

成人眼小梁网内皮细胞具有干细胞/祖细胞的属性

万尚韬, 李永平, 张平, 高欢欢, 张文忻, 林健贤(中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 眼病理科, 广东省广州市 510060)

文章亮点:

实验特点在于于现有的研究大多是在体外进行实验证明小梁网的干细胞存在, 仅凭现有研究认定此细胞为小梁网干细胞理由并不充分, 而实验结果显示小梁网内皮细胞均表达 nestin 蛋白, 说明小梁网内皮细胞均具有干细胞/祖细胞的属性, 小梁网 nestin 蛋白阳性的内皮细胞相似于表达 nestin 的血管内皮祖细胞。

关键词:

干细胞; 培养; 祖细胞; nestin; 人眼; 小梁网; 分子标记物; 免疫组化; 内皮细胞; CD31; CD34

主题词:

干细胞; 眼; 内皮细胞; 小梁网

摘要

背景: 干细胞/祖细胞的研究为干细胞治疗疾病提供了可能, 寻找正常人眼内小梁网干细胞/祖细胞, 探究小梁网干细胞的属性能为原发性开角型青光眼的干细胞/祖细胞治疗提供新的思路。

目的: 探索小梁网内皮干细胞/祖细胞的属性。

方法: 选取成人眼球 20 例, 其中 10 例眼球标本来源于因急性外伤大失血死亡后摘除的眼球, 眶内容物剔除的眼球 7 例, 3 例来源于眼后段黑色素瘤患者手术摘除眼球。所有标本行苏木精-伊红染色以及免疫组化染色观察。

结果与结论: 小梁网内皮细胞中阳性表达 nestin, 阴性表达凝血因子 VIII, CD31 和 CD34, 而角膜内皮细胞中弱阳性表达 nestin, Schlemm 管内皮细胞未见 nestin 阳性表达, 但凝血因子 VIII, CD31, CD34 均呈强阳性表达。表明小梁网内皮细胞均具有干细胞/祖细胞的属性, 小梁网 nestin 蛋白阳性的内皮细胞相似于表达 nestin 的血管内皮祖细胞。

万尚韬, 李永平, 张平, 高欢欢, 张文忻, 林健贤. 成人眼小梁网内皮细胞具有干细胞/祖细胞的属性[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(14):2213-2218.

The stem/progenitor cell characteristics of trabecular meshwork endothelia cells in the adult human eye

Wan Shang-tao, Li Yong-ping, Zhang Ping, Gao Huan-huan, Zhang Wen-xin, Lin Jian-xian (State Key Laboratory of Ophthalmology, Pathology Department, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The study of stem/progenitor cells provides the possibility of stem cell therapy, and identification and characterization of stem/progenitor cells in human trabecular meshwork can put new thoughts on treatment of primary open-angle glaucoma.

OBJECTIVE: To study the characteristics of stem/progenitor cells in trabecular meshwork in the adult human eye.

METHODS: Hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry staining of nestin, Factor VIII-related antigen, CD31 and CD34 were applied in 20 enucleated adult human eyes were selected, among which, 10 normal eyes had enucleation due to sudden death for serious trauma, 7 eyes were from the patients who had orbital exenteration, and 3 eyes were diagnosed as posterior segment choroidal malignant melanoma.

RESULTS AND CONCLUSION: The trabecular meshwork endothelial cells in the human eye were all positive for nestin, but negative for the other three anti-bodies. The corneal endothelial cells were weakly positive for nestin. Schlemm's canal endothelial cells were negative for nestin, but strongly positive for the Factor VIII-related antigen, CD31 and CD34. These findings indicate that the trabecular meshwork endothelial cells in the human eye all express nestin with stem/progenitor cell characteristics, and they are similar to the vascular progenitor cells with nestin expression.

Subject headings: stem cells; eye; endothelial cells; trabecular meshwork

Wan ST, Li YP, Zhang P, Gao HH, Zhang WX, Lin JX. The stem/progenitor cell characteristics of trabecular meshwork endothelia cells in the adult human eye. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(14):2213-2218.

万尚韬, 男, 1987 年生, 湖南省株洲市人, 汉族, 中山大学在读硕士, 研究方向为眼疾病的发生发展。

通讯作者: 李永平, 教授, 中山大学中山眼科中心, 眼科学国家重点实验室, 眼病理科, 广东省广州市 510060

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.14.013

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)14-02213-06

稿件接受: 2014-03-03

Wan Shang-tao, Studying for master's degree, State Key Laboratory of Ophthalmology, Pathology Department, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Yong-ping, Professor, State Key Laboratory of Ophthalmology, Pathology Department, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-03-03

0 引言 Introduction

干细胞/祖细胞的研究在近些年正如火如荼的进行, 干细胞/祖细胞治疗为当下很多疾病带来了治愈的曙光, 干细胞治疗的核心思想是利用干细胞来替代组织内因某些原因(病理状态或者生理上的老化)所缺失或者受损的细胞^[1]。青光眼是眼部第二大致盲眼病, 其发病率仅次于白内障, 但青光眼是全球第一不可逆致盲眼病, 各种原因引起的房水流出路径受阻造成病理性的眼压升高^[2-4]。青光眼的病变部位多集中在房角处, 以房角小梁网的改变为主。小梁网内皮细胞随着年龄的增加, 细胞密度逐渐下降, 间质纤维化增加, 房水流出阻力增加, 会引起眼压的升高; 而在开角型青光眼患者的小梁网内可见到小梁带纤维增生硬化, 增粗融合并可出现透明样变, 小梁网内出现斑块, 网孔变小或者阻塞, 小梁带内皮细胞变性脱落^[5]。青光眼的治疗方法有: 药物治疗, 如: 拟胆碱药物毛果芸香碱、 β 受体阻断剂噻吗洛尔和倍他洛尔、前列腺素衍生物拉坦前列素、碳酸酐酶抑制剂布林佐胺、脱水机甘露醇等, 多种抗青光眼的药物的出现能起到在一定程度上控制眼压的作用; 手术治疗, 使用小梁切除、房水引流阀植入等方法降低升高的眼压, 解除房水流通的阻滞; 以及其他的治疗方法如激光小梁成形、Ex-Press微型引流器植入等^[6-13]。

近些年随着干细胞的发现, 研究者们提出可以使用干细胞/祖细胞治疗青光眼的视神经损害, 多数研究者希望通过干细胞来保护或修复青光眼病理性高眼压损害的视网膜神经节细胞^[14-16], 也有人从原发性开角型青光眼的发病部位-小梁网着手, 尝试使用间充质干细胞修复受损的小梁网组织^[17]。在成人组织内残留的干细胞在创伤后能起到增殖及修复的作用^[18]。

实验拟通过对20例正常人眼球标本行免疫组化染色, 探索成人眼球正常小梁网内皮细胞的干细胞/祖细胞属性。现有国内外研究认为小梁网干细胞位于小梁网最前端靠近Schwalbe's线附近, 认为小梁网的干细胞属于间充质干细胞^[19-20]。nestin常被用来作为干细胞的标记物^[21-24], 有研究发现在新生血管内皮内存在有nestin表达, 认为nestin可作为血管内皮祖细胞标记物^[25]。因而实验使用免疫组化方法检测人眼中nestin的表达, 来探索人眼球小梁网内皮细胞的干细胞属性。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学研究。

时间及地点: 实验于2013年11月20日完成于中山大学中山眼科中心病理科。

材料:

组织材料: 对中山大学中山眼科中心眼病理科眼球石蜡标本复习苏木精-伊红染色切片, 选取前房角开放、结构清楚的成人眼球标本20例。20例眼球标本中: 10例眼球标本来源于因急性外伤大失血死亡后摘除的眼球, 眶内容物

剝除的眼球7例, 3例来源于眼后段黑色素瘤患者手术摘除眼球。

免疫组化检测成人眼小梁网的内皮细胞使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
Elivision™ plus试剂盒(KIT-9902)	加拿大Dako公司
小鼠抗人nestin单克隆抗体, 小鼠抗人CD31单克隆抗体, 小鼠抗人CD34单克隆抗体, 兔抗凝血因子VIII多克隆抗体	美国Biovision公司
BX51型光学显微镜	Olympus

方法:

苏木精-伊红染色观察正常人眼的形态: 所有眼球标本均采用连续切片, 切片厚度约为4 μ m。行苏木精-伊红染色, 石蜡切片脱蜡至水30 min, 置Harris苏木精中染色10 min, 1%盐酸乙醇中分化3 s, 流水冲洗20 min, 置伊红染液中反应1 min, 梯度乙醇脱水后使用石炭酸-二甲苯脱水透明1 min, 中性树胶封固, 光学显微镜观察摄片。

免疫组织化学染色观察正常人眼中nestin, CD31, CD34和凝血因子VIII的表达: 所有眼球标本均采用连续切片, 切片厚度约为4 μ m。免疫组织化学染色试剂盒中包含有免疫组织化学二抗为辣根过氧化物酶标记抗小鼠/兔IgG聚合物; 免疫组织化学一抗为小鼠抗人nestin单克隆抗体(1:200)、小鼠抗人CD31单克隆抗体(1:200)、小鼠抗人CD34单克隆抗体(1:200)和兔抗凝血因子VIII多克隆抗体(1:200)。使用CD34抗体的组织使用110 $^{\circ}$ C下枸橼酸钠抗原修复2 min, 使用CD31抗体的组织在EDTA(pH 9.0)中110 $^{\circ}$ C高温修复2 min, 使用凝血因子VIII抗体的组织选择0.25%的胃蛋白酶消化液作抗原修复10 min, 使用nestin抗体的组织不做抗原修复; 免疫组化一抗37 $^{\circ}$ C孵育50 min; 使用DAB溶液显色8 min, 阴性对照使用PBS溶液替代一抗, 免疫组化4种抗体均以光学显微镜下观察到细胞浆内出现棕黄色颗粒判定为染色阳性, 着色强度按照阳性细胞颜色判断: 淡黄色为弱阳性, 棕黄色为中等阳性, 棕褐色为强阳性, 无着色为阴性。

主要观察指标: 成人眼球小梁网及邻近组织内nestin, CD31, CD34和凝血因子VIII的表达情况。

2 结果 Results

2.1 正常人眼球的房角结构 苏木精-伊红染色显示, 所有的眼球均可观察到子午线方向的眼球前房角结构, 角膜内皮完整, 房角结构清楚, 可见到小梁网为筛网状结构, 由小梁带交织围成网孔形状, 近房水一侧的小梁网结构疏松网眼较大, 向外逐渐密集, 近角巩膜侧的小梁网结构致密网眼小; 可见小梁网前端有3-5层小梁带, 小梁带向后方逐渐增多约可见到15-20层小梁带(图1A)。小梁网区域未见炎症细胞以及异常物质沉积, 虹膜组织未见色素脱失及粘连(图1B)。

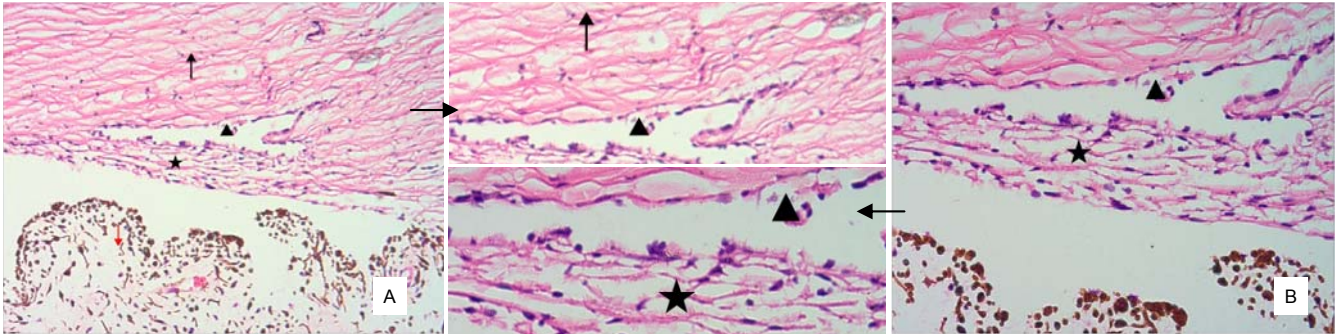


图 1 正常成人眼房角结构(苏木精-伊红染色)

Figure 1 Normal anterior chamber angle of human adult eye (hematoxylin-eosin staining)

图注: 图 A 中可见正常人眼房角中小梁网(★), Schlemm 管(▲)以及外上方的巩膜(黑色箭头)和下方的虹膜组织(红色箭头)(×100); 图 B 中小梁网(★)及 Schlemm 管(▲)内未见异常物质沉积及炎症细胞(×200)。

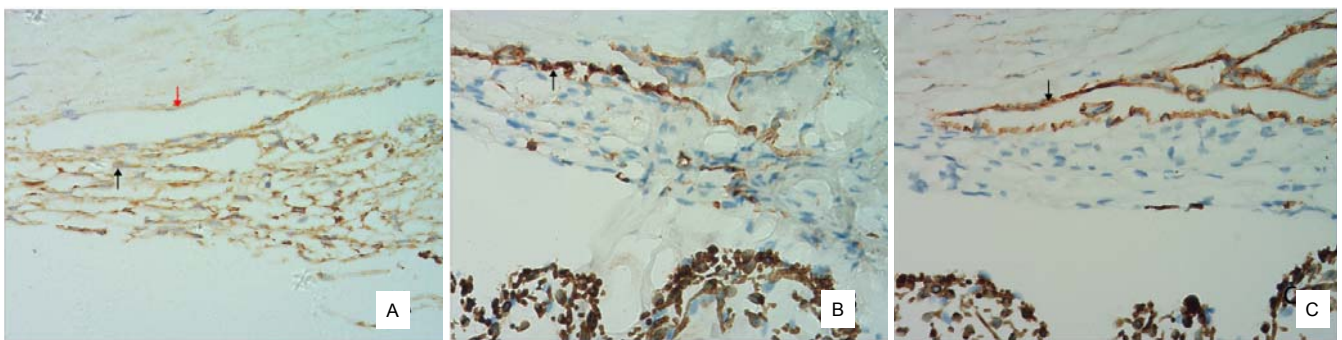


图 2 小梁网及 Schlemm 管内皮细胞中 nestin, CD31 和 CD34 的表达(免疫组织化学染色, ×200)

Figure 2 The expression of nestin, CD31 and CD34 in endothelial cells of trabecular meshwork and Schlemm's canal in the adult human eye (immunohistochemistry staining, ×200)

图注: 图 A 中小梁网内皮细胞(黑色箭头)及 Schlemm 管内皮细胞(红色箭头)中 nestin 表达均呈阳性; 图 B 中小梁网内皮细胞中 CD31 表达阴性, Schlemm 管内皮细胞中 CD31 表达强阳性(黑色箭头); 图 C 中小梁网内皮细胞中 CD34 表达阴性, Schlemm 管内皮细胞中 CD34 表达强阳性(黑色箭头)。



图 3 角膜内皮及角膜实质细胞中 nestin, CD31 和 CD34 的表达(免疫组织化学染色, ×200)

Figure 3 The expression of nestin, CD31 and CD34 in corneal endothelial cells and stromal keratocytes in the adult human eye (immunohistochemistry staining, ×200)

图注: 图 A 中角膜内皮细胞 nestin 表达呈阳性(黑色箭头), 角膜实质细胞 nestin 表达阴性; 图 B 中角膜内皮细胞和角膜实质细胞中 CD31 表达阴性; 图 C 中角膜内皮细胞中 CD34 表达阴性, 角膜实质细胞中 CD34 表达强阳性(黑色箭头)。

2.2 正常人眼中 nestin, CD31, CD34 和凝血因子 VIII 的表达 免疫组织化学染色显示, 人眼小梁网内皮细胞 nestin 表达阳性而凝血因子 VIII, CD31, CD34 表达阴性; 角膜内皮细胞 nestin 表达阳性, 凝血因子 VIII, CD31, CD34 表达阴性; Schlemm 管内皮细胞 nestin 表达阳性, 凝血因子 VIII, CD31, CD34 表达强阳性(图2); 角膜实质层 nestin, 凝血因子 VIII, CD31 表达均为阴性, CD34 表达强阳性(图3)。

3 讨论 Discussion

干细胞/祖细胞是能产生至少一种高度分化的子代细胞, 并具有无限或较长期的自我更新能力的细胞。在人体发育不同阶段及成体不同组织内均发现干细胞的存在。干细胞/祖细胞的最重要的特点就是能自我更新的能力, 使其在体内能够维持一定的数量。在以往的研究中在全身各种组织内均发现有干细胞/祖细胞的存在, 这些干细胞是组织

内的一些未分化的细胞,能够在某些情况下分化为该组织内的具有特定形态及功能的细胞,又叫做成体干细胞。成人体的干细胞往往存在于那些形成于胚胎时期、血管丰富、位置隐蔽的区域。干细胞的发现为疾病的治疗提供了一个新的方向^[26-31]。

在眼部,有很多组织的细胞是难以再生的,比如:视网膜神经节细胞、角膜内皮细胞和小梁网内皮细胞。小梁网的位置隐蔽,血管丰富,并且形成于胚胎时期,符合干细胞所处的位置。**Raviola**^[32]在1982年发表文章报道其在小梁网最前端靠近**Schwalbe's**线附近发现了一个环形的条带样结构,该结构内的细胞形态与小梁网细胞和角膜内皮细胞均不相同,这些细胞可能是小梁网的干细胞;之后人们发现了在人眼房角处可能存在有小梁网干细胞,**Acott**^[33]在1989年观察发现,接受了激光小梁成型术的患者在术后小梁部位细胞坏死区出现了细胞增生,而在体外实验中发现激光小梁成型术后细胞增生集中在靠近**Schwalbe's**线附近的非滤过区小梁网。其他研究者针对**Schwalbe's**线附近的小梁网干细胞进行了相关的研究,**Nadri**等^[34]使用手术取出人眼**Schwalb's**线附近角巩膜环,包含**Schwalb's**线附近的小梁网以及部分角膜内皮,体外培养,得到**CD105**, **CD90**, **CD44**, **CD166**阳性, **CD34**, **CD45**, **CD31**和**CD133**阴性的细胞,他们认为小梁网的干细胞属于间充质干细胞。另外,**Tay**等^[35]使用类似**Samad Nadri**的方法也得到了**CD73**, **CD90**和**CD105**阳性的间充质干细胞。**Du**等^[36]也使用手术方法体外培养得到小梁网间充质干细胞后,使用荧光**DiO**对培养的小梁网干细胞以及纤维母细胞染色标记,之后将这些着色的小梁网干细胞及纤维母细胞分别注入小鼠正常眼球前房,其观察到小梁网干细胞主要聚集在小梁网处,在小梁网至少停留了4个月,而且检测到该细胞表达小梁网标记蛋白**CHI3L1**蛋白,而纤维母细胞注入前房后主要聚集在角膜内皮面、晶状体上皮表面以及小梁网区域,并且并不表达**CHI3L1**,他们认为该分离出的小梁网干细胞能够定向回归到小梁网部位,并分化为小梁网细胞。**McGowan**等^[37]在人眼球进行免疫荧光染色也证实了在小梁网存在干细胞。**Manuguerra-Gagné**等^[17]将间充质干细胞使用琥珀酰亚胺脂染色标记间充质干细胞示踪,发现间充质干细胞在注入已使用激光光凝前房角组织的大鼠眼球内,发现间充质干细胞能够恢复房角的结构,在组织形态上修复的房角结构与未被光凝的眼内房角结构相似,但对照组显示在没有注入间充质干细胞的激光光凝眼球光凝处的房角被疤痕组织占据,并可见到色素细胞长入,该实验小组还将间充质干细胞与小梁网细胞在体外共培养,使用荧光染料标记间充质干细胞,他们发现间充质干细胞在与小梁网细胞直接接触后并不会分化成小梁网内皮细胞。

以上研究大多是在体外进行实验证明小梁网的干细胞存在,由于以下原因并不能真正反映小梁网的客观情况:体外培养的状态其实是一种模拟外伤的过程,并不能反映

体内真实的状况;角巩膜缘存在着多种干细胞,小梁网内皮细胞尚缺乏特异性的标记物,鉴定培养的细胞为小梁网干细胞非常的困难;分离培养的**Schwalbe's**线上的细胞确定为干细胞,该细胞可能是角膜内皮的干细胞,也不排除为小梁网内皮干细胞,但仅凭现有研究认定此细胞为小梁网干细胞理由并不充分。因此,何为小梁网内皮细胞的干细胞仍然不清楚。

近些年来,干细胞分子标签的不断发现大大促进了干细胞生物学及其临床转化应用的进展,例如胚胎干细胞分子标记物:**Oct-4**、碱性磷酸酶、阶段特异性胚胎抗原等大大促进了诱导干细胞技术的发展和应^[38-41]。现有的干细胞标记物常为干细胞向某一方向特定分化后的细胞标记物,如间充质干细胞标记物有**nestin**, **CD73**, **CD105**, **CD45**, **CD34**, **CD133**等等^[34-36]。本研究直接应用人小梁网组织来鉴定小梁网干细胞的可能分子标签。

Nestin常被用来作为胚胎干细胞分化出来的祖细胞的标记物^[42-45]。通常**nestin**是作为神经干细胞的标记物,但研究者们发现**nestin**可作为多种祖细胞的标记物^[18]。而且在多种成体正常组织中存在有表达**nestin**蛋白的细胞,如:视网膜干细胞、皮肤真皮来源的祖细胞、消化道**caja**间质细胞、乳腺来源腺体干细胞等^[46-48]。研究认为在成体内表达**nestin**的细胞属于干细胞/祖细胞群体^[18]。**nestin**是一个大于1 600个氨基酸残基的中间丝蛋白,其在成熟分化好的神经细胞内常常不表达^[49-50]。现发现在新生血管内皮细胞内**nestin**蛋白阳性表达^[51-52],**Mokry**等^[53]研究发现鼠的胚胎的所有血管内皮均表达**nestin**蛋白,而且在分化成熟血管内皮中不表达**nestin**。血管的生成主要是在血管内皮生长因子等因子的作用下血管母细胞形成初级血管丛再在血管生成1等因子影响下血管丛出芽形成不完整的管腔,之后血管壁逐渐完整在血小板衍生长因子的作用下间充质干细胞分化为血管周围平滑肌细胞或者血管周细胞,头部的间充质干细胞文献报道是由神经嵴细胞分化而来,但血管内皮细胞仍然是由来自中胚层的血管母细胞分化而来,在脉管生成早期血管内皮生长因子结合内皮中血管内皮生长因子受体3还能诱导血管内皮向淋巴管内皮分化^[54]。**Abdul Rahman**等^[55]在**EDM50**培养液培养人绒毛膜干细胞,使用碱性成纤维生长因子和血管内皮生长因子诱导血管生成,他们发现在人绒毛膜干细胞中**nestin**基因mRNA表达上调。2010年**Hwang**等^[56]使用western blot分析比较了正常胎盘以及先兆紫痫患者胎盘组织中**nestin**蛋白的表达差异,结果显示在先兆紫痫患者胎盘组织中**nestin**表达比正常胎盘明显升高,免疫组化显示在所有胎盘组织内**nestin**只表达在胎盘绒毛膜绒毛的内皮细胞内,在间充质组织、结缔组织、细胞滋养层和合体滋养层以及蜕膜细胞内均未见**nestin**表达。在肿瘤组织内**Kim**等^[57]发现在人类消化道腺鳞癌组织内的新生血管内皮中同时表达**CD34**和**nestin**蛋白;相似的**Matsuda**等^[52]也观察到消化道肿瘤特别是胰腺癌中

肿瘤新生血管nestin蛋白阳性表达; Yamahatsu等^[58]在裸鼠移植瘤内使用针对nestin基因的小干扰RNA成功抑制了肿瘤内新生血管的生长。以上研究结果均显示, nestin可作为血管内皮祖细胞的标记物。有人研究提出小梁网在发育继发于由静脉演变而来的Schlemm管^[59], 有人使用淋巴管内皮标记物标记青光眼患者小梁网细胞提示小梁网细胞可能起源于脉管组织^[60]。

实验结果显示小梁网内皮细胞nestin染色阳性, 该细胞凝血因子VIII, CD31, CD34阴性。小梁网内皮细胞均表达nestin说明小梁网内皮细胞均具有干细胞/祖细胞的属性, 小梁网nestin蛋白阳性的内皮细胞相似于表达nestin的血管内皮祖细胞。

作者贡献: 第一作者负责检索、阅读文献, 部分染片, 并完成文章初稿, 第一作者对文章负责; 通讯作者提出论文主题, 指导论文构架、审校论文, 提出重要修改意见; 第三作者参与了实验质量控制、文献筛选以及文献质量评估; 其他作者主要完成免疫组化染色以及染色质量控制; 所有作者共同阅片、分析实验结果。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验对象为病理标本, 不涉及人体或者动物的实验伦理道德问题。

学术术语: 青光眼—指称一种因眼压过高造成视神经萎缩, 导致视野缺损甚至最终失明的眼科疾病。其共同特征是视神经萎缩和视野缺损, 病理性的眼压升高是重要的危险因素之一。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Gnechchi M, Zhang Z, Ni A, et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204-1219.
- [2] 钟华,余敏斌.原发性闭角型青光眼流行病学研究进展[J].眼科学报,2007,23(3):186-192.
- [3] 汪俊,崔巍.我国原发性青光眼流行病学研究进展[J].国际眼科杂志,2012,12(4):667-670.
- [4] 杨强,郭文毅.原发性闭角型青光眼的流行病学[J].中国眼耳鼻喉科杂志,2008,8(5):334-335.
- [5] 张洁,易玉珍.正常人眼小梁网增龄性改变与中青年原发性开角型青光眼小梁网超微病变[J].眼科新进展,1990(2):1-4.
- [6] 葛坚,白玉婧.青光眼手术治疗进展[J].实用医院临床杂志,2010,7(6):8-12.
- [7] 王宁利,杨迪亚.同仁医院眼科近年来青光眼基础研究概述[J].眼科,2009,18(1):17-21.
- [8] 刘旭阳,陈晓明,袁敏敏.青光眼治疗药物评价[J].世界临床药物,2007,28(7):404-407,412.
- [9] 张秀兰,葛坚,蔡小于,等.两种显微手术方式处理原发性闭角型青光眼的对比研究[J].中华显微外科杂志,2006,29(2):158-160.
- [10] Bailey AK, Sarkisian SR Jr. Complications of tube implants and their management. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014;25(2):148-153.
- [11] Eldaly MA, Bunce C, Elsheikha OZ, et al. Non-penetrating filtration surgery versus trabeculectomy for open-angle glaucoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2:CD007059.
- [12] Chen G1, Li W2, Jiang F1, et al. Ex-PRESS Implantation versus Trabeculectomy in Open-Angle Glaucoma: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *PLoS One*. 2014;9(1):e86045.
- [13] Sit AJ. Evaluation and adoption of new technology in glaucoma surgery. *Am J Ophthalmol*. 2014;157(2):263-265.e1.
- [14] Hu Y, Tan HB, Wang XM, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clin Interv Aging*. 2013;8:1467-1470.
- [15] Al-Shamekh S, Goldberg JL. Retinal repair with induced pluripotent stem cells. *Transl Res*. 2013. in press.
- [16] Karl MO. The potential of stem cell research for the treatment of neuronal damage in glaucoma. *Cell Tissue Res*. 2013;353(2):311-325.
- [17] Manuguerra-Gagné R1, Boulos PR, Ammar A, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes tissue regeneration in a glaucoma model through laser-induced paracrine factor secretion and progenitor cell recruitment. *Stem Cells*. 2013;31(6):1136-1148.
- [18] Wiese C1, Rolletschek A, Kania G, et al. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(19-20):2510-2522.
- [19] 张纯.干细胞治疗离青光眼患者有多远?——十年干细胞研究的回顾[J].眼科,2009,18(1):10-13.
- [20] Nadri S, Yazdani S, Arefian E, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane. *Neurosci Lett*. 2013;541:43-48.
- [21] 薛栋,杜成友.Nestin阳性细胞的研究进展[J].国外医学(外科学分册),2005,32(3):193-197.
- [22] Jagtap JC, Dawood P, Shah RD, et al. Expression and regulation of prostate apoptosis response-4 (par-4) in human glioma stem cells in drug-induced apoptosis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88505.
- [23] Hatanpaa KJ, Hu T, Vemireddy V, et al. High expression of the stem cell marker nestin is an adverse prognostic factor in WHO grade II-III astrocytomas and oligoastrocytomas. *J Neurooncol*. 2014;117(1):183-189.
- [24] Fu X, Rong Z, Zhu S, et al. Genetic approach to track neural cell fate decisions using human embryonic stem cells. *Protein Cell*. 2014;5(1):69-79.
- [25] Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T, et al. Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol*. 2012;40(5):1345-1357.
- [26] 李永平.我国眼内干细胞研究现状与展望[J].中华眼底病杂志,2007,23(2):83-86.
- [27] Zhong X, Li Y, Peng F, et al. Identification of tumorigenic retinal stem-like cells in human solid retinoblastomas. *Int J Cancer*. 2007;121(10):2125-2131.
- [28] Ormond DR, Shannon C, Oppenheim J, et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS One*. 2014;9(2):e88916.
- [29] Watanabe M. Adult tissue stem cell therapy for gastrointestinal diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014. in press.
- [30] Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(6):306-316.

- [31] Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Res Int.* 2014;2014:951512.
- [32] Raviola G. Schwalbe line's cells: a new cell type in the trabecular meshwork of *Macaca mulatta*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1982;22(1):45-56.
- [33] Acott TS, Samples JR, Bradley JM, et al. Trabecular repopulation by anterior trabecular meshwork cells after laser trabeculoplasty. *Am J Ophthalmol.* 1989;107(1):1-6.
- [34] Nadri S, Yazdani S, Arefian E, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane. *Neurosci Lett.* 2013;541:43-48.
- [35] Tay CY, Sathiyathan P, Chu SW, et al. Identification and characterization of mesenchymal stem cells derived from the trabecular meshwork of the human eye. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(9):1381-1390.
- [36] Du Y, Yun H, Yang E, et al. Stem cells from trabecular meshwork home to TM tissue in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):1450-1459.
- [37] McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, et al. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas. *Mol Vis.* 2007;13:1984-2000.
- [38] Luo W, Li S, Peng B, et al. Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One.* 2013;8(2):e56324.
- [39] Fenderson BA, De Miguel MP, Pyle AD, et al. Staining embryonic stem cells using monoclonal antibodies to stage-specific embryonic antigens. *Methods Mol Biol.* 2006; 325:207-224.
- [40] Huang Y, Liang P, Liu D, et al. Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein Cell.* 2014. in press.
- [41] Singh KP, Kaushik R, Garg V, et al. Expression pattern of pluripotent markers in different embryonic developmental stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos and putative embryonic stem cells generated by parthenogenetic activation. *Cell Reprogram.* 2012;14(6):530-538.
- [42] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000;287(5460): 2032-2036.
- [43] Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron.* 1994;12(1):11-24.
- [44] Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27:85.
- [45] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585-595.
- [46] Li L, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Isolation, characterization, and differentiation of human multipotent dermal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2013;989:235-246.
- [47] Richter A, Nissen N, Mailänder P, et al. Mammary gland-derived nestin-positive cell populations can be isolated from human male and female donors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):78.
- [48] Tonthat CV, Di Girolamo N. Nestin expression in pterygia: potential role in angiogenesis. *Br J Ophthalmol.* 2013. in press.
- [49] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 1990;60(4):585-595.
- [50] Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, et al. A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem.* 1999;274 (14):9881-9980.
- [51] Nambirajan A, Sharma MC, Gupta RK, et al. Study of Stem cell marker Nestin and its correlation with Vascular endothelial growth factor and microvascular density in Ependymomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013. in press.
- [52] Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T. Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(1):42-48.
- [53] Mokry J, Nemecek S. Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol (Praha).* 1998;44(5): 155-161.
- [54] Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology.* Bergen: Saunders. 2003:434.
- [55] Abdul Rahman H, Manzor NF, Tan GC, et al. Upregulation of SOX-2, FZD9, Nestin, OCT-4 and FGF-4 expression in human chorion derived-stem cells after angiogenic induction. *Med J Malaysia.* 2008;63 Suppl A:57-58.
- [56] Hwang HS, Cho NH, Maeng YS, et al. Differential expression of nestin in normal and pre-eclamptic human placentas. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(8):909-914.
- [57] Kim HS, Kang HS, Messam CA, et al. Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2002;10(2): 121-127.
- [58] El-Helou V, Chabot A, Gosselin H, et al. Cardiac resident nestin(+) cells participate in reparative vascularisation. *J Cell Physiol.* 2013;228(9):1844-1853.
- [59] Hamanaka T, Bill A, Ichinohasama R, et al. Aspects of the development of Schlemm's canal. *Exp Eye Res.* 1992;55(3): 479-488.
- [60] Hamanaka T, Kasahara K, Takemura T. Histopathology of the trabecular meshwork and Schlemm's canal in primary angle-closure glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(12):8849-8861.