性脑卒中损伤程度时,脑梗死面积是重要的参考指标。研究发现, BM-MS-C 可显著提升半暗区 bFGF 的表达水平,减少梗死面积和改善神经功能^[26]。并且, bFGF 也具有血管重塑的能力,与 VEGF 发挥协同作用^[37]。音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 是一种分泌糖蛋白,能够调节细胞增殖、迁移和分化。动物实验表明,注射 MSC 能够显著增强小鼠脑卒中后脑部 SHH 和 t-PA 蛋白表达,并且,当联合使用环巴胺 (平滑受体抑制剂) 阻断 SHH 通路时,出现对立性结论。结果提示, MSC 介导 SHH 通路,刺激 t-PA 表达和活性,发挥溶栓治疗类似效果,恢复脑卒中后神经功能^[38]。

除上述内容中提到的 MSC 旁分泌因子之外,仍有其他因子参与 MSC 治疗缺血性脑卒中的作用机制,如胰岛素样生长因子 1、表皮生长因子和神经生长因子等,这些因子在抑制神经炎症、促进神经再生等方面发挥作用。

1.2 MSC 的免疫调节作用

缺血性脑卒中发生时,损伤的脑组织导致的危险相关分子模式可触发无菌性炎症反应,从而快速活化缺血区与半暗区的小胶质细胞和星形胶质细胞。小胶质细胞的活化一方面具有清除碎片和分泌抗炎细胞因子能力,支持内源性脑修复^[39];另一方面小胶质细胞和星形胶质细胞的活化分泌大量炎症因子,引发免疫过激,易引起神经细胞凋亡。

研究发现, MSC 对脑卒中后的中枢免疫反应也存在双向调节功能:一方面可促使脑组织中的 B 细胞、NK 细胞和 T 细胞数量显著增加,发挥免疫促进作用^[40],另一方面,高水平的炎症因子 (阈值浓度约为 400 pg/ml) 可激活 MSC 免疫抑制功能^[41],从而对淋巴细胞增殖和炎症因子产生双重抑制作用,诱导抗炎表型^[42]。

研究证实,损伤区域小胶质细胞是 MSC 发挥免疫调节作用的重点靶细胞^[43]。实验证明,脑卒中后移植过表达抗炎细胞因子 IL-13 的 MSC,发挥免疫调节作用,有效调控主要聚集于受损区域皮质与纹状体的小胶质细胞和巨噬细胞极化,使功能表型由脑损伤的促炎 M1 表型向神经保护的抗炎 M2 表型转变,减轻脑卒中炎症反应,促进组织修复^[44-45]。这些研究阐明了 MSC 调控小胶质细胞向抗炎表型转变的机制。此外,相比于 2D 培养的 MSC, 3D 培

养的 MSC 降低小胶质细胞对缺血损伤的促炎反应效果更佳,显著减少脑梗死面积,增加植入缺血组织的 MSC 细胞数量^[46]。

进一步研究表明,PI3K/Akt/RhoGTPase 是 MSC 诱导小胶质细胞极化发挥免疫调节作用的重要信号通路^[45]。并且,抑制 NF- κ B 活性、分泌 IL-6 和降低 TNF- α 表达,也是 MSC 的抗炎作用机制的一部分^[47]。

近期研究发现,炎症在 COVID-19 诱发脑卒中时发挥关键性作用,通过注射 MSC 外泌体可显著减轻神经炎症,促进神经和血管生成,改善脑卒中后功能恢复。因此,移植 MSC 外泌体有望成为改善 SARS-CoV-2 介导的炎症反应和 COVID-19 介导的缺血性疾病的新治疗策略^[48]。

1.3 MSC 调控细胞凋亡

细胞凋亡是缺血性脑卒中重要的神经元损伤机制, MSC 可抑制神经细胞凋亡,发挥神经保护的作用。研究发现, BM-MS-C 缺氧预处理再移植治疗,可通过抑制 caspase-3 激活和增加缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 表达,降低缺血再灌注诱发的自身凋亡程度,显著提高缺血性脑卒中治疗效果^[49]。AD-MS-C 也具有优秀的神经保护作用,移植后产生的外泌体可抑制 KDM6B/BMP2/BMF 信号通路,减轻 MCAO 大鼠神经元凋亡^[50]。此外,采用 MSC 治疗可促使抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达显著升高,而与神经元凋亡相关 p53 蛋白表达明显降低,增加缺血半暗区神经元密度^[51]。不仅如此, MSC 治疗还可减轻缺血性脑卒中引起的小胶质细胞焦亡,并且,缺氧预处理的 MSC 对脑出血引起损伤的治疗效果更佳,进一步减少细胞焦亡出现^[52]。

2 基因修饰 MSC 治疗缺血性脑卒中的作用

近些年来,众多研究团队借助基因工程和基因编辑技术修饰 MSC,使其能特异性表达或抑制某种基因,发挥长期而稳定的疾病干预治疗作用效果。研究表明,注射过表达 HIF-1 α 的 MSC,可显著减少 MCAO 大鼠脑梗死面积,改善大鼠运动功能^[53]。而通过 siRNA 方法基因沉默 CUEDC2 后的 MSC,能够显著提高其对缺血性脑卒中诱导的神经元损伤治疗效果。进一步实验发现,上调神经元谷胱甘肽过氧化物酶 1 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 表达水平,并同时抑制 NF- κ B 激活,是 siRNA-CUEDC2-MS-C 发挥脑卒中修复作用的机制^[54]。

除了达到直接治疗作用效果,提升 MSC 归巢能力也是基因修饰的重要目的。以往研究表明, CXCL12/CXCR4 是介导 MSC 向损伤部位迁移的主要信号轴^[55]。近期研究发现,梗死区域 CCR2 (CCL2 受体) 水平显著升高,可诱导过表达 CCL2 (促炎趋化因子) 的 UC-MS-C 向大脑受损区域迁移,增强血管生成和神经生成,减少神经炎症,显著改善神经功能和梗死面积^[56]。不仅如此, MSC 过表达 CCR2 也能达到类似的治疗效果^[57]。提示 CCL2/CCR2 也是促 MSC 归巢信号轴。并且, MSC 过表达神经源性转录

因子神经源因子 1,也可显著增强 MSC 的归巢能力,提高 MCAO 大鼠模型的 MSC 移植效率^[58]。

基于以上内容不难发现,无论是靶向性调节表达,还是促归巢提高治疗效率,基因修饰后的 MSC 具有更多可能性,能够突破传统基因修饰的局限,在未来将会有更长远的发展。

3 MSC 的给药途径

不同给药途径也是影响 MSC 治疗效果的重要影响因素。血脑屏障是阻碍 MSC 进入脑卒中病灶的主要限制条件。在脑卒中急性期内,虽然静脉注射 MSC 只有极少量分布于损伤区域^[59],却显著减轻炎症反应,维持血脑屏障完整性,减轻继发性脑损伤^[60]。由此可见,高效的给药方式是精准治疗的必要条件。

研究表明,虽然颅内给予 MSC 可靶向聚集到受损大脑,但也更具侵袭性,易造成机械损伤,不利于恢复。而相比于颅内给药,动脉和静脉内给药治疗效果更佳^[61]。例如,通过动脉注射移植 MSC 可绕过体循环,经血脑屏障,分布于脑卒中梗死和缺血区域^[62],但存在发生细胞栓塞和脑血流减少的风险。相对应的,静脉注射 MSC 需通过体循环和肺循环,最终穿透血脑屏障才能到达梗死区域,因此有效治疗细胞数目更为有限,但仍可促进神经功能恢复,减少梗死面积,安全有效,是最为常用的干细胞移植治疗脑卒中的给药方式^[63]。并且,脑卒中增加血脑屏障通透性,即使采用静脉注射,也能达到较好的 MSC 向脑损伤区域迁移的归巢现象。此外,鞘内注射和鼻内给药也是可选择的给药方式。

4 小结与展望

近些年来,从干细胞研究的简单分化与转化认知,到目前 MSC 机制多样化研究的不断深入与拓展,干细胞研究领域的发展也变得成熟化与新颖化。但是也不可避免地存在一些问题。首先, MSC 机制研究存在不够深入的缺陷,无法为精准治疗提供较好的研究基础。并且,基于 MSC 自身的复杂性与多向性特点,机制探索研究的开展也变得更加艰难。其次,探索 MSC 作用机制的方法与措施仍然较为局限,是快速发展通道上的限制性阻碍,技术革新刻不容缓。最后, MSC 获取渠道有限,伦理要求高,制备繁琐,研究开展困难。

目前来看,不仅动物实验验证了干细胞的治疗效果,提出 MSC 治疗缺血性脑卒中的可行性,在众多临床试验中, MSC 治疗缺血性脑卒中也在稳步推进中。截至到最近,美国临床试验数据库中已注册了近 1400 项 MSC 治疗相关疾病的临床试验,其中 22 例是 MSC 治疗缺血性脑卒中相关研究。完成的临床试验证明, MSC 对缺血性脑卒中患者神经功能具有显著改善作用,并证实其有效性与长期安全性^[64-65]。在未来,将会有更多 MSC 医学成果完成转化,投入医疗行业,为世界人民的健康与安全保驾护航。

参考文献

- [1] Shinozuka K, Dailey T, Tajiri N, et al. Stem cells for neurovascular repair in stroke. *J Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(4):12912.
- [2] Cao W, Li P. Effectiveness and safety of autologous bone marrow stromal cells transplantation after ischemic stroke: a meta-analysis. *Med Sci Monit*, 2015, 21:2190-2195.
- [3] Roy-O'Reilly M, McCullough LD. Sex differences in stroke: the contribution of coagulation. *Exp Neurol*, 2014, 259:16-27.
- [4] Müller GC, Loureiro SO, Petteuzzo LF, et al. Effects of intranasal guanosine administration on brain function in a rat model of ischemic stroke. *Purinergic Signal*, 2021, 17(2):255-271.
- [5] Marcondes LA, Nachtigall EG, Zanluchi A, et al. Involvement of medial prefrontal cortex NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors in social recognition memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem*, 2020, 168:107153.
- [6] Wang X, Rosell A, Lo EH. Targeting extracellular matrix proteolysis for hemorrhagic complications of tPA stroke therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008, 7(3):235-242.
- [7] Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):272.
- [8] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 2004, 113(12):1701-1710.
- [9] Wang LQ, Lin ZZ, Zhang HX, et al. Timing and dose regimens of marrow mesenchymal stem cell transplantation affect the outcomes and neuroinflammatory response after ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(4):317-326.
- [10] Shinozuka K, Dailey T, Tajiri N, et al. Stem cell transplantation for neuroprotection in stroke. *Brain Sci*, 2013, 3(1):239-261.
- [11] Song M, Lee JH, Bae J, et al. Human dental pulp stem cells are more effective than human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in cerebral ischemic injury. *Cell Transplant*, 2017, 26(6):1001-1016.
- [12] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*, 2006, 441(7097):1094-1096.
- [13] Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*, 2004, 35(10):2385-2389.
- [14] Zhang ZG, Buller B, Chopp M. Exosomes - beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(4):193-203.
- [15] Xin H, Li Y, Cui Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(11):1711-1715.
- [16] Xin H, Li Y, Liu Z, et al. MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. *Stem Cells*, 2013, 31(12):2737-2746.
- [17] Doeppner TR, Herz J, Görgens A, et al. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(10):1131-1143.
- [18] Dumbava DA, Surugiu R, Börger V, et al. Mesenchymal stromal cell-derived small extracellular vesicles promote neurological recovery and brain remodeling after distal middle cerebral artery occlusion in aged rats. *Geroscience*, 2022, 44(1):293-310.
- [19] Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008, 132(4):645-660.
- [20] Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Neuroscience*, 2005, 136(1):161-169.
- [21] van Velthoven CT, Sheldon RA, Kavelaars A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke. *Stroke*, 2013, 44(5):1426-1432.
- [22] Diaz J, Abiola S, Kim N, et al. Therapeutic hypothermia provides variable protection against behavioral deficits after neonatal hypoxia-ischemia: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *Dev Neurosci*, 2017, 39(1-4):257-272.
- [23] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 1994, 25(9):1794-1798.
- [24] Xia Y, Ling X, Hu G, et al. Small extracellular vesicles secreted by human iPSC-derived MSC enhance angiogenesis through inhibiting STAT3-dependent autophagy in ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):313.
- [25] Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacol Ther*, 2014, 143(2):181-196.
- [26] He B, Yao Q, Liang Z, et al. The dose of intravenously transplanted bone marrow stromal cells determines the therapeutic effect on vascular remodeling in a rat model of ischemic stroke. *Cell Transplant*, 2016, 25(12):2173-2185.
- [27] Guo F, Lv S, Lou Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell Biol Int*, 2012, 36(11):997-1004.
- [28] Zheng XR, Zhang SS, Yang YJ, et al. Adenoviral vector-mediated transduction of VEGF improves neural functional recovery after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats. *Brain Res Bull*, 2010, 81(4-5):372-377.
- [29] Xiao Y, Zhang Y, Li Y, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells pretreated with ischemic rat heart extracts promote angiogenesis via the delivery of DMBT1. *Cell Transplant*, 2022, 31:9636897221102898.
- [30] Nam HS, Kwon I, Lee BH, et al. Effects of mesenchymal stem cell treatment on the expression of matrix metalloproteinases and angiogenesis during ischemic stroke recovery. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0146628.
- [31] He J, Liu J, Huang Y, et al. OM-MSCs alleviate the golgi apparatus stress response following cerebral ischemia/reperfusion injury via the PEDF-PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:4805040.
- [32] Ho TC, Chiang YP, Chuang CK, et al. PEDF-derived peptide promotes skeletal muscle regeneration through its mitogenic effect on muscle progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(3):C159-C168.
- [33] Bang OY, Jin KS, Hwang MN, et al. The effect of CXCR4 overexpression on mesenchymal stem cell transplantation in ischemic stroke. *Cell Med*, 2012, 4(2):65-76.
- [34] Lee SH, Jin KS, Bang OY, et al. Differential migration of mesenchymal stem cells to ischemic regions after middle cerebral artery occlusion in rats. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0134920.
- [35] Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res*, 2010, 88(5):1017-1025.

- [36] Toyoshima A, Yasuhara T, Kameda M, et al. Intra-arterial transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells mounts neuroprotective effects in a transient ischemic stroke model in rats: analyses of therapeutic time window and its mechanisms. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0127302.
- [37] Kumagai M, Marui A, Tabata Y, et al. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels*, 2016, 31(5):713-721.
- [38] Ding X, Li Y, Liu Z, et al. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(7):1015-1024.
- [39] Ma Y, Wang J, Wang Y, et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*, 2017, 157:247-272.
- [40] Hu B, Chen S, Zou M, et al. Effect of extracellular vesicles on neural functional recovery and immunologic suppression after rat cerebral apoplexy. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1-2):155-162.
- [41] Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*, 2012, 19(9):1505-1513.
- [42] Duijvestein M, Wildenberg ME, Welling MM, et al. Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*, 2011, 29(10):1549-1558.
- [43] Sánchez-Castillo AI, Sepúlveda MR, Marín-Teva JL, et al. Switching roles: beneficial effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on microglia and their implication in neurodegenerative diseases. *Biomolecules*, 2022, 12(2):219.
- [44] Hamzei Taj S, Le Blon D, Hoornaert C, et al. Targeted intracerebral delivery of the anti-inflammatory cytokine IL13 promotes alternative activation of both microglia and macrophages after stroke. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):174.
- [45] Xin WQ, Wei W, Pan YL, et al. Modulating poststroke inflammatory mechanisms: Novel aspects of mesenchymal stem cells, extracellular vesicles and microglia. *World J Stem Cells*, 2021, 13(8):1030-1048.
- [46] Li Y, Dong Y, Ran Y, et al. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):358.
- [47] Walker PA, Harting MT, Jimenez F, et al. Direct intrathecal implantation of mesenchymal stromal cells leads to enhanced neuroprotection via an NF κ B-mediated increase in interleukin-6 production. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(6):867-876.
- [48] Norouzi-Barough L, Asgari Khosroshahi A, Gorji A, et al. COVID-19-induced stroke and the potential of using mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in the regulation of neuroinflammation. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(1):37-46.
- [49] Chen J, Yang Y, Shen L, et al. Hypoxic preconditioning augments the therapeutic efficacy of bone marrow stromal cells in a rat ischemic stroke model. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(6):1115-1129.
- [50] Zhang Y, Liu J, Su M, et al. Exosomal microRNA-22-3p alleviates cerebral ischemic injury by modulating KDM6B/BMP2/BMF axis. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):111.
- [51] Zhu Y, Guan YM, Huang HL, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(5):585-591.
- [52] Liu J, He J, Huang Y, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate microglial pyroptosis after intracerebral hemorrhage. *Ann Transl Med*, 2021, 9(17):1362.
- [53] Lv B, Li F, Han J, et al. Hif-1 α overexpression improves transplanted bone mesenchymal stem cells survival in rat MCAO stroke model. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10:80.
- [54] Huang Y, Xiao X, Xiao H, et al. CUEDC2 ablation enhances the efficacy of mesenchymal stem cells in ameliorating cerebral ischemia/reperfusion insult. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(3):4335-4356.
- [55] Hocking AM. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2015, 4(11):623-630.
- [56] Lee S, Kim OJ, Lee KO, et al. Enhancing the therapeutic potential of CCL2-overexpressing mesenchymal stem cells in acute stroke. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7795.
- [57] Huang Y, Wang J, Cai J, et al. Targeted homing of CCR2-overexpressing mesenchymal stromal cells to ischemic brain enhances post-stroke recovery partially through PRDX4-mediated blood-brain barrier preservation. *Theranostics*, 2018, 8(21):5929-5944.
- [58] Kim GH, Subash M, Yoon JS, et al. Neurogenin-1 overexpression increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells through enhanced engraftment in an ischemic rat brain. *Int J Stem Cells*, 2020, 13(1):127-141.
- [59] Okuma Y, Wang F, Toyoshima A, et al. Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury. *Neurosci Lett*, 2013, 554:156-161.
- [60] Tang G, Liu Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 upregulation after cerebral ischemia. *Stem Cells*, 2014, 32(12):3150-3162.
- [61] Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(2):275-283.
- [62] Dabrowska S, Andrzejewska A, Strzemecki D, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate neuroinflammation evoked by focal brain injury in rats. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1):216.
- [63] Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, et al. Effects of intravenous administration of allogeneic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(1):11.
- [64] Deng L, Peng Q, Wang H, et al. Intrathecal injection of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in treatment of patients with severe ischemic stroke: study protocol for a randomized controlled observer-blinded trial. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(2):170-177.
- [65] Levy ML, Crawford JR, Dib N, et al. Phase I/II study of safety and preliminary efficacy of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Stroke*, 2019, 50(10):2835-2841.