

木犀草素通过 Wnt3a/ β -catenin 通路抑制小梁切除术后纤维化

李 婷¹, 张敬一², 吴艳平¹, 戴冬姝², 李 坤¹

引用: 李婷, 张敬一, 吴艳平, 等. 木犀草素通过 Wnt3a/ β -catenin 通路抑制小梁切除术后纤维化. 国际眼科杂志, 2026, 26(11): 1884-1890.

基金项目: 2023-2024 年沧州市科技计划自筹经费项目 (No. 23244102160)
作者单位: (061000) 中国河北省沧州市中心医院¹小儿斜弱视一科; ²青光眼科
作者简介: 李婷, 硕士, 主治医师, 研究方向: 斜视与小儿眼科。
通讯作者: 李婷. lht6r0@sina.com
收稿日期: 2026-06-16 **修回日期:** 2026-09-15

摘要

目的: 探讨木犀草素 (luteolin) 对青光眼小梁切除术后滤过区组织纤维化的影响及其与 Wnt3a/ β -catenin 通路的关系。

方法: 构建兔青光眼小梁切除术后纤维化模型, 随机分为假手术组、模型组、luteolin-L 组、luteolin-H 组。动态监测各组术后眼压波动; 借助裂隙灯显微镜观察术后滤过区结膜组织的形态、结膜愈合程度、角膜完整性以及前房炎症反应; HE 染色评估滤过区结膜上皮完整性、上皮下纤维组织增生程度及炎性细胞浸润情况; Masson 三色染色分析胶原纤维沉积情况进而直观反映组织纤维化的程度; 免疫组织化学法染色观察 α -SMA 的表达情况。通过 RT-qPCR 与 Western blot 技术, 分别定量检测术区结膜组织中 Wnt3a、Wnt7a、Wnt2b、 β -catenin、LC3-I、LC3-II、p62-SQSTM1 的 mRNA 与蛋白表达水平。

结果: 术后动态监测结果显示, 与模型组相比, luteolin-L 组和 luteolin-H 组整体眼压控制效果更优, 且 luteolin-H 组显著优于 luteolin-L 组 (均 $P<0.05$)。裂隙灯观察证实, luteolin 可有效改善术后结膜损伤, 减轻前房炎症反应, 维持滤过区组织结构稳定。HE 和 Masson 染色显示, 与模型组相比, luteolin 干预后结膜上皮损伤减轻, 炎性细胞浸润减少, 成纤维细胞增殖、新生血管生成及胶原过度沉积受到明显抑制, 滤过泡瘢痕化进程显著延缓, 且 luteolin-H 组影响程度较 luteolin-L 组更高; 免疫组织化学染色显示, luteolin 干预可降低 α -SMA 的阳性表达率; 分子检测结果显示, luteolin-H 组术区 Wnt3a、 β -catenin、LC3-II/LC3-I 表达程度低于模型组和 luteolin-L 组, p62-SQSTM1 表达程度最高 (均 $P<0.05$)。Wnt2b、Wnt7a 在各组间表达程度无明显差异, 说明 luteolin 能够特异性调控 Wnt3a 通路且剂量依赖性抑制青光眼小梁切除术后 Wnt3a/ β -catenin 通路激活, 下调 LC3-II/LC3-I 表达、上调 p62-SQSTM1 水平, 抑制过度自噬活化。

结论: luteolin 能明显抑制小梁切除术后滤过泡组织纤维化, 可能是通过 Wnt3a/ β -catenin 通路来减弱纤维化程度。

关键词: 青光眼; Wnt3a/ β -catenin 通路; 术后纤维化; 木犀草素; 小梁切除术
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2026.11.04

Lutein - mediated inhibition of post - trabeculectomy fibrosis via Wnt3a/ β -catenin pathway

Li Ting¹, Zhang Jingyi², Wu Yanping¹, Dai Dongshu², Li Kun¹

Foundation item: 2023 - 2024 Annual Self - Funded Project of Science and Technology Planning in Cangzhou City (No. 23244102160)
¹Department of Pediatric Strabismus and Amblyopia; ²Department of Glaucoma, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, Hebei Province, China
Correspondence to: Li Ting. Department of Pediatric Strabismus and Amblyopia, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000, Hebei Province, China. lht6r0@sina.com
Received: 2026-06-16 **Accepted:** 2026-09-15

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of luteolin on tissue fibrosis in the filtering area following glaucoma trabeculectomy, and its relationship with the Wnt3a/ β -catenin signaling pathway.

• **METHODS:** Rabbits were selected to establish a fibrosis model after glaucoma trabeculectomy, and randomly divided into the sham operation group, model group, luteolin - L group and luteolin - H group. Dynamic monitoring of postoperative intraocular pressure was performed in all groups. Slit - lamp biomicroscopy was used to observe postoperative conjunctival morphological changes, conjunctival healing degree, corneal integrity, and anterior chamber inflammatory responses in the filtering bleb area. HE staining was performed to evaluate conjunctival epithelial integrity, subepithelial fibrous proliferation, and inflammatory cell infiltration in the filtering tissues. Masson's trichrome staining was applied to assess collagen deposition and the degree of tissue fibrosis. The expression of α -SMA was observed by immunohistochemical staining. The mRNA and protein expression levels of Wnt3a, Wnt7a, Wnt2b, β -catenin, LC3-I, LC3-II and p62-SQSTM1 in conjunctival tissues of the operative area were quantitatively detected by RT -

qPCR and Western blot, respectively.

• **RESULTS:** Postoperative dynamic monitoring showed that the luteolin-H group achieved significantly better intraocular pressure control than the luteolin-L group compared with the model group (all $P < 0.05$). Slit lamp observations confirmed that luteolin effectively ameliorated postoperative conjunctival injury, alleviated anterior chamber inflammatory response, and maintained the structural stability of the filtering area. HE and Masson staining revealed that luteolin intervention reduced conjunctival epithelial damage and inflammatory cell infiltration, markedly inhibited fibroblast proliferation, neovascularization and excessive collagen deposition, and significantly delayed the progression of filtering bleb scarring, with stronger effects in the luteolin-H group than luteolin-L group compared with the model group. Immunohistochemical staining demonstrated that luteolin intervention decreased the positive expression rate of α -SMA. Molecular assays indicated that the luteolin-H group had lower expression levels of Wnt3a, β -catenin and LC3-II/LC3-I, and the highest p62-SQSTM1 level in the operative site relative to the model group and luteolin-L group (all $P < 0.05$). No significant intergroup differences were observed in Wnt2b and Wnt7a expression. These findings suggested that luteolin could specifically regulated the Wnt3a pathway and dose-dependently suppressed the activation of the Wnt3a/ β -catenin pathway after glaucoma trabeculectomy, downregulated LC3-II/LC3-I expression, upregulated p62-SQSTM1 levels, and inhibited excessive autophagy activation.

• **CONCLUSION:** Luteolin can significantly inhibit filtering bleb fibrosis after trabeculectomy, which may reduce the degree of fibrosis *via* the Wnt3a/ β -catenin pathway.

• **KEYWORDS:** glaucoma; Wnt3a/ β -catenin pathway; postoperative fibrosis; luteolin; trabeculectomy

Citation: Li T, Zhang JY, Wu YP, et al. Lutein-mediated inhibition of post-trabeculectomy fibrosis *via* Wnt3a/ β -catenin pathway. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2026, 26(11): 1884-1890.

0 引言

青光眼是全球首位可致盲且病情不可逆的视觉神经疾病,2021 年全球青光眼患者约 758.8 万,预计至 2040 年,全球患青光眼人数将高达 1.118 亿^[1]。眼内压增高是导致青光眼发病的核心因素,会导致视网膜神经节细胞凋亡以及少突胶质细胞丢失,轴突损伤不可逆,如果未及时治疗,可能会导致双侧视力受损^[2]。在临床实践中降低眼压的方法通常包括激光治疗、局部药物治疗和手术治疗^[3-4]。青光眼滤过手术能通过将多余的房水排入巩膜和结膜之间的空间以达到降低眼压的目的,但在实际操作中成功率仍较低^[5]。手术失败最主要的原因是滤过道瘢痕形成,尤其是巩膜表层纤维化,这会导致滤过泡功能丧失,进而导致房水引流通道阻塞、眼压复升,研究表明,滤过道瘢痕化在青光眼滤过手术失败原因中占比超 70%,而巩膜表层成纤维细胞异常增殖与胶原过度沉积,正是引

发滤过道瘢痕化、丧失引流功能的核心病理环节^[6],因此,高效避免滤过道瘢痕形成成为手术成功的关键。

小梁切除术后通道瘢痕化的形成与多种基因、蛋白与信号通路的相互作用有关,根据动物模型在术后的伤口愈合情况可将术后反应结果分为两个阶段:急性炎症阶段以及纤维化阶段。小梁切除术后伤口会形成纤维蛋白凝块,导致炎症期中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞被吸引到伤口部位,形成炎症反应,随后成纤维细胞被激活以释放细胞外基质,导致上皮化、血管生成和肉芽组织形成进入增殖期,最后组织重塑和瘢痕形成^[7]。因此,有效抑制术后滤过道瘢痕化、阻断巩膜表层纤维化进程,是维持滤过泡功能、保障手术长期降眼压效果的核心。

木犀草素(luteolin)作为天然黄酮类化合物,广泛存在于金银花、紫苏、荆芥、野菊花等植物当中,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等作用。现有动物实验证明,luteolin可以降低眼压来减弱视神经髓鞘损伤与视网膜组织病变,还可以通过上调MDM2蛋白的表达水平抑制视网膜神经节细胞凋亡^[8]。李茜等^[9]制备视网膜缺血再灌注损伤模型,用不同浓度的luteolin治疗后发现,luteolin可以减轻炎症和氧化应激反应,减少视网膜细胞凋亡,进而改善视网膜缺血再灌注损伤大鼠视网膜功能。在眼科领域的研究表明luteolin可通过调控多条关键信号通路在眼科疾病中发挥广泛的保护作用^[10]。

综上,本研究拟建造青光眼兔模型,探讨luteolin是否可能通过下调Wnt3a/ β -catenin通路的表达,抑制小梁切除术后纤维化的形成,旨在通过新的蛋白通路有效减少小梁切除术后不良反应的发生,为青光眼的治疗提供有效预后措施。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 选取3月龄的雌性健康新西兰兔40只[SCXK(京)2024-0008,北京科宇动物养殖中心],体质量1.8-2.0 kg。所有操作经本院实验动物伦理委员会批准,意见号:2024-1207-01(Z)。

1.1.2 **药物与试剂** luteolin(质量>98%,货号:L812409,上海麦克林生化科技有限公司);石蜡(货号:S26196,上海源叶生物科技有限公司);乙醇(货号:100092187)、二甲苯(货号:10023418)均购自国药集团化学试剂有限公司;1%盐酸乙醇(货号:C1011)购自江苏世泰实验器材有限公司;盐酸丙美卡因滴眼液、戊巴比妥(货号:C13700000)均购自沈阳兴齐眼药股份有限公司;伊红染色液(货号:C1410)、RIPA裂解液(货号:C1053)购自北京普利莱基因技术有限公司、苏木精染液(货号:C1001)购自江苏世泰实验器材有限公司、柠檬酸盐缓冲液(货号:ZLI-9064)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; α -SMA一抗(货号:A5228)购自Sigma-Aldrich公司;免疫组化检测试剂盒(货号:PV-6002)、DAB显色液(货号:ZLI-9018)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Wnt3a(货号:#2391)、 β -catenin(货号:#9562)、LC3B(货号:#2775)、SQSTM1/p62(货号:#8025)、GAPDH(货号:#5174)均购自CST;Wnt7a(货号:ab274321)、Wnt2b(货号:ab178418)均购买自Abcam;PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(货号:6210A);BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);ECL化学发光液(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.1.3 主要仪器 裂隙灯显微镜 (SL-2G, 日本 Topcon 公司)、回弹式眼压计 (TONOVET TV01, 芬兰 iCare) 光学显微镜 (DM2500, 日本 Olympus 公司)、组织研磨仪 (Tissuelyser-48L, 上海净信实业发展有限公司)、数显恒温水浴锅 (HH-4, 常州国华电器有限公司)、高速冷冻离心机 (LX-155T500R, 青岛海尔生物医疗股份有限公司)、全自动雪花制冰机 (XB-40, 宁波新芝生物科技股份有限公司)、烘片机 (HD-330, 湖北省孝感市宏业医用仪器有限公司)、石蜡切片机 (HM340 半自动轮转切片机, 赛默飞世尔 Thermo Fisher 公司)、凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 青光眼模型制备与小梁切除术分组

1.2.1.1 青光眼模型制备 造模前常规饲养 1 wk 以适应环境,并用裂隙灯显微镜采用单盲法检查以排除眼部疾病,回弹式眼压计记录基础眼压。随机选取 6 只兔设为假手术组,其他兔均采用前房内注射复方卡波姆混合液的方式构建兔青光眼动物模型。实验兔经 3% 戊巴比妥钠溶液 4-5 mL 肌肉麻醉,待麻醉效果稳定后,统一选用右眼作为实验造模眼,在颞上方角膜缘位置用 1 mL 注射针头穿刺,先抽取 0.1 mL 房水,再向前房瞳孔区域缓慢注入等体积配制好的混合药液。手术操作结束后,局部涂抹氧氟沙星眼膏预防眼部感染,全程实验操作由同一人员规范完成,保证操作统一。模型建立合格判定条件:动物眼压连续 7 d 超过 22 mmHg。

1.2.1.2 施行小梁切除术 青光眼造模后 7 d 共造模成功 27 只兔,将其均分为 3 组:模型组、luteolin-L 组 (20 μmol/L)、luteolin-H 组 (40 μmol/L),对所有模型兔的右眼进行小梁切除术实验。小梁切除术操作步骤为:兔耳缘静脉注射 30 mg/kg 的戊巴比妥溶液以全身麻醉,术眼滴盐酸丙美卡因滴眼液 (5 mg/mL) 局部麻醉,开睑器撑开眼睑,沿角膜缘分离结膜,以角膜缘为基底,剪开球结膜及筋膜囊,分离至角膜缘,分离出 3 mm×3 mm 的 1/2 巩膜厚度的巩膜瓣,切除 1 mm×2 mm 的小梁组织后,用虹膜剪刀切除周边部虹膜,范围略大于小梁切缘,防止虹膜嵌顿阻塞滤过通道,用 10-0 尼龙线缝合巩膜瓣,用 8-0 尼龙线缝合结膜至水密^[11]。在术后当天向 luteolin-L 组与 luteolin-H 组术眼下方远离滤过泡位置的穹隆结膜下分别注射 0.2 mL 对应浓度的 luteolin,连续 7 d、1 次/天。另设置假手术组,不进行造模实际操作,与模型组均于穹隆结膜下注射 0.2 mL 生理盐水,频次同 luteolin-L 组与 luteolin-H 组。最终每组取 6 只兔进行后续实验取材。

1.2.2 术后活体观察

1.2.2.1 裂隙灯显微镜观察 小梁切除术后第 28 d 观察

术眼滤过泡的形态、结膜愈合程度、角膜上皮透明度以及前房炎症反应。

1.2.2.2 眼压记录 青光眼造模前 1 d、小梁切除术前 1 d 及术后第 1、7、14、28 d 用眼压计记录眼压情况,重复测量 3 次,取平均值。

1.2.3 样本采集与保存 所有兔子在小梁切除术后常规饲养 28 d 后经静脉注射过量戊巴比妥钠进行安乐死,摘取完整眼球后使用组织剪于视神经筛板处沿着眼球水平横轴剪开组织,切取范围覆盖手术操作区域,截取大小约 10 mm×10 mm 的全层眼球壁组织样本。

1.2.4 石蜡切片的制备 将剪取的组织样本分为两份,一份保存于-80℃,用于后续的基因水平以及蛋白水平的检测,一份制成石蜡切片:放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,依次用不同浓度的乙醇 (70%、80%、90%、100%) 脱水 2 h;脱水后的样本在二甲苯中浸泡 40 min,常规石蜡包埋后 4 μm 切片,置于烤箱中 65℃ 30 min。

1.2.5 HE 染色 将石蜡切片使用二甲苯脱蜡,不同浓度乙醇 (100%、90%、80%、70%) 各浸泡 5 min 复水后用蒸馏水冲洗 5 min;切片浸入苏木精染液中染色 5 min 后用 1% 的盐酸酒精分化 30 s,自来水冲洗 10 min;浸入伊红染液中染色 2 min 后再次用梯度乙醇 (100%、90%、80%、70%) 浸泡各 5 min,二甲苯处理,中性树胶封片后采用单盲法显微观察。

1.2.6 Masson 染色 将石蜡切片经二甲苯脱蜡,不同浓度乙醇 (100%、90%、80%、70%) 复水处理后蒸馏水冲洗 5 min,Masson 三色染色后梯度乙醇处理、二甲苯透明,中性树胶封片后采用单盲法显微观察染色情况。

1.2.7 免疫组织化学法染色 石蜡切片经脱蜡、梯度水化后,进行抗原修复处理。滴加稀释度为 α-SMA (1:1 200) 一抗,于 4℃ 条件下孵育过夜。后续操作严格按照免疫组化试剂盒说明书执行,以 DAB 为显色剂进行显色反应。采用单盲法在光学显微镜下观察染色结果。

1.2.8 RT-qPCR 将在-80℃ 保存的兔眼样本用组织研磨仪研磨后采用改良 CTAB-LiCl 法提取样本总 RNA,根据 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将总 RNA 反转录成 cDNA。为了标准化实验结果,选取 GAPDH 为内参基因,并设计相应的 qPCR 引物,见表 1,反应体系为 20 μL;2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL,10 pmol 上下游引物各 0.4 μL,cDNA 1 μL,灭菌超纯水 8.2 μL。PCR 程序为:95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火延伸 40 s,总共 40 个循环。每个样品进行 3 次生物学重复,采用 2^{ΔΔCT} 法计算基因相对表达量。

1.2.9 Western blot 法检测相关蛋白的表达 取出-80℃ 保存的兔眼样本,加入预冷的 RIPA 裂解液,冰上裂解

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
Wnt3a	CGGGTCTTCTCTGGTCTTG	CTGACAGTGGTGCAGTTCCA
β-catenin	ATCATTCTGGCCAGTGCTGG	GACAGCACCTTCAGCACTCT
LC3B	TTCGAGAGCAGCATCCAACC	CTCGTAGATGTCCGCCATGG
Wnt2b	CGGGACCACACCGTCTTT	GCGAGTAATAGCGTGGA
Wnt7a	CTGTGGCTGCCACAAAGAGAA	GCCGTGGCACTTACATTC
p62-SQSTM1	AGTCTCTGGCGGAGCAGATGA	TCTGGCATCTGTAGGGACTGGA
GAPDH	TGGTGCTGAGTATGTCCTGG	GGTTCACACCCATCACAAAC

10 min,4 ℃,3 000 g/min 离心 10 min,吸取上清液,使用 BCA 法测定蛋白浓度,保证各样品蛋白浓度一致,加入 4× Loading Buffer,水浴加热 5 min 使蛋白变性,冰上冷却 2 min后进行 SDS-PAGE 电泳,80 V,20 min,再 120 V,40 min;湿法转膜后放入 5%脱脂奶粉中室温摇床封闭 2 h,加入稀释后的一抗孵育液中4 ℃孵育过夜后与对应二抗室温孵育 2 h;TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min 以除去未结合的二抗;滤纸吸去多余的水分,均匀滴加 ECL 发光液,放入凝胶成像仪中曝光,获取图像。

统计学分析:数据通过 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。重复测量数据首先行重复测量方差分析判定整体差异,整体效应显著时,事后比较采用 LSD-*t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术眼形态观察 小梁切除术后 28 d,假手术组滤过泡呈弥散性分布,囊壁菲薄、光滑,呈淡黄色半透明外观,表面血管化程度极低,房水引流通畅,为典型的功能性滤过泡形态;模型组滤过泡区结膜下组织充血显著,血管网密集增生,滤过泡呈局限性、实性隆起,无明显半透明房水滞留区;luteolin-L 组滤过泡充血程度明显改善,血管增生减少,呈淡红色弥散性隆起,囊壁厚度适中,可见轻度房水滞留;luteolin-H 组滤过泡呈苍白色/淡黄色薄壁半透明隆起,表面血管化几乎消失,囊壁菲薄,房水滞留形成的囊腔感明显,见图 1。

2.2 眼压变化记录 各组不同时间点眼压差异有统计学意义($F_{\text{时间}} = 375.4, P_{\text{时间}} < 0.01; F_{\text{组间}} = 246.2, P_{\text{组间}} < 0.01; F_{\text{交互}} = 396.1, P_{\text{交互}} < 0.01$);造模前 1 d,各组眼压差异无统计学意义($P > 0.05$),小梁切除术前 1 d,模型组、luteolin-L、luteolin-H 组眼压相较假手术组显著升高,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$),luteolin-L、luteolin-H 组眼压与模型组无显著差异($P > 0.05$)。术后 1、7、14、28 d,与假手术组相比,模型组眼压显著升高(均 $P < 0.01$)。与模型组相比,luteolin-L 组、luteolin-H 组眼压明显下降(均 $P < 0.05$);与 luteolin-L 组相比,术后各时间点 luteolin-H 组眼压更低(均 $P < 0.05$),表明 luteolin 降眼压效应存在剂量依赖性,见表 2。

2.3 组织病理学观察

2.3.1 luteolin 抑制小梁切除术后滤过区结膜组织纤维细胞生长 小梁切除术后第 28 d,滤过区结膜组织的 HE 染色图见图 2A;各组之间滤过泡结膜组织均有差异。假手术组组织结构完整连续,细胞排列规整有序;模型组

术组结膜下可见大量成纤维细胞,形态及排列不规则;大量胶原纤维增生;luteolin-L 组滤过泡区域内瘢痕组织明显,成纤维细胞较多,胶原纤维也多,排列较为紊乱,瘢痕组织内有少许间隙;luteolin-H 组结膜下 Tenon 囊中瘢痕组织内成纤维细胞密度低,胶原纤维稀疏,整齐排列。

2.3.2 luteolin 抑制小梁切除术后滤过泡瘢痕化 Masson 染色结果显示,假手术组胶原纤维分布均匀、走行规则,胶原蛋白无异常堆积;模型组滤过区结膜下可见大量致密蓝色胶原纤维,胶原排列紊乱、堆积明显,提示纤维化程度高,滤过泡瘢痕化显著;luteolin-L 组胶原纤维增生较多,排列较紊乱,组织间有少许间隙;luteolin-H 组胶原纤维密度较低,排列尚规则,见图 2B。

2.3.3 luteolin 抑制 α -SMA 增殖 免疫组化染色结果显示,假手术组组织内棕红色阳性染色稀少、着色浅淡;模型组大范围深棕红色阳性染色,阳性面积与染色强度显著升高;luteolin-H 组滤过泡组织中 α -SMA 阳性表达显著降低,仅见少量散在弱阳性染色,肌成纤维细胞活化受到明显抑制;luteolin-L 组 α -SMA 表达水平虽有下降,但阳性表达仍较明显,染色强度与范围介于模型组与 luteolin-H 组之间,见图 2C。

2.4 luteolin 对 Wnt3a/ β -catenin 通路相关分子 mRNA 表达的影响 qPCR 检测结果显示,与假手术组对比,模型组 β -catenin、Wnt3a、LC3B mRNA 表达显著升高(均 $P < 0.01$),p62-SQSTM1 表达显著降低($P < 0.01$),Wnt2b、Wnt7a 的转录水平变化差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与模型组相比,给予不同浓度 luteolin 干预后, β -catenin、Wnt3a、LC3B 表达呈浓度依赖性下调(均 $P < 0.01$),p62-SQSTM1 表达呈浓度依赖性回升($P < 0.01$)。上述结果表明,luteolin 能够抑制异常激活的 Wnt3a/ β -catenin 通路,见表 3,图 3。

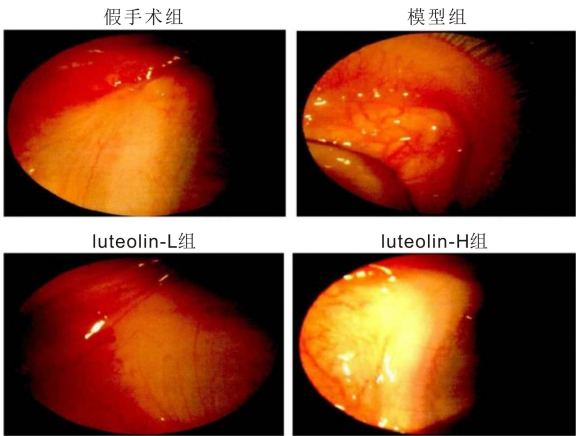


图 1 各组术眼滤过泡形态。

表 2 各组手术前后眼压变化 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

分组	造模前 1 d	术前 1 d	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 28 d
假手术组	14.32±0.74	13.22±0.46	14.47±0.23	14.85±1.66	13.65±2.195	13.21±0.69
模型组	13.97±0.61	29.47±1.58 ^{b,h}	27.62±1.93 ^{b,i}	22.77±1.45 ^{b,j}	24.52±1.45 ^{b,i}	27.85±1.12 ^b
lutiolin-L 组	13.84±0.49	29.06±1.04 ^{b,h}	23.43±0.75 ^{e,i}	20.56±1.70 ^{e,j}	19.68±0.72 ^{d,j}	16.12±0.72 ^{d,j}
lutiolin-H 组	14.15±0.64	29.11±0.92 ^{b,h}	21.17±0.30 ^{d,e,j}	17.36±1.42 ^{d,e,j}	16.11±0.69 ^{d,e,j}	15.13±1.28 ^{d,e,j}

注: ^b $P < 0.01$ vs 假手术组; ^e $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组; ^e $P < 0.05$ vs luteolin-L 组; ^b $P < 0.01$ vs 造模前 1 d; ⁱ $P < 0.05$, ^j $P < 0.01$ vs 术前 1 d。

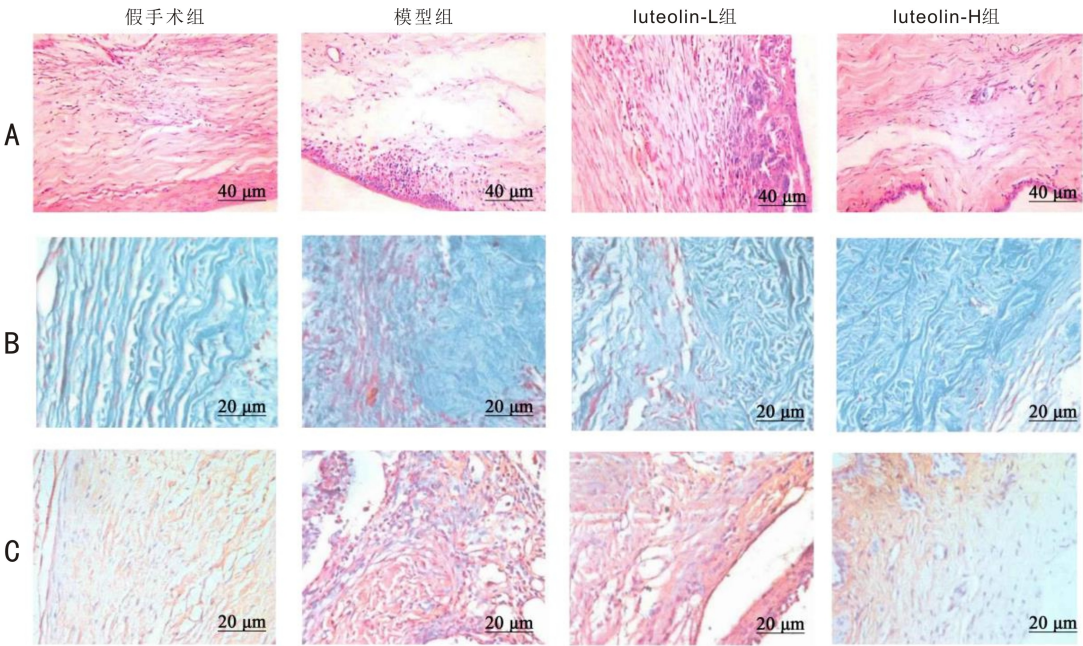


图2 兔眼小梁切除术后滤过泡组织的病理染色与免疫组化检测结果 A:HE 染色切片;B:Masson 染色切片;C:α-SMA 免疫组化染色切片。

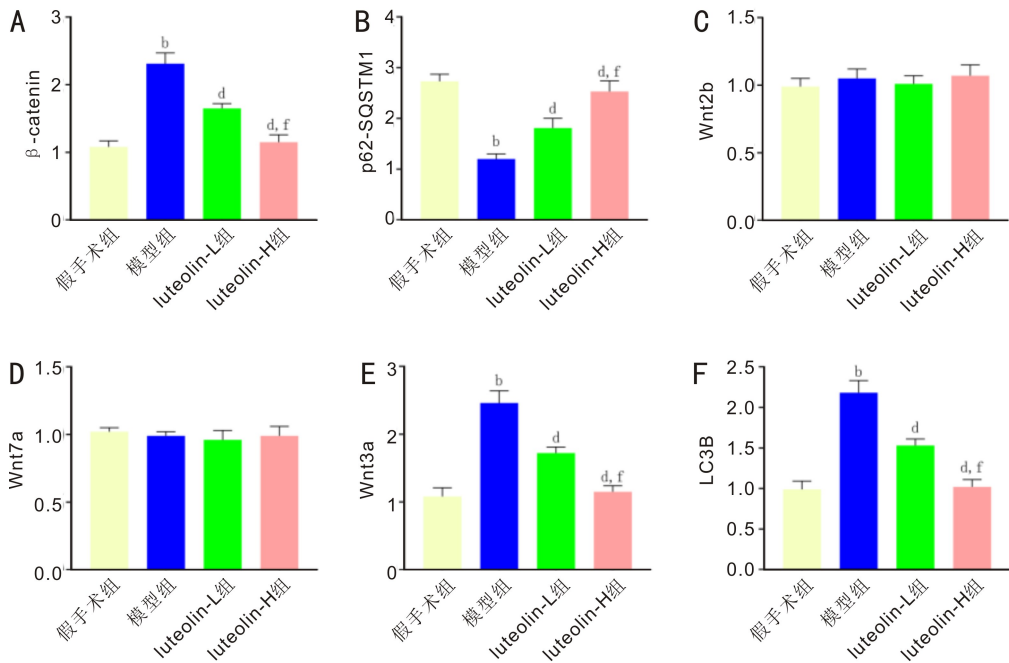


图3 qPCR 检测各组 Wnt3a/β-catenin 通路相关因子的 mRNA 相对表达量 A:β-catenin;B:p62-SQSTM1; C:Wnt2b; D:Wnt7a; E:Wnt3a; F:LC3B; ^b*P*<0.01 vs 假手术组; ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^f*P*<0.01 vs luteolin-L 组。

表3 各组兔眼组织 Wnt3a/β-catenin 通路相关因子 mRNA 相对表达水平比较						$\bar{x}\pm s$
分组	β-catenin	p62-SQSTM1	Wnt2b	Wnt7a	Wnt3a	LC3B
假手术组	1.08±0.09	2.73±0.14	0.99±0.06	1.02±0.03	1.08±0.13	0.99±0.10
模型组	2.31±0.16 ^b	1.20±0.10 ^b	1.05±0.07	0.99±0.06	2.46±0.18 ^b	2.18±0.15 ^b
luteolin-L 组	1.65±0.07 ^d	1.81±0.19 ^d	1.01±0.06	0.96±0.07	1.62±0.09 ^d	1.53±0.08 ^d
luteolin-H 组	1.15±0.11 ^{d,f}	2.53±0.21 ^{d,f}	1.07±0.08	0.99±0.07	1.15±0.09 ^{d,f}	1.02±0.09 ^{d,f}
<i>F</i>	234.7	158.2	2.1	1.1	405.9	217.4
<i>P</i>	<0.01	<0.01	0.126	0.361	<0.01	<0.01

注: ^b*P*<0.01 vs 假手术组; ^d*P*<0.01 vs 模型组; ^f*P*<0.01 vs luteolin-L 组。

2.5 luteolin 对 Wnt3a/β-catenin 通路相关蛋白表达水平的调控作用 Western blot 结果显示,相较于假手术组,模型组 β-catenin、Wnt3a 表达水平显著上调(均 *P*<0.01), Wnt2b 与 Wnt7a 蛋白表达未见组间统计学差异;同时p62-

SQSTM1 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$), LC3- II /LC3- I 比值显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 给予不同浓度 luteolin 干预后, β -catenin、Wnt3a、LC3- II /LC3- I 的表达异常升高被 luteolin 浓度依赖性抑制 (均 $P<0.01$), p62-SQSTM1 蛋白水平同步呈剂量依赖性回升 ($P<0.01$), 蛋白表达变化趋势与前期 qPCR 检测结果相互印证, 表明 luteolin 可通过抑制 Wnt3a/ β -catenin 过度活化、重塑机体紊乱的自噬态发挥保护作用, 且该药理效应具备明显的剂量依赖特征, 见表 4, 图 4。

3 讨论

目前, 青光眼小梁切除术被认为是降低眼压, 治疗青

光眼的最有效手段, 其核心在于通过建立人工滤过通道, 降低房水流出阻力以控制眼压。然而, 术后创伤愈合反应引发的过度炎症反应、异常活化的纤维化信号通路及自噬失衡, 会加速结膜下成纤维细胞增殖与细胞外基质沉积, 造成滤过通道闭塞、促使滤过泡功能丧失, 眼压回升。因此, 靶向调控创伤后炎症反应、纤维化信号通路及自噬紊乱状态, 是改善小梁切除术后预后的重要研究方向。

luteolin 在微摩尔浓度下即显示较强的抗炎活性, 因此已成为一种潜在的抗炎化合物, 可通过调控炎症介质分泌与炎症相关信号通路的活化, 减轻局部炎性细胞浸润, 进而发挥显著的抗炎生物学效应^[12]。本研究中, luteolin

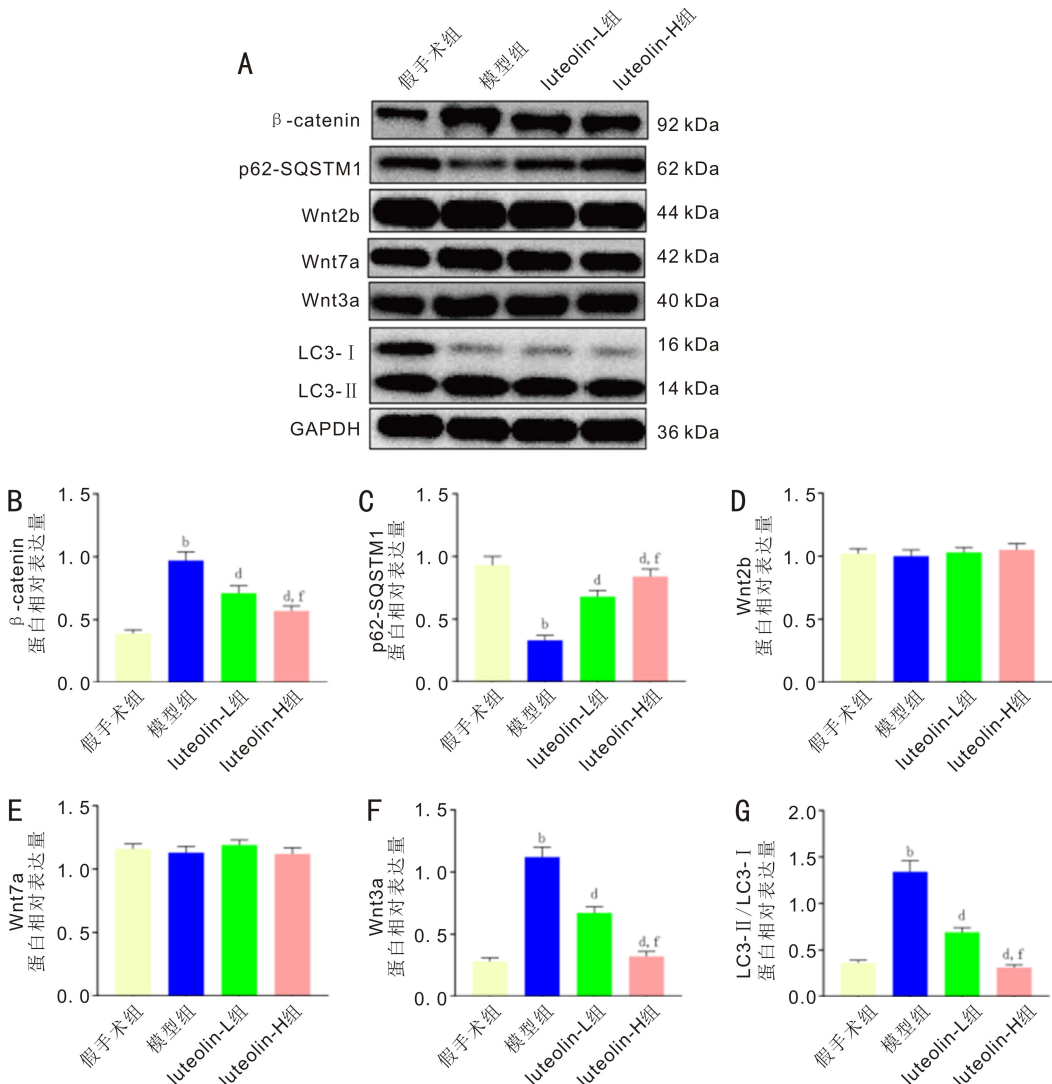


图 4 luteolin 调控 Wnt3a/ β -catenin 通路相关蛋白水平的表达 A: Western blot 检测各组蛋白表达; B: β -catenin; C: p62-SQSTM1; D: Wnt2b; E: Wnt7a; F: Wnt3a; G: LC3- II /LC3- I ; ^b $P<0.01$ vs 假手术组; ^d $P<0.01$ vs 模型组; ^f $P<0.01$ vs luteolin-L 组。

表 4 各组兔眼组织 Wnt3a/ β -catenin 通路相关蛋白相对表达水平比较

分组	β -catenin	p62-SQSTM1	Wnt2b	Wnt7a	Wnt3a	LC3- II /LC3- I
假手术组	0.39±0.03	0.93±0.07	1.02±0.04	1.16±0.04	0.28±0.03	0.36±0.03
模型组	0.97±0.07 ^b	0.33±0.04 ^b	1.00±0.05	1.13±0.05	1.12±0.08 ^b	1.34±0.12 ^b
luteolin-L 组	0.71±0.06 ^d	0.68±0.05 ^d	1.03±0.04	1.19±0.04	0.67±0.05 ^d	0.69±0.05 ^d
luteolin-H 组	0.57±0.04 ^{d,f}	0.84±0.06 ^{d,f}	1.05±0.05	1.12±0.08	0.32±0.04 ^{d,f}	0.31±0.03 ^{d,f}
F	287.4	176.8	1.5	2.1	321.6	249.5
P	<0.01	<0.01	0.248	0.122	<0.01	<0.01

注: ^b $P<0.01$ vs 假手术组; ^d $P<0.01$ vs 模型组; ^f $P<0.01$ vs luteolin-L 组。

干预可有效平稳术后眼压,且 luteolin-H 组在术后 28 d 基本恢复至术前基线水平,术后结膜损伤小、新生血管生成受到显著抑制,滤过区组织结构更稳定;HE 和 Masson 染色病理结果证实,luteolin-H 组滤过区结膜上皮层结构基本规整,纤维化被显著抑制,滤过泡瘢痕化程度最轻;免疫组化染色显示,luteolin 干预可以降低 α -SMA 的阳性表达,且 luteolin 高剂量干预比低剂量干预效果更显著。有研究表明,luteolin 可靶向干预 Wnt/ β -catenin 信号轴,调控关键分子的转录与蛋白表达,参与纤维化进程的病理调控^[13]。陈姝伶等^[14]利用四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠模型及 TGF- β 1 活化肝星状细胞体外模型证实,luteolin 能够显著抑制异常增殖与细胞外基质过度沉积,有效阻滞脏器纤维化的发生与发展。

相较于传统抗代谢药物,luteolin 作为天然黄酮类活性化合物,药理作用温和,无明显细胞毒性及不良反应,安全性更具优势。其可通过多靶点、多通路协同作用,同步调控炎症反应、Wnt/ β -catenin 信号通路及细胞自噬稳态,实现对青光眼术后滤过泡纤维化的高效干预^[15]。luteolin 可通过抑制活化巨噬细胞中炎症介质的释放,并促进抗炎因子的分泌,从而减轻机体的炎症损伤,发挥抗炎保护作用^[16]。高剂量的 luteolin 给药可显著下调小梁切除术后兔眼结膜组织中 Wnt3a、 β -catenin 的基因与蛋白表达,抑制 Wnt/ β -catenin 经典纤维化通路过度激活,减少纤维组织增生;同时可降低 LC3-II 表达、上调 p62 水平,有效纠正术后过度自噬状态,缓解自噬介导的组织损伤与瘢痕进展,而 Wnt2b、Wnt7a 的 mRNA 及蛋白表达水平均未见显著差异,表明在 Wnt 家族成员中,luteolin 主要特异性调控 Wnt3a 信号,而非广泛激活或抑制 Wnt 家族其他亚型。由此证实,Wnt3a 是介导 luteolin 抑制青光眼术后纤维化的关键上游调控因子且 luteolin 存在剂量依赖性的抗青光眼术后纤维化作用。赵灿斌等^[17]通过 GO 和 KEGG 富集分析发现,存在基因可以调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,随着 luteolin 的加入,炎症微环境下 Wnt/ β -catenin 信号通路受到激活。同时有研究证实,自噬是真核生物中特有的自我防护机制,依赖溶酶体降解途径清除自身细胞质蛋白和受损细胞器,维持细胞代谢平衡^[18],luteolin 可以调控线粒体自噬相关通路,减少细胞凋亡与炎症损伤^[19-20]。

综上,本研究首次构建兔小梁切除术后滤过泡纤维化在体模型,系统验证天然黄酮 luteolin 可通过调控 Wnt3a/ β -catenin 信号轴改善术后眼压、抑制炎症、拮抗纤维化、纠正自噬紊乱,保护滤过泡功能。相较于临床常规术使用的传统抗代谢药物,luteolin 为天然植物活性成分,药理作用温和,无明显细胞毒性,为青光眼术后抗瘢痕治疗提供低毒安全新方向。此外,本研究尚存在不足之处,未使用 Wnt/ β -catenin 通路激活剂验证该通路的功能,且未开展该通路的回复实验,无法进一步明确 luteolin 通过调控该通路拮抗滤过区纤维化作用的特异性及因果关系。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:李婷研究指导,论文撰写;张敬一、吴艳平

研究实施,数据整理;戴冬姝、李坤统计学分析。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

[1] Peng Y, Han L, Jiang Q, et al. Global, regional and national burden of glaucoma from 1990 to 2021 and projections to 2050: a retrospective cross-sectional study. *BMJ Open*, 2026,16(1):e108975.

[2] Zhang C, Lim H, Ballheim JD, et al. Intraocular pressure induced blood retinal barrier compromise in mouse models and human glaucoma. *Nat Commun*, 2026,17(1):5003.

[3] 刘苗苗,唐浪娟,吴利,等.青光眼患者眼压管理的最佳证据总结. *护理学杂志*, 2026,41(3):36-40.

[4] Bayraktar S, Serbest Ceylanolu K, En E. Oculoplastic challenges in patients with glaucoma. *Turk J Ophthalmol*, 2025,55(4):221-229.

[5] 张语洋,申颖,佟欣雨,等.水飞蓟宾通过诱导细胞自噬及凋亡双重机制抑制兔青光眼术后纤维化. *南方医科大学学报*, 2026,46(3):666-674.

[6] Du Z, Yan X, Cheng L, et al. Luteolin attenuates experimental dry eye disease via dual modulation of macrophage jak-stat signaling and corneal epithelial mapk pathways. *Phytomedicine*, 2025,148:157300.

[7] 张俊芳,史桂桃,陈启.抗瘢痕化治疗在青光眼滤过手术中的研究进展. *内蒙古医科大学学报*, 2022,44(6):664-668,672.

[8] 赵秀兰.基于网络药理学和动物实验探讨木犀草素对视神经保护作用的研究. *成都中医药大学*, 2021.

[9] 李茜,王红星,傅强,等.木犀草素对视网膜缺血-再灌注损伤(RIRI)大鼠 TLR4/Syk/NF- κ B 信号通路及视网膜的影响. *眼科新进展*, 2021,41(4):311-316.

[10] 贺思捷,郭滨,蒋文君.木犀草素在眼科疾病中的研究进展. *国际眼科杂志*, 2026,26(4):651-656.

[11] 姜春.局部应用贝伐单抗促进兔小梁切除术后功能性滤过泡形成的探索. *苏州大学*, 2023.

[12] 杨萍,刘军刚,李学娟,等.木犀草素治疗炎症性疾病作用机制研究进展. *中草药*, 2025,56(22):8424-8435.

[13] 董武,卢孟康,王强,等.木犀草素对大鼠股骨骨折愈合及 Wnt/ β -catenin 信号通路影响. *辽宁中医药大学学报*, 2023,25(7):21-25.

[14] 陈姝伶,王曦旋,李瑞祺,等.木犀草素抑制肝星状细胞自噬缓解肝纤维化的作用及机制. *中国药理学通报*, 2025,41(10):1875-1883.

[15] 余梅,李波,葛正行,等.基于网络药理学及分子对接技术分析马鞭草-虎杖治疗新型冠状病毒感染的的作用机制. *中医临床研究*, 2023,15(33):17-24.

[16] 赵灿斌,曾平,石炜琦,等.木犀草素调控巨噬细胞极化治疗膝关节关节炎的机制. *中国组织工程研究*, 2026,30(34):8868-8877.

[17] 赵灿斌,邵将,管东辉,等.木犀草素在炎症微环境下调控 Wnt/ β -catenin 信号通路促进骨髓间充质干细胞成软骨分化的机制. *山东大学学报(医学版)*, 2025,63(7):11-22.

[18] 韩玉鹏.木犀草素上调 Sirt1 促进自噬缓解糖尿病肾损伤的作用研究. *浙江省医学科学院*, 2024.

[19] Zhang SY, Wu JJ, Zhang YJ. Targeting mitophagy in diabetic retinopathy: novel insights into SQSTM1/BNIP3L pathway regulated by luteolin. *Front Pharmacol*, 2025,16:1593213.

[20] Zhang SY, Wu JJ, Wang LL, et al. SIRT1/P53 in retinal pigment epithelial cells in diabetic retinopathy: a gene co-expression analysis and He-Ying-Qing-Re formula treatment. *Front Mol Biosci*, 2024,11:1366020.