

骨髓间充质干细胞对创伤性骨折愈合的促进作用

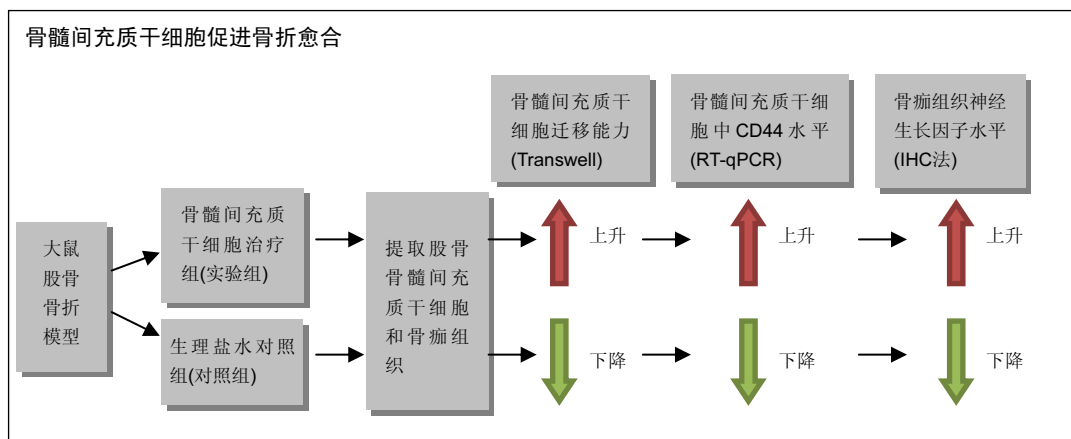
郭启发, 李光, 任荣, 李凌伟(青海大学附属医院创伤骨科, 青海省西宁市 810001)

引用本文: 郭启发, 李光, 任荣, 李凌伟. 骨髓间充质干细胞对创伤性骨折愈合的促进作用[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(45):6700-6705.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.45.002

ORCID: 0000-0002-7380-7046(郭启发)

文章快速阅读:



郭启发, 男, 1964 年生, 青海省西宁市人, 藏族, 1989 年青海大学附属医院毕业, 副主任医师, 主要从事创伤骨折、骨关节炎、骨关节结核、骨关节炎等方面的研究。

通讯作者: 李凌伟, 硕士, 医师, 青海大学附属医院创伤骨科, 青海省西宁市 810001

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)45-06700-06

稿件接受: 2016-10-08

文题释义:

CD44: 是一种跨膜糖蛋白, 广泛分布于各种细胞表面, 做为可识别透明质酸、I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白等的受体, 具有调节细胞-细胞以及细胞-基质之间的黏附作用, CD44 和透明质酸等相互作用与细胞迁移能力相关, 目前 CD44 是骨髓间充质干细胞鉴定的表面抗原之一。

神经生长因子: 由神经细胞或非神经细胞分泌的高度保守的蛋白分子, 可与膜表面受体、酪氨酸激酶 A 受体 TrkA 和神经营养受体 p75 相互作用, 从而调控神经元的存活、生长、分化以及功能发挥, 在骨折修复中, 神经生长因子通过促进血液供应、神经再生进而促进骨折修复。

摘要

背景: 近年来随着干细胞培养、分离等技术的发展使骨折不愈合的治疗有了更多的选择。

目的: 探讨骨髓间充质干细胞在大鼠创伤性骨折愈合过程中的促进作用, 以及对内源骨髓间充质干细胞迁移能力的影响。

方法: 48 只 Wistar 大鼠, 随机分为实验组、对照组各 24 只。所有大鼠均建立股骨骨折模型。另采用贴壁筛选法分离制备健康大鼠骨髓间充质干细胞, 通过尾静脉注入实验组大鼠, 对照组注入等体积生理盐水。分别于 2, 3, 4, 8, 12 周提取两组大鼠股骨骨髓间充质干细胞, 用荧光定量 RT-qPCR 方法检测细胞中 I 型胶原蛋白和 CD44 的表达, 采用 Transwell 法测定骨髓间充质干细胞迁移情况, 并用免疫组化方法检测骨痂处神经生长因子表达。

结果与结论: ①第 2, 3, 4 周, 实验组大鼠骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 mRNA 表达明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$); ②第 2, 3 周, 骨髓间充质干细胞迁移能力明显高于对照组($P < 0.05$); ③第 3, 4, 8, 12 周, 实验组骨痂处神经生长因子表达高于对照组($P < 0.05$); ④结果表明, 外源骨髓间充质干细胞植入股骨骨折大鼠体内可使内源骨髓间充质干细胞的体外迁移能力及骨折部位神经生长因子表达增强, 从而促进大鼠骨折愈合。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 创伤性骨折; 骨髓间充质干细胞; 愈合; 体外迁移; 神经生长因子

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 股骨骨折; 骨折愈合; 神经生长因子; 组织工程

Guo Qi-fa, Associate chief physician, Department of Traumatic Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Corresponding author: Li Ling-wei, Master, Physician, Department of Traumatic Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Promotion of bone fracture healing by bone marrow mesenchymal stem cells

Guo Qi-fa, Li Guang, Ren Rong, Li Ling-wei (Department of Traumatic Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, the development of stem cell culture and isolation technologies provides new therapeutic choices for fracture healing.

OBJECTIVE: To investigate the effect of exogenous bone marrow mesenchymal stem cells on bone fracture healing in traumatic fracture rats and on the migration ability of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Femoral fracture models were made in 48 Wistar rats and then randomized into experimental group and control group ($n=24/\text{group}$). Bone marrow mesenchymal stem cells from another healthy rats were isolated using adherent method and then injected into the rats via the tail vein in the experimental group. Rats in the control group were given the same volume of normal saline. At 2, 3, 4, 8, 12 weeks after injection, we extracted bone marrow mesenchymal stem cells from the femur of rats in the two groups. RT-qPCR was used to detect expression levels of type I collagen and CD44. Transwell method was used to detect cell migration ability. Immunohistochemistry method was employed to detect expression of nerve growth factors in the callus.

RESULTS AND CONCLUSION: mRNA levels of type I collagen and CD44 in rat bone marrow mesenchymal stem cells were significantly higher in the experimental group than the control group at 2, 3 and 4 weeks after injection ($P < 0.05$). Compared with the control group, the higher migration ability of bone marrow mesenchymal stem cells was found in the experimental group at 2 and 3 weeks after injection ($P < 0.05$) as well as the higher expression of nerve growth factor in the callus in the experimental group at 3, 4, 8, 12 weeks after injection. All these findings suggest that exogenous bone marrow mesenchymal stem cells can improve the migration ability of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells and the expression of nerve growth factor in the callus in rats with femoral fracture, thereby promoting fracture healing in rats.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Femoral Fractures; Fracture Healing; Nerve Growth Factor; Tissue Engineering

Cite this article: Guo QF, Li G, Ren R, Li LW. Promotion of bone fracture healing by bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(45):6700-6705.

0 引言 Introduction

骨折是临床比较常见的骨科疾病,常常引起患者关节活动障碍,从而导致一系列并发症的发生,给患者的身心带来巨大伤害,所以促进骨折的正常愈合尤为重要。然而骨折愈合是一个极其复杂而连续的过程,一般分为炎症反应期、修复期和塑型期3个阶段,3者之间互相交错相辅相成。随着肢体活动和负重,通过应力刺激,上述过程继续进行,使多余的骨痂被吸收而清除,髓腔逐渐再通,骨折部位慢慢恢复正常骨结构。尽管骨科近年来发展迅速,但骨折不愈合仍是临床面临的一个重要问题。骨折不愈合的诊断建立在一系列临床症状和放射线检查上。骨折治疗6-8个月仍未愈合考虑骨折不愈合,不同部位的发病率约5%。Brinker等认为,那些不进一步干预便无法愈合的骨折才称之为骨不连。创伤性骨折愈合包括纤维蛋白充填、细胞增殖和组织塑形3个基本过程,表现出各种过程的协同作用。

间充质干细胞是一种特殊的干细胞,具有多方向分化的能力。间充质干细胞在细胞因子和各种微环境下可转化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞和肌细胞等。间充质干细胞分布广,很多组织中发现它的存在,如骨髓、脂肪组织、肌肉组织和外周血等。骨髓来源的间充质干细胞增殖能力强大,体外研究发现,将其培养扩增至 10^4 仍能保持其多分化潜能。间充质干细胞的分离方法有多种,例如贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪法和免疫磁珠法等,其中贴壁法是利用其在塑料培养瓶中贴壁生长的特性将其从造血干细胞中分离出来。研究发现,老年患者、全身性疾病患者、代谢性疾病及化疗患者的间充质干细胞数量急剧减少,所以同种异体间充质干细胞用于疾病治疗的前景更广^[1-3]。异体间充质干细胞能否保持其多向分化能力,促进参与骨折愈合,仍需要进一步研究。实验将异体骨髓间充质干细胞注入到骨折大鼠体内,探讨其促进大鼠骨折愈合的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 于2014年1月至2015年9月在青海大学医学院完成。

1.3 材料 选取8周龄健康成年Wistar大鼠, 雌雄不限, 48只大鼠用于骨折造模, 4只大鼠用于骨髓间充质干细胞分离培养, 由青海大学医学院动物实验中心提供。

DMEM、胎牛血清等细胞培养试剂购于Invitrogen公司; CD44、CD34、NGF一抗购于Cell Signaling Technologies; 二抗购于武汉博士德公司。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离培养 采用贴壁筛选法提取大鼠骨髓间充质干细胞。大鼠经10%水合氯醛(3 mL/kg)行腹腔麻醉后, 体积分数为75%乙醇消毒, 无菌环境下取出两侧股骨、胫骨、肱骨, 剪开两端, 用注射器注入无血清DMEM培养基冲洗骨髓腔, 骨髓悬液经200目筛网过滤, 培养于含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液中, 放入37℃、体积分数为5%CO₂培养箱静止培养, 24 h后全量换液, 之后每2 d半量换液1次, 待细胞生长融合至80%–90%时进行传代培养。

1.4.2 骨髓间充质干细胞的鉴定 取培养至第3代骨髓间充质干细胞, PBS洗涤3次, 加入CD44和CD34荧光标记抗体, 室温避光孵育30 min, 加入荧光标记二抗, 37℃孵育20 min, 用流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.4.3 实验动物分组及左侧股骨骨折模型制备 48只Wistar大鼠随机分为2组($n=24$): 对照组和实验组。用10%水合氯醛(3 mL/kg)行腹腔麻醉, 大鼠左下肢备皮、消毒后于左股外侧纵切暴露股骨干, 于股骨中段用线锯将股骨横行切断, 并将髓内固定针逆行插入骨折近端, 从股骨大转子穿出, 生理盐水洗净伤口后逐层缝合。术后清洁级环境下单笼饲养。

1.4.4 造模后干预 骨折造模24 h后, 将体外培养的第3代骨髓间充质干细胞经尾静脉注入大鼠体内, 每只1.5 mL(细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$)。

1.4.5 骨髓间充质干细胞迁移数测定 第2, 3, 4, 8, 12周每组分别取4只大鼠, 再分离培养股骨骨髓间充质干细胞, 培养方法见1.4.1。应用6孔Transwell系统, 上室加入 2×10^5 的第2代骨髓间充质干细胞悬液, 于37℃、体积分数为5%CO₂的饱和湿度培养箱中培养24 h, 进行结晶紫法染色, 倒置相差显微镜下计数滤膜下侧骨髓间

充质干细胞迁移数。

1.4.6 骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44的表达 采用荧光定量RT-qPCR方法检测实验组和对照组分离提取的第2代骨髓间充质干细胞中 I 型胶原蛋白和CD44 mRNA的表达。用Trizol法提取两组骨髓间充质干细胞的总RNA, 反转录成cDNA, 用RT-qPCR方法检测 I 型胶原蛋白、CD44表达水平, 并用内参基因 β -actin进行归一化处理。引物如表1所示。

1.4.7 免疫组化检测神经生长因子表达 取上述各时间点两组大鼠骨痂, 用40 g/L多聚甲醛固定后行石蜡切片, 切片进行免疫组化染色, 一抗为兔抗鼠NGF(1:100), 二抗为羊抗兔IgG(1:1000), DAB显色, 于显微镜下观察骨痂组织中神经生长因子的表达, 应用Image-proPlus 6.0软件分析切片的吸光度, 判定神经生长因子表达量。

1.5 主要观察指标 ①骨髓间充质干细胞迁移数; ②骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44的表达; ③骨痂组织神经生长因子表达。

1.6 统计学分析 使用SPSS 17.0统计学软件, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 股骨骨折造模后2 d可见大鼠左肢跛行, 精神较差。经过1周后, 两组伤口缝线自行脱落, 实验组大鼠行走状态基本恢复。两组均无感染发生, 中途无死亡。

2.2 两组大鼠骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44表达阳性率的比较 由图1可知在第2, 3, 4周时实验组 I 型胶原蛋白、CD44表达明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 两组大鼠的骨髓间充质干细胞迁移的比较 Transwell方法检测实验组和对照组大鼠的骨髓间充质干细胞迁移能力, 由图2可见在第2, 3周时, 实验组大鼠的骨髓间充质干细胞迁移数明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 两组大鼠骨痂神经生长因子的表达 术后2周时, 实验组和对照组神经生长因子阳性表达均明显增加, 但两组间差异无显著性意义, 随着时间推移, 两组间神经生长因子阳性表达逐渐减少, 但实验组仍能保持相对对照组较高的水平, 两组神经生长因子表达量比较差异有显著性意义, 见表2及图3。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

基因名称	引物序列(5'→3')
I 型胶原	F: 5'- CTC AGG FFC GAA GGC AAC AGT-3' R: 5'-ATG GGC AGG CGG GAG GTC T -3'
CD44	F: 5'- ACC AAG AAG ACA TCG ATG CC-3' R: 5'-TGT CCA GCT AAT TCC GAT CC-3'
β -actin	F: 5'- CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3' R: 5'-AGC CAC CAA TCC ACA CAG-3'

表 2 两组大鼠骨痂中神经生长因子表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression of nerve growth factor in the callus in the two groups

时间	实验组	对照组
术后 2 周	46.800 $\pm$ 2.588	44.800 $\pm$ 1.923
术后 3 周	26.400 $\pm$ 1.517 ^a	14.800 $\pm$ 0.837
术后 4 周	22.400 $\pm$ 1.342 ^a	11.200 $\pm$ 1.304
术后 8 周	18.400 $\pm$ 1.673 ^a	9.400 $\pm$ 2.074
术后 12 周	11.800 $\pm$ 0.837 ^a	8.000 $\pm$ 2.828

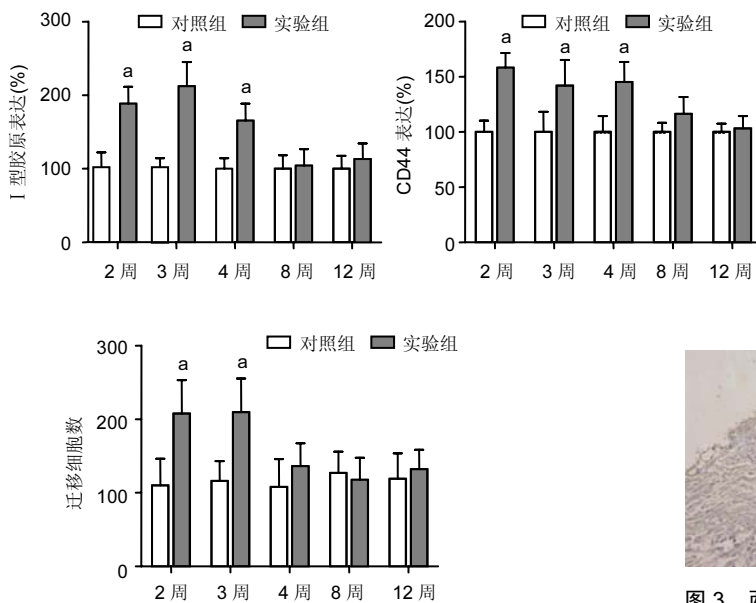
表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$ 。

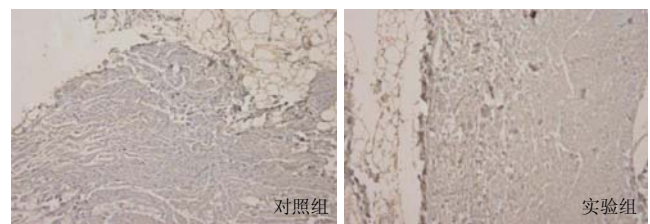
图 1 两组大鼠骨髓间充质干细胞 I 型胶原蛋白、CD44 的 mRNA 表达

Figure 1 The mRNA expression of type I collagen and CD44 in rat bone marrow mesenchymal stem cells in the two groups

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

图 2 两组大鼠骨髓间充质干细胞迁移能力

Figure 2 The migration ability of rat bone marrow mesenchymal stem cells in the two groups

图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。图 3 两组大鼠骨折 12 周时骨痂处神经生长因子免疫组化染色结果($\times 100$)Figure 3 Immunohistochemical staining for nerve growth factor in the rat callus in the two groups at 12 weeks after femoral fracture ($\times 100$)

3 讨论 Discussion

造成骨折不愈合的原因一般有: ①局部的血供不足; ②感染; ③不正确的功能锻炼, 使骨折端产生不利于骨折愈合的剪力、成角以及扭转应力; ④其他一些恶病质营养不良等, 吸烟也能抑制血管的长入和成骨细胞的功能^[4]。骨折不愈合的治疗: 传统治疗骨折不愈合的办法就是准确的复位、植骨和坚强的内固定。骨移植材料包括自体髂骨、肋骨、周围骨、同种异体骨和人工合成骨, 骨形态发生蛋白和各种生长因子复合材料已经进入临床研究阶段^[5]。生物物理学治疗包括电刺激、低强度脉冲式超声波、体外冲击波等。干细胞领域的发展推动了基于细胞治疗骨折修复的研究。干细胞是具有自我更新和多重分化的一种细胞, 在一定的条件下它能转化为 3 个胚层的细胞^[6], 因此骨髓间充质干细胞有助于骨折愈合。

骨髓间充质干细胞有多种表面标记, 虽然对人体来源的间充质干细胞在 2006 年国际细胞治疗协会上统一了鉴定标准^[7], 但在不同种属之间, 有些标记尚存在种属特异性。目前, 普遍认为骨髓间充质干细胞表面 CD44 表达阳性, CD34 表达阴性, 实验中即按照 CD44⁺/CD34⁻进行骨髓间充质干细胞的鉴定, 并移植入股骨骨折动物模型。

CD44 是一种透明质酸受体^[8-9], 目前发现, CD44-透明质酸相互作用与细胞迁移能力相关, 如 T 细胞趋向炎症部位和间充质干细胞迁移向损伤部位等^[10-11]。Zhu 等^[11]通过体外实验发现, 与 CD44^{-/-}的骨髓间充质干细胞相比, CD44^{+/+}细胞表现出了更强的迁移能力。虽然极少文献报道骨折中 CD44-透明质酸对骨髓间充质干细胞归巢作用的影响, 但在其他疾病研究中有发现

CD44 表达有助于骨髓间充质干细胞对损伤的修复作用, 如 Herrera 等^[12]发现高表达 CD44 外源间充质干细胞可向急性肾损伤内肾微管处迁移。实验结果发现, 实验组动物模型中提取的骨髓间充质干细胞具有更多的 CD44 表达, 与对照组相比差异有显著性意义, 提示在骨折损伤动物模型中, 采用细胞治疗方法, 有助于骨髓间充质干细胞增加表达具有趋化作用的 CD44, 可能是细胞具有高迁移能力的机制之一。

间充质干细胞能够迁移到靶组织, 这对正常或疾病状态的机体均有重要的生物学作用。在胚胎发育过程中, 间充质干细胞可随血流迁移到新的器官组织^[13-14], 在孕 7 周, 胎儿血循环中间充质干细胞大量存在, 并一直维持到孕 12 周。当人体成年后, 间充质干细胞含量下降, 但在人体循环系统、骨、脂肪等组织中仍有微量表达^[15-17], 并保持着多种分化方向的潜能。在组织再生治疗中, 研究者们对间充质干细胞的迁移能力产生了特别的兴趣, 通过疾病动物模型实验, 发现静脉注射的间充质干细胞可以特异性的迁移到损伤部位^[18-22], 如软骨损伤、心肌损伤、肾缺血再灌注损伤、脑损伤等。在骨修复过程中, 大多数学者均推测骨髓间充质干细胞扮演着重要的角色^[23]。实验采用体外 Transwell 方法检测骨折动物模型中骨髓间充质干细胞的迁移能力, 发现经外源骨髓间充质干细胞治疗的动物模型中其骨折愈合能力明显好于非治疗对照组, 且其骨髓间充质干细胞迁移能力明显高于对照组, 提示骨折愈合可能与骨髓间充质干细胞迁移相关, 而且骨髓间充质干细胞治疗有助于提高细胞迁移能力。但由于标记方法的局限, 尚无法分清具有高迁移能力的骨髓间充质干细胞是外源骨髓间充质干细胞还是内源骨髓间充质干细胞。

镜下观察同样可见到实验组大鼠骨痂处表达大量神经生长因子, 这是神经能够通过侧突出芽的方式再生的重要因素^[24]。神经生长因子可通过与细胞表面高亲和力受体 Trk 结合而发挥其维持神经元存活、促进受损神经再生及促进周围神经血管生成等生物学作用^[25]。神经生长因子作为多功能因子, 可以发挥神经系统相关功能, 也可发挥神经系统外的功能, 既可以由神经细胞分泌产生, 也可以由非神经细胞产生和利用^[26-27], 如骨组织中的成骨细胞、骨髓基质细胞均可表达神经生长因子, 多项研究也发现骨髓间充质干细胞表达分泌神经生长因子^[28], 而且骨髓间充质干细胞在一定条件刺激下可分化为神经元细胞^[29]。通过对不同时间点的神经生长因子免疫组化染色, 可以看到在术后 2 周时神经生长因子

阳性表达就出现增加, 术后 3 周以后实验组和对照组差异有显著性意义, 随着时间推移, 神经生长因子阳性表达逐渐减少^[30], 说明外源骨髓间充质干细胞可能通过自身表达和促再生组织分泌神经营养因子的方式, 促进神经再生, 从而促进骨折愈合, 并可以维持 12 周。

综上所述, 在外源骨髓间充质干细胞治疗情况下, 大鼠骨折股骨中骨髓间充质干细胞的迁移能力及骨折部位神经生长因子表达增强, 可以影响到大鼠的骨折愈合。

作者贡献: 实验设计为郭启发, 实验实施为任荣, 实验评估为李光, 资料收集为李凌伟。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Lteif AA, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation*. 2005;112(1):32-38.
- [2] Zhang Y, Li W, Yan T, et al. Early detection of lesions of dorsal artery of foot in patients with type 2 diabetes mellitus by high-frequency ultrasonography. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009;29(3): 387-390.
- [3] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(12 Suppl):S16-23.
- [4] Izumi S, Muano T, Mori A, et al. Common carotid artery stiffness, cardiovascular function and lipid metabolism after menopause. *Life Sci*. 2006;78(15):1696-1701.
- [5] Hoegh A, Lindholt JS. Basic science review. Vascular distensibility as a predictive tool in the management of small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg*. 2009;43(4):333-338.

- [6] Shingu Y, Shiya N, Ooka T, et al. Augmentation index is elevated in aortic aneurysm and dissection. *Ann Thorac Surg*. 2009;87(5):1373-1377.
- [7] 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. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
- [8] Lesley J, Hascall VC, Tammi M, et al. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem*. 2000;275(35):26967-26975.
- [9] Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med*. 2001;7(5):213-221.
- [10] DeGrendele HC, Kosfisz M, Estess P, et al. CD44 activation and associated primary adhesion is inducible via T cell receptor stimulation. *J Immunol*. 1997;159(6):2549-2553.
- [11] Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006;24(4):928-935.
- [12] Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int*. 2007;72(4):430-441.
- [13] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001;98(8):2396-2402.
- [14] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6(11):1282-1286.
- [15] Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(11):581-588.
- [16] Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98(9):2615-2625.
- [17] Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, et al. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001;153(5):1133-1140.
- [18] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*. 2004;22(3):415-427.
- [19] Muñoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, et al. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci*. 2004;24(19):4585-4595.
- [20] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863-868.
- [21] Hou LL, Zheng M, Wang DM, et al. Migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in the rat brain. *Sheng Li Xue Bao*. 2003;55(2):153-159.
- [22] Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1794-1804.
- [23] 殷晓雪, 陈仲强, 郭昭庆, 等. 人骨髓间充质干细胞定向诱导分化为成骨细胞及其鉴定[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(2):88-91.
- [24] Shams PN, Foster PJ. Clinical outcomes after lens extraction for visually significant cataract in eyes with primary angle closure. *J Glaucoma*. 2012;21(8):545-550.
- [25] Su WW, Chen PY, Hsiao CH, et al. Primary phacoemulsification and intraocular lens implantation for acute primary angle-closure. *PLoS One*. 2011;6(5):e20056.
- [26] Micera A, Lambiase A, Aloe L, et al. Nerve growth factor involvement in the visual system: implications in allergic and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(6):411-417.
- [27] Lambiase A, Micera A, Sgrulletta R, et al. Nerve growth factor and the immune system: old and new concepts in the cross-talk between immune and resident cells during pathophysiological conditions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004;4(5):425-430.
- [28] 吴永超, 郑启新, 胡东, 等. 骨髓间充质干细胞表达神经营养因子及对神经干细胞的保护作用[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(9):780-782.
- [29] Wu Y, Zheng Q, Xie Z, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in bone marrow mesenchymal stem cells and therapeutic effect in spinal cord injury. *Chinese Journal of Experimental Surgery*. 2005; 22(2):139-141.
- [30] Boulanger G, Orignac I, Weber M. Demographic evolution of acute primary angle closure between 2001-2003 and 2008-2010: impact of modern cataract surgery. *J Fr Ophtalmol*. 2013;36(2):95-102.