

胆红素对神经干细胞活性和增殖的影响研究

吴翠萍, 朱一丹, 李春燕, 殷善开

上海交通大学医学院附属第六人民医院耳鼻咽喉头颈外科/上海市睡眠呼吸障碍疾病重点实验室/上海交通大学耳鼻咽喉研究所, 上海 200233

摘要: **目的** 探究胆红素对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)活性和增殖的影响。**方法** 分离培养小鼠 NSCs, 加入不同浓度的胆红素, 培养 2 d 后行活/死细胞染色; 培养 7 d 后行神经球形成、Ki-67 检测和转录组测序分析以探究胆红素对 NSCs 活性和增殖的影响。**结果** 1.71~6.84 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素对 NSCs 的活性无影响, 13.68 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素降低了 NSCs 的活性。0.17~6.84 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素促进 NSCs 的增殖, 当胆红素的浓度达到 13.68 $\mu\text{mol/L}$ 时, 促进增殖的作用消失。胆红素促进了 NSCs 的 Ki-67 表达。转录组结果显示胆红素组 184 个基因上调表达和 100 个基因下调表达, 差异基因与“细胞群体增殖调节”等生物学过程和 PI3K-AKT 等信号通路相关。**结论** 高浓度的胆红素对 NSCs 具有毒性作用, 低浓度的胆红素不影响 NSCs 活性, 并促进 NSCs 增殖。

关键词: 胆红素; 神经干细胞; 增殖; 转录组测序

中图分类号: R764.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2024)04-0001-06

引用格式: 吴翠萍, 朱一丹, 李春燕, 等. 胆红素对神经干细胞活性和增殖的影响研究[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2024, 38(4):1-6. WU Cuiping, ZHU Yidan, LI Chunyan, et al. Effect of bilirubin on the viability and proliferation of neural stem cells[J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2024, 38(4):1-6.

Effect of bilirubin on the viability and proliferation of neural stem cells

WU Cuiping, ZHU Yidan, LI Chunyan, YIN Shankai

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine / Shanghai Key Laboratory of Sleep Disordered Breathing / Otolaryngology Institute of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of bilirubin on neural stem cell (NSC) viability and proliferation. **Methods** Primary mouse NSCs were cultured with different concentrations of bilirubin, and live-dead cell staining was performed after 2 days of culture; neurosphere assay, Ki-67 assay, and transcriptome sequencing were performed after 7 days of culture to investigate the effects of bilirubin on NSC viability and proliferation. **Results** Approximately 1.71-6.84 $\mu\text{mol/L}$ bilirubin had no effect on NSC viability, while 13.68 $\mu\text{mol/L}$ bilirubin decreased NSC viability. Approximately 0.17-6.84 $\mu\text{mol/L}$ bilirubin promoted NSC proliferation, while this pro-proliferation effect disappeared when the bilirubin concentration reached 13.68 $\mu\text{mol/L}$. Bilirubin increased Ki-67 expression in NSCs. RNA Seq showed that bilirubin upregulated 184 genes and downregulated 100 genes. Gene Ontology analysis suggested that the differentially expressed genes were mainly related to “regulation of cell population proliferation” and other biological processes. KEGG analysis suggested that the differentially expressed genes were related to several pathways, such as the “PI3K-AKT signaling pathway”. **Conclusion** High bilirubin concentrations were toxic to NSCs, while low bilirubin concentrations had no effect on NSC viability and promoted NSC proliferation.

Key words: Bilirubin; Neural stem cells; Proliferation; RNA-Seq

胆红素脑病是常见的新生儿神经系统疾病, 听觉系统对胆红素尤其敏感^[1], 高胆红素血症已被世界卫生组织纳入导致听力障碍最为常见的致病因素之一^[2]。目前针对已经发生的胆红素神经毒性尚无有效防治措施^[3]。干细胞移植是极具潜力的神经系统疾病干预策略, 一项临床研究报道自体骨髓

源性造血干细胞移植治疗改善了黄疸患者的交谈能力、力量及排尿排便的能力^[4]。另一项动物研究报告脂肪干细胞移植改善了胆红素脑病模型大鼠的行走障碍及听觉脑干反应损伤^[5], 这些研究提示干细胞治疗有望应用于胆红素脑病的治疗。

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植可通

过多种机制(包括替代受损神经元、分泌神经营养因子等)来促进神经系统损伤的修复,目前已被运用在中风、阿尔茨海默病、帕金森等神经损伤和神经退行性疾病的治疗研究中^[6-8]。Yang 等^[9-10]将神经前体细胞移植到黄疸 Gunn 大鼠的基底节来治疗核黄疸引起的肌张力障碍,发现与非黄疸大鼠相比,在黄疸大鼠脑中移植细胞的存活率更高,并且移植细胞可通过广泛的神经纤维连接宿主苍白球,提示 NSCs 移植在胆红素脑病治疗中具有广阔前景。

移植 NSCs 在脑内的长期存活和增殖是达到功能修复的先决条件,了解脑内病理环境对移植 NSCs 的影响对提高其移植效率具有重要意义。然而,胆红素脑病患者脑内具有高浓度的胆红素,这种病理微环境对 NSCs 的影响尚未明确。为了明确胆红素对 NSCs 的影响,本研究探索不同浓度胆红素对 NSCs 活性和增殖的影响,并进行了转录组分析以探索胆红素对 NSCs 基因表达的影响,从而为建立胆红素脑病患者特殊病理微环境下的 NSCs 移植策略提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与试剂

C57BL/6J 小鼠购自上海杰思捷公司;木瓜蛋白酶购自美国 Worthington 公司;高糖 DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、B27 添加剂、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;N2 添加剂、DNase I 购自加拿大 STEMCELL 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维生长因子(fibroblast growth factor-basic, bFGF)购自美国 PeproTech 公司;基质胶购自美国 Corning 公司;Accutase、胆红素(B4126)、Olig2 抗体(MABN50)、维甲酸、DAPI 染色封片剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、4%多聚甲醛、TritonX-100、山羊血清购自上海生工生物工程有 限 公 司;Nestin 抗 体(ab6142)、Ki-67 抗 体(ab15580)、Tuj1 抗体(ab52623)、荧光二抗购自英国 Abcam 公司;GFAP 抗体(3670)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;活/死荧光染色试剂购自美国 ScienCell 公司。

1.2 NSCs 分离与培养

取胚胎期第 13.5 天(E13.5)的 C57BL/6J 胎鼠皮质,置于含 20 U/mL 木瓜蛋白酶和 20 U/mL Dnase I 的高糖 DMEM 培养基中消化 30 min,轻轻吹打 10 余次后离心,细胞沉淀用高糖 DMEM 培养基清洗 1 次,用 40 μm 细胞筛网过滤细胞,加入增殖培养基(含 2% B27, 1% N2, 20 ng/mL bFGF, 20 ng/mL EGF 的高糖 DMEM 培养基),于悬浮 6 孔板中培养。每隔 3~4 d 用 Accutase 消化传代。

1.3 NSCs 鉴定

为验证 NSCs 干性,取生长良好的神经球接种于基质胶包被的爬片(基质胶:PBS=1:200,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 30 min),贴壁 2 h 后进行 Nestin、Ki-67 免疫荧光染色。为验证 NSCs 分化能力,将 NSCs 单细胞悬液接种于基质胶包被的爬片,在分化培养基(含 2% B27、1%胎牛血清、1 $\mu\text{mol/L}$ 维甲酸的 DMEM/F12 培养基)中分化 7 d 后进行 Tuj1、GFAP 和 Olig2 免疫荧光染色。吸弃细胞培养基后,用 PBS 清洗 1 遍细胞,加入 4%多聚甲醛室温固定 15 min;PBS 洗 3 次,加入 0.5% TritonX-100,于室温通透 10 min;PBS 洗 3 次,加入 5%山羊血清,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min;分别加入一抗 Nestin(1:200)、Ki-67(1:200)、Tuj1(1:500)、GFAP(1:300)和 Olig2(1:300),于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,加入二抗抗鼠 Alexa Fluor[®]-488(1:500),抗兔 Alexa Fluor[®]-555(1:500),于室温避光孵育 1 h;PBS 洗 3 次,用含 DAPI 染液的封片剂封片。于普通荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察拍摄。

1.4 胆红素处理

用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解胆红素粉末至 0.17、0.86、1.71、3.42、6.84、13.68 mmol/L,分装后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。实验组中以培养基:胆红素储存液=1 000:1 加入相应浓度的胆红素储存液,即胆红素终浓度为 0.17、0.86、1.71、3.42、6.84、13.68 $\mu\text{mol/L}$ 。空白对照组加入等体积 PBS,载体对照组加入等体积 DMSO。胆红素见光易分解,全程应避光处理。

1.5 活死细胞荧光染色

神经细胞球消化后接种于提前包被好基质胶的培养皿底进行培养。待细胞贴壁良好后加入胆红素或 DMSO,48 h 后吸弃培养基,加入 1 mL 含 1 μL 活/死染液的 PBS 溶液,避光孵育 5 min 后,弃去染液,加入 PBS 后立即于荧光显微镜下观察拍照。每个样本取任意 3 个视野(590 $\mu\text{m}\times 590 \mu\text{m}$)拍摄,用 Image J 软件计数细胞,活细胞比例=活细胞数目/(活细胞数目+死细胞数目)。

1.6 神经球增殖实验

于 96 孔板每孔中加入 100 μL 含两倍终浓度胆红素或 DMSO 的增殖培养基,再接种 $1\times 10^4/\text{mL}$ 单细胞 NSCs 悬液 100 μL ,每组 3 个复孔。培养 7 d 后于光学显微镜下拍摄每孔细胞球的生长情况。用 Image J 软件测量所有球体直径,为减少测量误差,筛选直径 20 μm 以上的球体进行数量与直径分析。

1.7 Ki-67 表达检测

将 NSCs 按照 2 500/孔接种于 24 孔爬片,贴壁培养 7 d 后按照上述 1.3 中的步骤进行 Ki-67 免疫荧光染色。以 $2\times 10^4/\text{mL}$ 将 NSCs 接种于悬浮培养

6孔板,增殖7d后收集神经球进行实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 Ki-67 表达情况。采用 RNA 抽提试剂盒(上海碧云天公司)提取 RNA,反转录后得到 cDNA,用 SYBR 染料(南京诺微赞公司)进行 PCR 扩增。引物序列 Ki-67:正向 5'-TGAGTGATACAGGCTCCGTAC-3';反向 5'-TTT-GCTGCATTCCGAGTACTG-3'; GAPDH:正向 5'-A-ACGACCCCTTCATTGACCT-3';反向 5'-TGGAA-GATGGTGATGGGCTT-3'。每组3个样本,每样本设置3个复孔。以 GAPDH 为对照,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析基因表达的相对定量。

1.8 转录组测序及分析

取神经球实验中增殖7d的 DMSO 对照组及 $3.4 \mu\text{mol/L}$ 胆红素实验组 NSCs 进行转录组测序,每3个复孔作为一个样本,每组各3个样本。转录组测序和分析由上海欧易生物技术有限公司进行。提取样本总 RNA,质检后总 RNA 使用 Smarter 扩增试剂反转录并扩增 cDNA, cDNA 采用 Tn5 转座酶法建库:首先采用转座酶随机打断 cDNA 的同时对打断片段加上测序接头,随后用部分测序接头序列为引物对文库进行扩增富集,磁珠纯化扩增好的文库并用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后,使用 Illumina Nova 600 测序仪进行测序,产生 150 bp 的

的双端数据。选择 P 值 < 0.05 且 $\text{foldchange} > 2$ 或 $\text{foldchange} < 0.5$ 的基因为差异表达基因。对差异表达基因进行基因本体论(gene ontology, GO)、KEGG 通路富集分析。

1.9 统计学处理

应用 GraphPad Prism 9.3.1 软件进行数据分析及作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较采用非配对 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 原代 NSCs 的培养及鉴定

分离自 E13.5 胎鼠皮质的单细胞在 NSCs 增殖培养基中经过增殖、聚集逐渐形成神经球体(图1)。将神经球体贴壁后进行免疫荧光染色(图1), $(90.31 \pm 2.41)\%$ 的细胞呈现 NSCs 标记物 Nestin 阳性,提示球体大部分细胞为 NSCs,并有 $(45.9 \pm 10.57)\%$ 表达增殖标记物 Ki-67,提示细胞处于增殖期。细胞呈现以球体为中心,径向向外迁移,反映了良好的 NSCs 迁移能力。在分化培养基中培养7d后,NSCs 可以分化为 Tuj1 阳性的神经元,GFAP 阳性的星形胶质细胞以及 Olig2 阳性的少突胶质细胞(图1),表明培养的 NSCs 具有分化潜能。

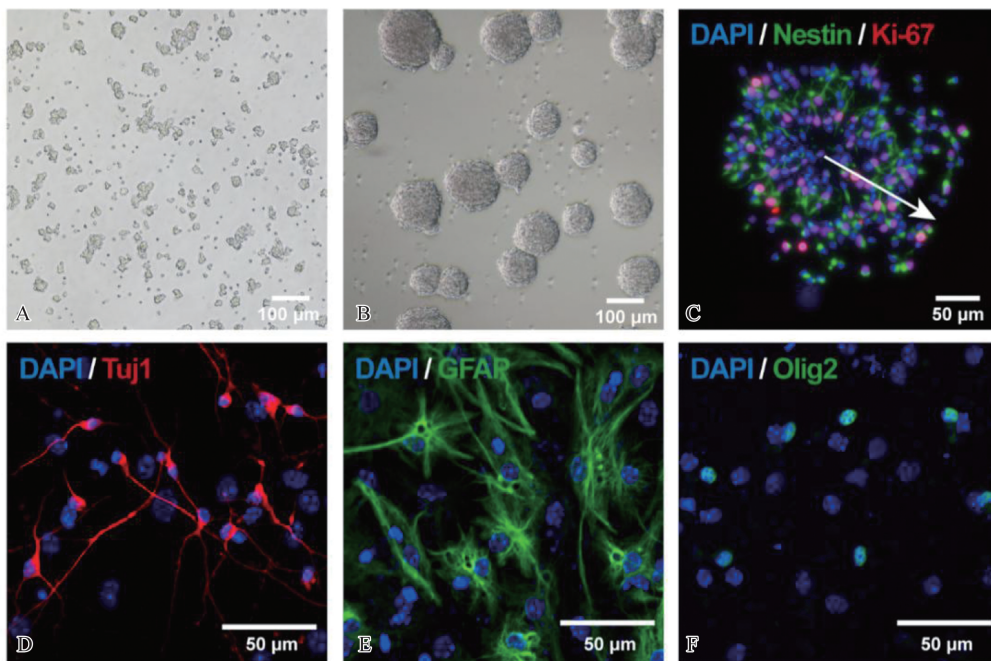


图1 NSCs 的培养与鉴定图像

A-B:增殖1d和3d的神经球光镜图(10 \times); C:神经球免疫荧光染色图像(20 \times),NSCs 标记物 Nestin,增殖标记物 Ki-67; D-F: NSCs 诱导分化7d后的免疫荧光染色图像(20 \times),神经元标记物 Tuj1、星形胶质细胞标记物 GFAP、少突胶质细胞标记物 Olig2

Figure 1 Images of NSC culture and identification.

A-B: Optical microscope images of neurospheres after 1 days and 3 days of proliferation (10 \times); C: Immunofluorescence staining image for the NSC marker Nestin and proliferation marker Ki-67 (20 \times); D-F: Immunofluorescence staining images for the neuronal marker Tuj1, the astrocyte marker GFAP, and the oligodendrocyte marker Olig2 after 7 days of differentiation (20 \times)

2.2 胆红素对 NSCs 活性的影响

NSCs 暴露于 0.1% DMSO 或不同浓度的胆红素 48 h 后,与 DMSO 对照组活细胞比例 (98.42 ± 0.29)% 相比,1.71、3.42、6.84 $\mu\text{mol/L}$ 的胆红素对 NSCs 细胞的活细胞比例并无影响,差异无统计学

意义 ($P=0.7827, 0.9988, 0.9883$)。当胆红素浓度升高到 13.68 $\mu\text{mol/L}$ 时,NSCs 活细胞比例下降 (95.55 ± 0.33)%,差异有统计学意义 ($P<0.001$),见图 2。

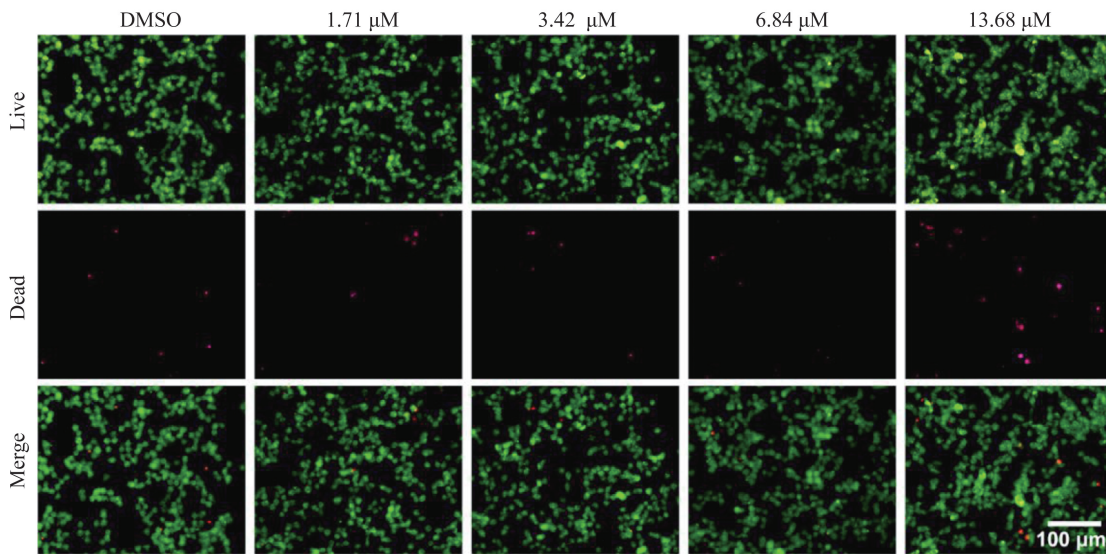


图 2 胆红素处理 48 h 后 NSCs 的活死染色荧光图像
Figure 2 Live-dead staining images of NSCs after 48 h of bilirubin exposure

2.3 胆红素对 NSCs 增殖的影响

在神经球实验中,NSCs 由单细胞不断增殖、聚集形成神经球体,NSCs 的数目随着球体的数量、体积的增大而增多,反映了 NSCs 的增殖情况。与空白对照组球体数量 (22.00 ± 3.46) 个相比,0.17~6.84 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素组球体数量均明显增加,其中 3.42 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素组球体数量最多 (55.67 ± 8.15) 个;与空白对照组平均直径 (69.09 ± 15.62) μm 相比,3.42、6.84 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素组增加了平均球体直径,分别是 (98.19 ± 10.15) μm ,

(118.30 ± 4.79) μm ,差异具有统计学意义 ($P=0.0228, 0.0003$),提示 0.17~6.84 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素促进 NSCs 增殖。当胆红素浓度升高至 13.68 $\mu\text{mol/L}$,球体数量与空白对照组差异无统计学意义 ($P=0.9630$),并且可观察到大量停滞生长的单细胞,提示 13.68 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素对 NSCs 的毒性作用可能已经抑制了其促增殖的作用,见图 3。以上结果提示,低浓度的胆红素促进 NSCs 增殖,而高浓度的胆红素对 NSCs 具有毒性作用。

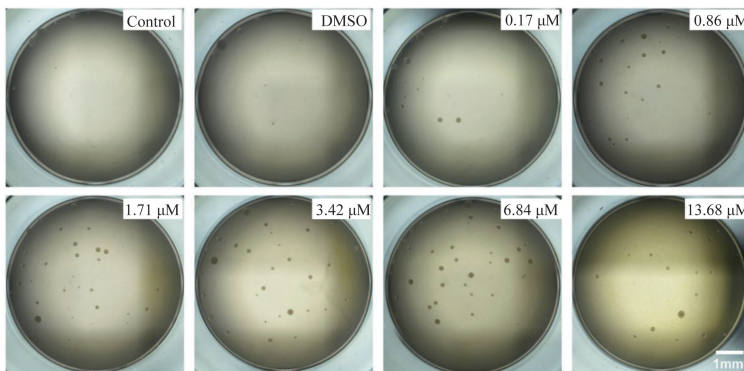


图 3 不同浓度胆红素条件下,NSCs 增殖 7 d 后的光镜图(4×)
Figure 3 Optical microscope images after 7 d of proliferation with different concentrations of bilirubin (4×)

2.4 胆红素对 NSCs Ki-67 表达的影响

根据神经球实验结果,我们选择促进 NSCs 增殖作用最明显的胆红素浓度 (3.42 $\mu\text{mol/L}$) 来进一步验证胆红素对 NSCs 增殖的影响。我们检测了 DMSO 组和 3.42 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素组 NSCs 增殖抗原

Ki-67 的表达情况。免疫荧光染色结果显示,胆红素组 Ki-67 阳性细胞比例 (41.19 ± 12.35)% 为 DMSO 组 (21.16 ± 7.34)% 的 1.9 倍,差异具有统计学意义 ($P<0.001$),见图 4。胆红素组的 Ki-67 mRNA 表达量为 DMSO 组的 1.9 倍,差异具有统计学意义

($P=0.0027$), 见图 4。这些结果进一步验证了胆红素促进 NSCs 的增殖。

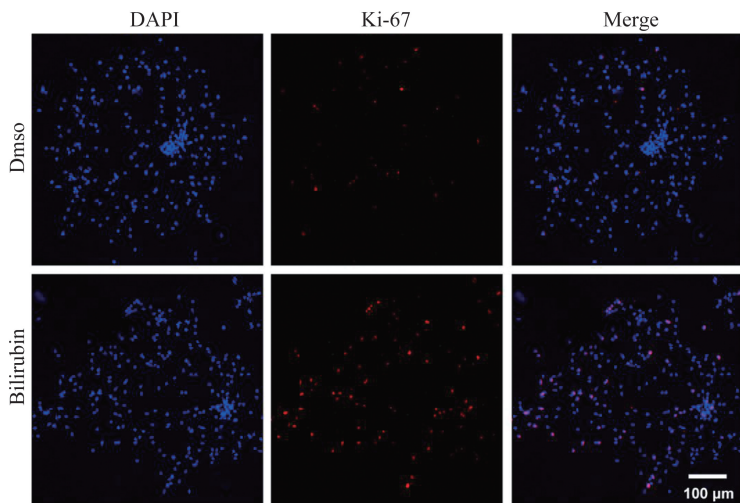


图 4 增殖标记物 Ki-67 表达
 Figure 4 Expression levels of proliferation marker Ki-67

2.5 胆红素对 NSCs 转录组的影响

为了探究胆红素对 NSCs 影响的潜在机制,我们对胆红素组和 DMSO 组的 NSCs 进行转录组测序。火山图(图 5A)显示了两组 NSCs 差异表达基因的整体分布情况,共有 184 个基因上调表达和 100 个基因下调表达。对差异表达基因进行 GO 生物过程富集分析,结果提示差异表达基因主要富集在细胞群增殖调节、细胞-细胞信号转导、跨膜受体

蛋白酪氨酸激酶信号传导途径、活性氧代谢过程、对缺氧反应等生物过程(图 5B)。富集到“细胞群增殖调节”的基因包括 *Alk*、*Atf5*、*Ecrg4*、*Egln3*、*Klf4*、*Prdm1*、*Prg4*、*Shh*、*Slc7a11*、*Txnip*(图 5C)。对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,结果显示胆红素主要影响的信号通路包括钙信号通路、PI3K-Akt 信号通路、黏着斑、*Rap1* 信号通路、ECM-受体相互作用(图 5D)。

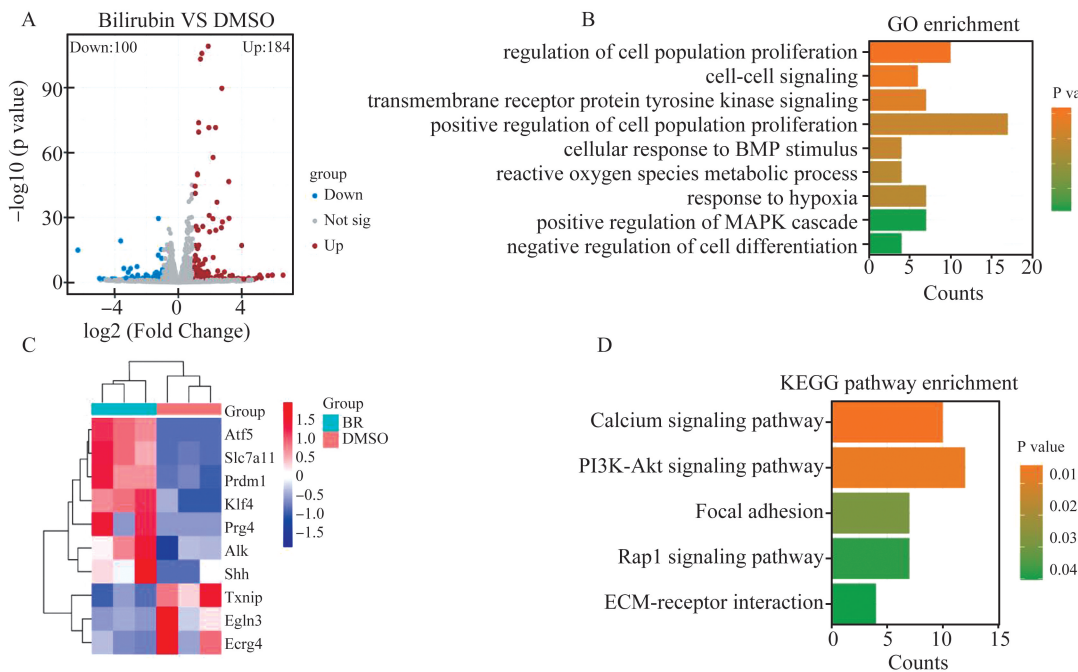


图 5 胆红素组与 DMSO 组的转录组分析

A: 差异基因筛选火山图; B: GO 功能生物学过程富集分析; C: “细胞群增殖调节”的差异基因热图; D: KEGG 通路富集分析

Figure 5 Transcriptome analysis of bilirubin and DMSO group

A: Volcano plots of the differentially expressed genes; B: GO biological process enrichment analysis; C: Heat map of genes enriched for “regulation of cell population proliferation”; D: KEGG pathway enrichment analysis, ranked by P value in ascending order

3 讨论

胆红素的神经毒性作用与其浓度具有密切关系。在新生儿黄疸中,胆红素神经损伤多见于血清总胆红素高于 342 $\mu\text{mol/L}$ 的新生儿^[11]。既往研究报道,新生儿高胆红素血症中,脑脊液中的胆红素水平约为血清总胆红素的 1%~3%,而在酸中毒、败血症等影响血-脑脊液屏障功能的病理情况下,进入脑中的胆红素水平会更高^[12]。因此,我们设置了 (1.71~13.68) $\mu\text{mol/L}$ 胆红素浓度梯度,以模拟新生儿高胆红素血症时脑内的胆红素水平。既往研究报道,(6.1~50.0) $\mu\text{mol/L}$ 的胆红素引起 NSCs 代谢及 DNA 的损伤,活性降低以及凋亡增加^[13-14],这些研究采用的胆红素浓度均较高,可能忽视了低浓度胆红素对 NSCs 的潜在影响,导致了与上述 Yang 等发现的黄疸大鼠脑中 NSCs 存活率更高并不相符。考虑到低浓度胆红素对 NSCs 增殖的影响还未有研究报道,因此我们在神经球实验中增设了更低浓度的胆红素组别(0.17、0.86 $\mu\text{mol/L}$)以模拟体内生理情况下的胆红素水平。

本研究结果表明高浓度胆红素对 NSCs 具有毒性,而低浓度的胆红素不影响 NSCs 活性,并促进 NSCs 增殖。在神经球实验中,13.68 $\mu\text{mol/L}$ 胆红素虽然增加了神经球平均直径,但是神经球数量与对照组无明显差异,明显少于较低浓度胆红素组,提示高浓度胆红素的毒性作用已经抑制了其促增殖作用。转录组测序为胆红素促进 NSCs 增殖的潜在机制提供了线索。胆红素影响了 *Alk*、*Atf5*、*Klf4*、*Ecrf4*、*Shh* 等与 NSCs 的增殖分化调控相关基因的表达,可能是胆红素促增殖作用的调控靶点。KEGG 提示胆红素影响了多条细胞内信号转导途径,其中 *PI3K-AKT* 通路参与调控细胞增殖、存活等功能,与 NSCs 增殖分化、大脑发育相关^[15],可能介导了胆红素促增殖作用,有待未来进一步研究。

探索胆红素对 NSCs 的影响对胆红素脑病的 NSCs 移植具有重要指导意义。高浓度胆红素对 NSCs 的毒性作用提示应重视对血清及脑脊液中胆红素水平的监测及调控,避免在高浓度胆红素条件下进行移植,以提供更安全的移植细胞微环境;而适度升高的胆红素可以促进 NSCs 增殖,可能有利于 NSCs 在脑内的长期存活,提高移植效率。本研究的不足是尚未探讨胆红素对于 NSCs 分化的影响,以及未进行在体实验验证,有待未来进一步探索。

参考文献:

[1] 盘琳琳,孔令漪,翟丰,等. 新生儿听力障碍常见危险

因素及听力筛查方法研究进展[J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2022, 36(1): 131-137. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.080

PAN Linlin, KONG Lingyi, ZHAI Feng, et al. Research progress on auditory risk factors and hearing screening methods among neonates [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2022, 36 (1): 131-137. doi: 10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.080

[2] Chadha S, Kamenov K, Cieza A. The world report on hearing, 2021 [J]. Bull World Health Organ, 2021, 99: 242-242A. doi:10.2471/BLT.21.285643

[3] Riordan SM, Shapiro SM. Review of bilirubin neurotoxicity I: molecular biology and neuropathology of disease [J]. Pediatr Res, 2020, 87(2): 327-331. doi:10.1038/s41390-019-0608-0

[4] Zakerinia M, Kamgarpour A, Nemati H, et al. Intrathecal autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell therapy in neurological diseases [J]. Int J Organ Transplant Med, 2018, 9(4): 157-167.

[5] Amini N, Vousooghi N, Hadjighassem M, et al. Efficacy of human adipose tissue-derived stem cells on neonatal bilirubin encephalopathy in rats [J]. Neurotox Res, 2016, 29(4): 514-524. doi:10.1007/s12640-016-9599-3

[6] Srivastava S, Ahmad R, Khare SK. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: a review [J]. Eur J Med Chem, 2021, 216: 113320. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113320

[7] Zhao T, Zhu TM, Xie LQ, et al. Neural stem cells therapy for ischemic stroke: progress and challenges [J]. Transl Stroke Res, 2022, 13(5): 665-675. doi:10.1007/s12975-022-00984-y

[8] Zheng YF, Zhou J, Wang YS, et al. Neural stem/progenitor cell transplantation in Parkinson's rodent animals: a meta-analysis and systematic review [J]. Stem Cells Transl Med, 2022, 11(4): 383-393. doi: 10.1093/stcltm/szac006

[9] Yang FC, Riordan SM, Winter M, et al. Fate of neural progenitor cells transplanted into jaundiced and nonjaundiced rat brains [J]. Cell Transplant, 2017, 26(4): 605-611. doi:10.3727/096368917X694840

[10] Yang FC, Vivian JL, Traxler C, et al. MGE-like neural progenitor cell survival and expression of parvalbumin and proenkephalin in a jaundiced rat model of kernicterus [J]. Cell Transplant, 2022, 31: 9636897221101116. doi:10.1177/09636897221101116

[11] 中华医学会儿科学分会新生儿学组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 新生儿高胆红素血症诊断和治疗专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(10): 745-748. doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2014.10.006