

引文格式:陈慈民,张雨,陈美玲,徐柒华.木犀草素与青蒿琥酯联合用药防治实验性外伤性增生性玻璃体视网膜病
变[J].眼科新进展,2023,43(9):680-685. doi:10.13389/j.cnki.rao.2023.0137

【实验研究】

木犀草素与青蒿琥酯联合用药防治实验性外伤性增生性玻璃体视网膜病变[△]

陈慈民 张 雨 陈美玲 徐柒华

作者简介:陈慈民(ORCID:0000-0001-9368-7603),男,1994年8月出生,江西赣州人,硕士。研究方向:眼外伤的临床和基础研究。E-mail:1162295345@qq.com

通信作者:徐柒华(ORCID:0000-0003-4857-7880),男,1976年12月出生,江西上饶人,博士,主任医师,博士生导师。研究方向:眼外伤的临床和基础研究。E-mail:xu7gangang@163.com

收稿日期:2023-03-22

修回日期:2023-06-14

本文编辑:臧赫

△基金项目:国家自然科学基金(编号:82260210);江西省卫生健康委科技计划项目(编号:202210048);江西省重点研发计划项目一般项目(编号:20202BBG73023);江西省中医药科技计划一般项目(编号:2021B667)

作者单位:330006 江西省南昌市,南昌大学附属眼科医院

【摘要】 目的 探讨木犀草素(LU)与青蒿琥酯(ART)联合用药在外伤性增生性玻璃体视网膜病变(TPVR)中的作用。**方法** 选取16只月龄、体重相近的健康成年雄性青紫蓝兔,实验眼(右眼)玻璃体内注射富含血小板血浆0.3 mL制作TPVR模型。将实验兔随机分成4组,每组4只,对照组玻璃体内注射0.2 mL生理盐水;单用药物组分别在玻璃体内注射0.2 mL的LU(LU组)及0.2 mL的ART(ART组),联合用药组(联合组)玻璃体内注射LU及ART各0.1 mL。注药后第4周通过眼部B超及眼底照相检查观察玻璃体混浊情况及视网膜改变情况并划分相对应的增生性玻璃体视网膜病变(PVR)等级;取眼球组织行Western blot实验检测各组α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达水平,制作眼球组织切片行HE染色观察结构改变。PVR分级等级资料比较采用秩和检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间差异比较使用Bonferroni检验。**结果** 眼部B超及眼底照相检查观察结果提示,ART组、LU组及联合组兔玻璃体改变均优于对照组。ART组、LU组、联合组PVR分级均优于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$)。Western blot检测结果显示,联合组兔玻璃体内α-SMA表达水平最低;联合组、ART组、LU组α-SMA表达水平均低于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);其中,联合组α-SMA与LU组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),联合组α-SMA与ART组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE染色结果显示,对照组视网膜脱离、水肿最严重,联合组兔视网膜脱离,结构大体平整,损伤轻于ART组及LU组。**结论** 玻璃体内注射LU、ART的联合用药可有效抑制实验动物模型TPVR的发展,优于LU、ART的单独治疗效果。未来应进一步研究联合用药的具体协同机制,为治疗TPVR的研究打下基础。

【关键词】 木犀草素;青蒿琥酯;联合用药;上皮间充质转化;外伤性增生性玻璃体视网膜病变

【中图分类号】 R774.1

外伤性增生性玻璃体视网膜病变(TPVR)是由眼外伤直接导致的增生性玻璃体视网膜病变(PVR)。外伤后,损伤的玻璃体视网膜修复产生增殖膜收缩,进一步牵拉视网膜,对患者视力及生活质量影响极大^[1]。外伤患者常合并眼内炎、外伤性白内障及玻璃体积血等,TPVR进一步提高了病情复杂程度,当下手术治疗的技术难度大、脱离的视网膜完成解剖学复位但功能恢复不理想等都是需要解决的治疗难题^[2]。目前常用的辅助用药为肾上腺皮质激素类药物曲安奈德,常用于术前玻璃体内注射防治PVR及辅助玻璃体显色^[3]。然而,其对视网膜的毒性损害尚在争论之中,有研究报道曲安奈德玻璃体内注射可能增加青光眼及白内障的发生风险^[4]。木犀草素(LU)是在木犀草中分离出的一种天然黄酮类化合物。LU具有抗炎、抗肿瘤等作用,其可降低炎症因子的表达,减少氧化应激诱导的细胞死亡,对视网膜具有保护作用^[5]。青蒿琥酯(ART)是中药青蒿提取物的衍生物,在眼部可通过诱导血管内皮细胞凋亡,抑制角膜新生血管,发挥抗炎作用治疗葡萄膜炎^[6-7]。近年关于PVR药物治疗的研究较多,如

氨甲蝶呤^[8]、柔红霉素^[9]、吡非尼酮^[10];中药提取物,如藏红花酸^[11]、姜黄素、丹参单体和苦参碱^[12]等,亦有两两药物联合,如蛋白激酶C抑制剂和褪黑素^[13]、氟尿嘧啶联合替普生^[14]、抗肿瘤药物博来霉素相关药物^[15]。然而既往许多药物实验存在阳性结果不明显或药物毒性较大等不足之处。因此,本次实验旨在通过建立动物实验性TPVR模型,向玻璃体内注射LU与ART联合药物,探讨其对TPVR的抑制效果,为临床治疗TPVR提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性成年青紫蓝兔16只,体重(约2.5 kg)、月龄(约8周)相近,由赣州市畜牧水产研究所[合格证号:SCXK(赣)2018-0009]提供,实验前均行眼部检查排除眼部疾病。本实验已获得南昌大学附属眼科医院医学研究伦理委员会核查许可。

1.2 主要实验材料及仪器

LU(南京复苏生物科技有限公司);ART(北京索莱宝科技有限公司);加替沙星滴眼液(安徽省双

科药业有限公司);B 超机(Aviso);眼底照相机(NIDEK 医疗器械贸易上海有限公司);PBS(Hyclone);蛋白酶抑制剂(翌圣生物科技上海股份有限公司);蛋白酶抑制剂混合物(武汉卡诺斯科技有限公司);MARKER(赛默飞世尔科技公司);一抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)(杭州景杰生物科技股份有限公司);GADPH(杭州景杰生物科技股份有限公司);二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(ABMART 医药科技上海有限公司);ECL 化学发光检测试剂盒(Advantsta);苏木精染液(MERCK);伊红染液(MERCK)。

1.3 动物 TPVR 模型建立及分组

兔耳碘伏消毒后,使用连接浅蓝色真空采血管(含 $38\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸钠)的一次性采血针抽取足量实验兔动脉血,转入离心管中,置室温、 $1\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 状态下离心,取体积上 $1/3$ 上清液行血小板计数,获得血小板密度为 $(1.9\sim2.8)\times10^{11}\text{ 个}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将 16 只雄性青紫蓝兔使用简单随机抽样方法分为对照组、LU 组、ART 组及联合用药组(联合组),每组 4 只,均以右眼为实验眼。表面麻醉术眼,开睑器开睑后,于颞上方角巩膜缘后 5 mm , 15° 穿刺刀向兔眼玻璃体中心部穿刺,造成长约 2.5 mm 的巩膜穿刺口,注意避开晶状体。随后使用 1 mL 注射器抽取 0.3 mL 玻璃体,更换注射器注入自体等量含血小板血浆。既往相关实验研究已证实该造模方法能够获得等级相近的 TPVR 模型^[16]。术后 1 周内,术眼每日 3 次使用加替沙星滴眼液预防感染。造模 3 d 后,在实验眼的鼻上方角巩膜缘后 5 mm 分别向对照组注入 0.2 mL 生理盐水,LU 组注入 0.2 mL 的 LU($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),ART 组注入 0.2 mL 的 ART($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),联合组注入 0.1 mL 的 LU($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)及 0.1 mL 的 ART($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),其中 LU 及 ART 的药物浓度分别参考既往相关实验文献^[17]。

1.4 观察注药后玻璃体及眼底改变

注药后第 4 周,眼底照相、眼部 B 超检查观察 16 只术眼玻璃体及视网膜改变,并划分相对应的 PVR 等级,其中 PVR 等级按照 1983 年视网膜协会术语委员会划分的标准^[18]进行分级(表 1)。

表 1 视网膜脱离与 PVR 的分级

等级	程度	临床特征
A	轻度	玻璃体混浊、玻璃体内色素团块
B	中度	视网膜内面有皱褶和(或)视网膜裂孔有卷边,视网膜僵硬血管明显扭曲
C	显著	视网膜全层固定皱褶
C-1		固定皱褶占 1 个象限
C-2		固定皱褶占 2 个象限
C-3		固定皱褶占 3 个象限
D	广泛	全层视网膜固定皱褶累及 4 个象限
D-1		呈宽漏斗状
D-2		呈窄漏斗状
D-3		漏斗很窄或闭合,看不到视盘

1.5 Western blot 检测注药后实验眼玻璃体内 α -SMA 表达情况

注药后第 4 周,深度麻醉给予实验兔“安乐死”后,各组随机取 3 只实验眼眼球。PBS 清洗后,显微镜下分离玻璃体及视网膜至匀浆器,加入蛋白酶抑制剂数分钟后加入组织蛋白提取试剂,冰浴后, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 状态离心 5 min ,收集上清液测定蛋白浓度。配好胶后拔出梳子,等量蛋白质加入样孔中,电泳至溴酚蓝距胶底 3 mm 左右后,将其转移至 PVDF 膜;转膜后放入体积分数 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h ,后再将其转入一抗(α -SMA)中, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;后将膜置入 TBST 中清洗;转入二抗中,室温孵育 30 min ,将膜置入 TBST 中清洗;加 ECL 发光液并显影,Image pro plus 分析结果。实验步骤重复 3 次。

1.6 观察注药后视网膜改变

注药后第 4 周,深度麻醉给予实验兔“安乐死”,立即取实验眼眼球 1 只置入体积分数 10% 甲醇溶液固定 24 h ,按照脱水、透明、浸蜡、包埋、切片顺序处理。切片使用二甲苯脱蜡,高浓度到低浓度酒精水化,HE 染色,低浓度到高浓度去水化,中性树胶封片处理。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 27.0 软件进行统计学分析,使用 Graphpad prism 7.0 绘制柱状图。计量资料以均数 \pm 标准差表示。PVR 分级等级资料比较采用秩和检验。多组间比较采用单因素方差分析,组间差异比较使用 Bonferroni 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

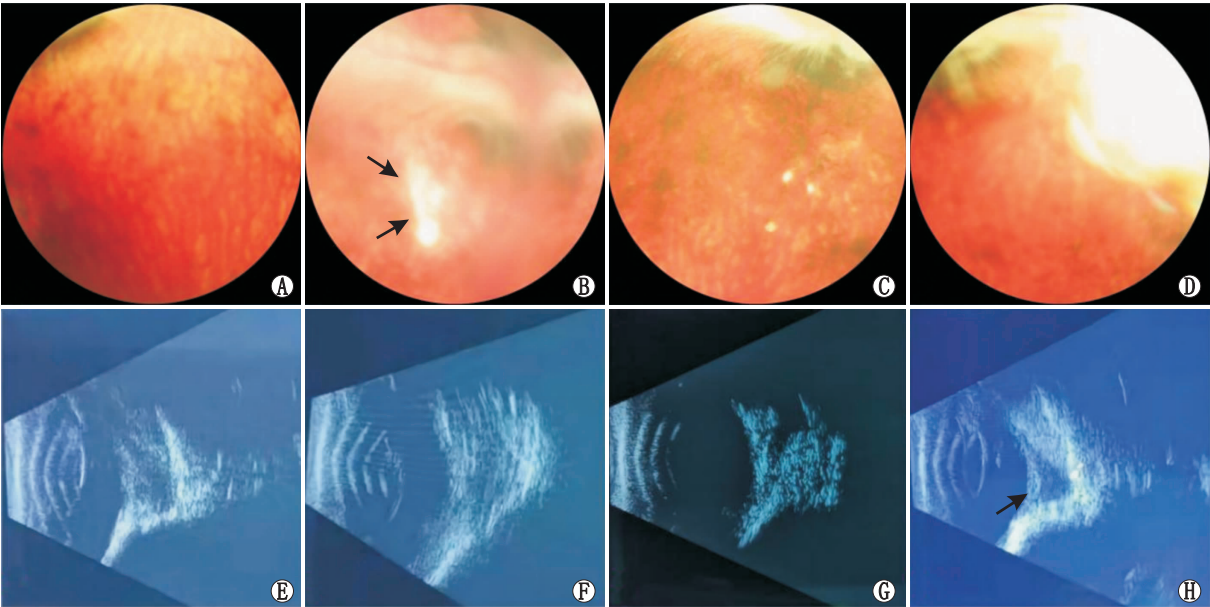
2.1 玻璃体及眼底改变

注药后第 4 周,眼部 B 超及眼底照相对各组术眼的观察结果提示,ART 组术眼玻璃体少量混浊,视网膜尚平伏;LU 组玻璃体混浊较重,视网膜面色素样改变,可见增殖膜及皱褶牵拉;联合组玻璃体清亮,视网膜平伏,表面见色素增殖性改变;对照组玻璃体混浊及视网膜脱离明显可见(图 1)。注药后第 4 周,将各组 PVR 分级进行比较:ART 组、LU 组、联合组与对照组比较,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$);ART 组、LU 组与联合组比较,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)(表 2)。

表 2 注药后第 4 周各组兔 TPVR 模型 PVR 分级

组别	A 级/眼	B 级/眼	C 级/眼	D 级/眼	平均等级
ART 组	1	3	0	0	1.75 ^{**}
LU 组	0	4	0	0	2.00 ^{**}
联合组	4	0	0	0	1.00 [*]
对照组	0	1	3	0	2.75 [#]
H	12.148				
P	0.007				

注:平均等级指注药后第 4 周计算各组 PVR 整体等级与各组数量的比值;与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与联合组比较,[#] $P<0.05$ 。



A:ART 组眼底照相示视网膜表面平坦,左下角可见分散的色素;B:LU 组眼底照相示玻璃体混浊,视网膜水肿,可见皱褶(黑色箭头处);C:联合组眼底照相示玻璃体清晰,可见色素增殖形式变化;D:对照组眼底照相示右上象限视网膜脱离突出;E:ART 组眼部 B 超示玻璃体混浊伴轻微后脱离改变;F:LU 组眼部 B 超示玻璃体混浊伴后脱离改变;G:联合组眼部 B 超示玻璃体透明;H:对照组眼部 B 超示玻璃体混浊,视网膜漏斗状脱离(黑色箭头处)。

图 1 注药后第 4 周各组兔 TPVR 模型眼底照相及眼部 B 超结果

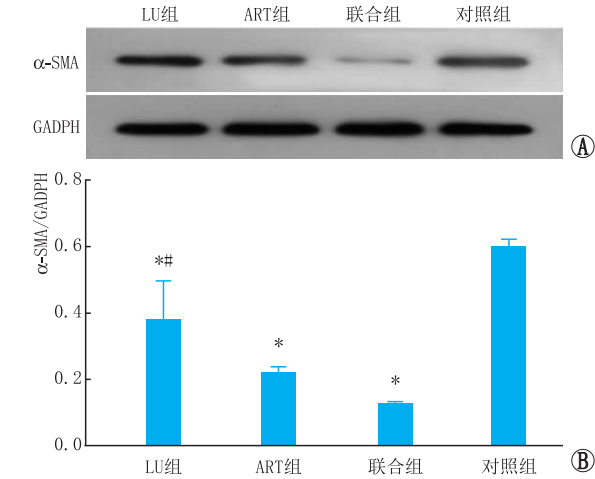
2.2 玻璃体内 α-SMA 表达情况

Western blot 检测结果显示,联合组玻璃体内 α-SMA 表达水平最低;联合组、ART 组、LU 组玻璃体内 α-SMA 表达水平均低于对照组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);其中,联合组与 LU 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),联合组与 ART 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 2)。

2.3 HE 染色结果

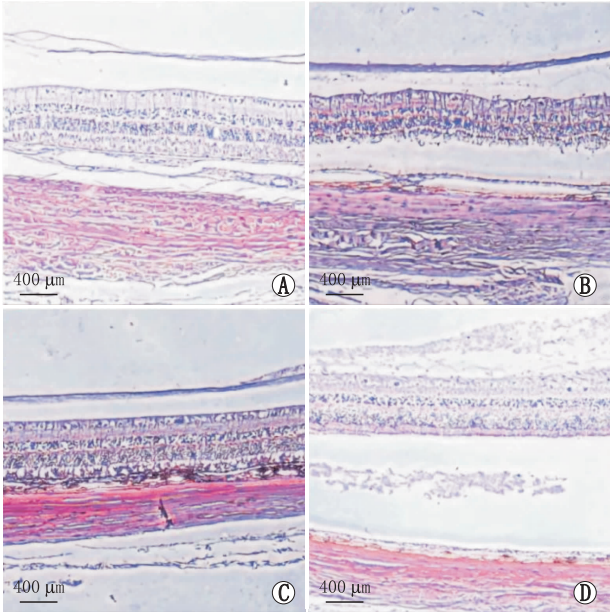
病理切片 HE 染色结果显示,对照组视网膜脱离,

且视网膜水肿明显;联合组视网膜浅脱离,结构大体平整,损伤程度最轻;ART 组视网膜脱离,但程度及结构紊乱程度不及对照组;LU 组视网膜浅脱离,水肿较明显(图 3)。



A:各组玻璃体内 α-SMA 表达情况;B:各组玻璃体内 α-SMA 表达水平比较柱状图。与对照组比较,* $P < 0.05$;与联合组比较,# $P < 0.05$ 。

图 2 注药后第 4 周各组兔 TPVR 模型玻璃体内 α-SMA 表达情况



A:ART 组视网膜表面脱离,视网膜外层与脉络膜之间的结构不清晰;B:LU 组视网膜脱离和视网膜外层结构紊乱;C:联合组视网膜为浅表脱离,结构相对完整;D:对照组视网膜脱离明显,水肿变化明显。

图 3 注药后第 4 周各组兔 TPVR 模型视网膜病理改变

3 讨论

眼外伤是造成目前全球单眼盲及低视力的主要原因之一,其发生原因以机械性创伤为主,发生人群以儿童和青中年人居多,致伤物常见于日常生活中的铁丝等金属异物,农业活动的板栗、竹子等农作物,玩具如子弹、鞭炮^[19],或是战争冲突导致。机械性开放性损伤中,TPVR是常见并发症,视网膜脱离范围大、广泛的激光光凝、视网膜裂孔未关闭^[20]、玻璃体积血及眼内炎症均增加其发病风险^[21],因其玻璃体内创伤的修复严重程度不对等,瘢痕性修复使得治疗难度较大,这也是区别于一般PVR的原因之一^[22-23]。TPVR特点包括血-视网膜屏障破坏,视网膜色素上皮(RPE)细胞、巨噬细胞^[24]、Müller细胞^[25]等的迁移,其肌纤维化样改变,进入玻璃体内,失去上皮形态^[26],多种因子促使上皮-间质转化(EMT)改变,细胞外基质累积及增殖膜生成,视网膜形态扭曲^[23]。

本研究中,LU组、ART组及联合组的眼部B超混浊程度、眼底视网膜病理化改变程度、TPVR分级程度及玻璃体内 α -SMA水平均低于对照组,提示3组药物对TPVR均有抑制作用。LU及ART对TPVR的治疗结果与吴灵丹等^[17]的研究结果相同。本研究中,联合组实验兔的眼部B超及眼底照相视网膜改变程度均优于单种药物组。联合组TPVR分级和 α -SMA表达水平与LU组相比,差异均有统计学意义,提示联合用药的抗TPVR效果优于LU,联合组眼部B超较ART组清亮,TPVR分级优于ART组,但其 α -SMA含量表达与ART组相比,差异未见统计学意义。究其原因,可能是ART较LU影响了更多有关于 α -SMA表达的相关通路^[17],导致联合应用时,LU的作用不明显,致使2组的 α -SMA水平差异无意义。

RPE细胞之间的连接破坏,在转化生长因子、血管内皮因子等细胞因子的促增殖侵袭的诱导下经历了EMT过程,被认为是TPVR发病机制的重要部分^[27],该过程涉及多种蛋白改变,如YES相关蛋白^[28]、细胞骨架蛋白、创伤愈合/细胞黏附蛋白、上皮膜蛋白及氧化应激相关蛋白^[29-30]。其中 α -SMA作为典型的间充质细胞标志物^[31],其增加提示EMT过程,其抑制提示间质上皮转化(MET)过程。此外,白藜芦醇可抑制转化生长因子诱导的EMT并通过去乙酰化果蝇母本抗生存因子蛋白Smad同源蛋白4信号通路诱导RPE细胞MET^[32]。肉瘤基因Sarcoma(Src)激酶抑制剂CGP77675可抑制转化生长因子- β 诱导的RPE细胞的EMT,也证实Src通路与EMT的相关性^[33]。ART已被证实可通过抑制转化生长因子- β /Smad及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(Akt)途径信号通路抑制EMT,降低 α -SMA的表达^[34-35],LU可调控核因子E2相关因子2(Nrf2)/血

红素氧化酶-1通路保护细胞免于氧化伤害,并通过Nrf2和Akt/糖原合成酶激酶3 β 途径缓解损伤后的EMT过程,降低 α -SMA的表达^[36]。本研究结果证明了LU和ART联合用药对TPVR疾病发展的抑制作用,且联合用药组的视网膜未见明显水肿、结构紊乱等改变,提示联合用药存在协同作用,有望成为防治TPVR的新疗法。

4 结论

LU与ART的联合用药能够有效抑制动物模型TPVR的发展程度,联合组实验兔的眼部B超及眼底照相显示视网膜改变程度均优于单种药物组。未来应进一步研究证实该联合用药的优越性,争取使其能够成为替代曲安奈德在眼部的治疗用药。目前,联合用药的具体协同机制尚不明确,后期可进一步研究其合用药理学、剂量、不良反应等方面,为治疗TPVR的研究打下基础。

参考文献

- [1] 张琼,陈松. 外伤性增生性玻璃体视网膜病变防治的研究进展[J]. 国际眼科纵览,2015,39(1):60-64.
ZHANG Q, CHEN S. Progress in prevention and treatment of traumatic proliferative vitreoretinopathy[J]. *Int Rev Ophthalmol*, 2015, 39(1):60-64.
- [2] ORBAN M, ISLAM Y F K, HADDOCK L J. Timing and outcomes of vitreoretinal surgery after traumatic retinal detachment[J]. *J Ophthalmol*, 2016, 2016:4978973.
- [3] 郭海霞,于金国,颜华. 曲安奈德在增生性玻璃体视网膜病变中应用的研究进展[J]. 眼科新进展,2021,41(10):992-995,1000.
GUO H X, YU J G, YAN H. Progress of triamcinolone acetonide in the treatment of proliferative vitreo-retinopathy[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2021, 41(10):992-995,1000.
- [4] HAMDY GHORABA H, LEILA M, ELGOUHARY S M, ELGE-MAI E E M, ABDEL FATTAH H M, GHORABA H H, et al. Safety of high-dose intravitreal triamcinolone acetonide as low-cost alternative to anti-vascular endothelial growth factor agents in lower-middle-income countries[J]. *Clin Ophthalmol*, 2018, 12:2383-2391.
- [5] HYTTI M, PIIPPO N, KORHONEN E, HONKAKOSKI P, KAAR-NIRANTA K, KAUPPINEN A. Fisetin and luteolin protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced cell death and regulate inflammation[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17645.
- [6] WANG X Q, LIU H L, WANG G B, WU P F, YAN T, XIE J, et al. Effect of artesunate on endotoxin-induced uveitis in rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(2):916.
- [7] CHENG R, LI C, LI C, WEI L, LI L, ZHANG Y, et al. The artemisinin derivative artesunate inhibits corneal neovascularization by inducing ROS-dependent apoptosis in vascular endothelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(5):3400.
- [8] DENSTEDT J, SCHULZ D C, DIACONITA V, SHELDON T G. Acupuncture resulting in eye penetration and proliferative vitreoretinopathy-Surgical and medical management with intraocular methotrexate[J]. *Am J Ophthalmol Case Rep*, 2020, 18:100605.
- [9] WIEDEMANN P, LEMMEN K, SCHMIEDL R, HEIMANN K. Intraocular daunorubicin for the treatment and prophylaxis of traumatic proliferative vitreoretinopathy[J]. *Am J Ophthalmol*, 1987, 104(1):10-14.
- [10] KHANUM B K, GUHA R, SUR V P, NANDI S, BASAK S K, KONAR A, et al. Pirfenidone inhibits post-traumatic proliferative vitreoretinopathy[J]. *Eye*, 2017, 31(9):1317-1328.
- [11] WANG H F, MA J X, SHANG Q L, AN J B, CHEN H T. Crocetin inhibits the proliferation, migration and TGF- β 2-induced

- epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815: 391-398.
- [12] 刘丽娅, 马景学, 安建斌, 刘丹岩, 高彦军, 周娜磊, 等. 姜黄素、丹参单体和苦参碱抑制 IL-1 β 诱导下兔 RPE 细胞增殖的体外实验研究[J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(8): 699-704.
LIU L Y, MA J X, AN J B, LIU D Y, GAO Y J, ZHOU N L, et al. Inhibitory effect of curcumin, salvia miltiorrhiza and matrine on IL-1 β -induced proliferation of rabbit RPE cells in vitro[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(8): 699-704.
 - [13] ER H, TURKOZ Y, MIZRAK B, PARLAKPINAR H. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy with protein kinase C inhibitor (chelerythrine chloride) and melatonin[J]. *Ophthalmologica*, 2005, 220(1): 17-22.
 - [14] CARDILLO J A, FARAH M E, MITRE J, MORALES P H, COSTA R A, MELO L A S, et al. An intravitreal biodegradable sustained release naproxen and 5-fluorouracil system for the treatment of experimental post-traumatic proliferative vitreoretinopathy[J]. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88(9): 1201-1205.
 - [15] SALAH-ELDIN M, PEYMAN G A, EL-ASWAD M, BANDOK B, BAHGAT M M, NIESMAN M R. Evaluation of toxicity and efficacy of a combination of antineoplastic agents in the prevention of PVR[J]. *Int Ophthalmol*, 1994, 18(2): 53-60.
 - [16] 陈洁, 吴灵丹, 王资懿, 徐荣华. 三种方法建立外伤性增生性玻璃体视网膜病变的兔模型研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(5): 954-960.
CHEN J, WU L D, WANG Z Y, XU Q H. Establishment of a rabbit model of traumatic proliferative vitreoretinopathy using three methods[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2022, 38(5): 954-960.
 - [17] 吴灵丹, 陈洁, 王资懿, 徐荣华. 三种药物在兔外伤性增生性玻璃体视网膜病变中的作用[J]. *国际眼科杂志*, 2022, 22(6): 920-925.
WU L D, CHEN J, WANG Z Y, XU Q H. Role of three drugs in traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbits[J]. *Int Eye Sci*, 2022, 22(6): 920-925.
 - [18] HILTON G, MACHEMER R, MICHELS R, OKUN E, SCHEPENS C, SCHWARTZ A. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy[J]. *Ophthalmology*, 1983, 90(2): 121-125.
 - [19] 林树燕, 吴志群, 吴庆伟, 蔡隆生, 曾炎. 195 例眼外伤住院患者的受伤原因和临床分析[J]. *伤害医学(电子版)*, 2021, 10(3): 11-14.
LIN S Y, WU Z Q, WU Q W, CAI L S, ZENG Y. Causes of injury and clinical analysis of 195 patients with ocular trauma[J]. *Inj Med(Electron Edit)*, 2021, 10(3): 11-14.
 - [20] 路永珩, 郑轶. 增生性玻璃体视网膜病变发病机制与治疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(13): 2548-2552, 2558.
LU Y H, ZHENG Y. Research progress of pathogenesis and treatment of proliferative vitreoretinopathy[J]. *Med Recap*, 2018, 24(13): 2548-2552, 2558.
 - [21] CARDILLO J A, STOUT J T, LABREE L, AZEN S P, OMPHROY L, CUI J Z, et al. Post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. The epidemiologic profile, onset, risk factors, and visual outcome[J]. *Ophthalmology*, 1997, 104(7): 1166-1173.
 - [22] WELLER M, WIEDEMANN P, HEIMANN K. Proliferative vitreoretinopathy--is it anything more than wound healing at the wrong place? [J]. *Int Ophthalmol*, 1990, 14(2): 105-117.
 - [23] SHU D Y, LOVICU F J. Myofibroblast transdifferentiation; the dark force in ocular wound healing and fibrosis[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017, 60: 44-65.
 - [24] WELLER M, HEIMANN K, WIEDEMANN P. Immunohistochemical studies of epiretinal membranes using APAAP complexes; evidence for macrophage involvement in traumatic proliferative vitreoretinopathy[J]. *Int Ophthalmol*, 1988, 11(3): 181-186.
 - [25] 张悦, 刘含若. Müller 细胞在视网膜疾病发病机制中的作用[J]. *国际眼科纵览*, 2022, 46(2): 179-184.
ZHANG Y, LIU H R. Role of Müller cells in pathogenesis of retinal diseases[J]. *Int Rev Ophthalmol*, 2022, 46(2): 179-184.
 - [26] CHIBA C. The retinal pigment epithelium; an important player of retinal disorders and regeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123: 107-114.
 - [27] 胡可可, 杜红俊, 惠延年. 血管内皮生长因子及上皮-间充质转化在增生性玻璃体视网膜病变发病中的作用[J]. *国际眼科杂志*, 2022, 22(6): 969-972.
 - [28] HU K K, DU H J, HUI Y N. Role of vascular endothelial growth factor and epithelial-mesenchymal transition in the vitreoretinopathy[J]. *Int Eye Sci*, 2022, 22(6): 969-972.
 - [29] ZHANG W, LI J. Yes-associated protein is essential for proliferative vitreoretinopathy development via the epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial fibrosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(21): 10213-10223.
 - [30] ZHOU Q, XU G, ZHANG X, CAO C, ZHOU Z. Proteomics of post-traumatic proliferative vitreoretinopathy in rabbit retina reveals alterations to a variety of functional proteins[J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(4): 318-326.
 - [31] TELANDER D G, YU A K, FORWARD K I, MORALES S A, MORSE L S, PARK S S, et al. Epithelial membrane protein-2 in human proliferative vitreoretinopathy and epiretinal membranes[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7): 3112-3117.
 - [32] 余进海, 刘琪, 廖洪斐, 徐荣华. 增生性玻璃体视网膜病变中调控上皮间质转化的研究进展[J]. *眼科新进展*, 2019, 39(10): 992-995.
YU J H, LIU Q, LIAO H F, XU Q H. Advances in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in Proliferative vitreoretinopathy[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2019, 39(10): 992-995.
 - [33] ISHIKAWA K, HE S, TERASAKI H, NAZARI H, ZHANG H, SPEE C, et al. Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelium and development of proliferative vitreoretinopathy[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16386.
 - [34] 何建锋, 吕立夏, 罗俊杰, 李宗义, 沈俊慧, 徐国彤, 等. Src 激酶抑制剂 CGP77675 对 TGF- β 1 诱导的视网膜色素上皮细胞上皮-间质转化的抑制作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(1): 5-11.
HE J F, LYU L X, LUO J J, LI Z Y, SHEN J H, XU G T, et al. Inhibiting effects of Src kinase inhibitor on TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition of human RPE cells[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(1): 5-11.
 - [35] WANG Z Y, ZHANG Y, CHEN J, WU L D, CHEN M L, CHEN C M, et al. Artesunate inhibits the development of PVR by suppressing the TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 213: 108859.
 - [36] WANG Z Y, WU L D, CHEN J, CHEN M L, CHEN C M, XU Q H, et al. Artesunate inhibits proliferation and migration of RPE cells and TGF- β 2 mediated epithelial mesenchymal transition by suppressing PI3K/AKT pathway[J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(2): 197-204.
 - [37] CHEN L, ZHU Y, ZHOU J, WU R, YANG N, BAO Q, et al. Luteolin alleviates epithelial-mesenchymal transformation induced by oxidative injury in ARPE-19 cell via Nrf2 and AKT/GSK-3 β pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2265725.

Prevention and treatment of experimental traumatic proliferative vitreoretinopathy with luteolin and artesunate

CHEN Cimin, ZHANG Yu, CHEN Meiling, XU Qihua

Ophthalmology Hospital Affiliated Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Corresponding author: XU Qihua, E-mail: xu7ganggang@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of luteolin (LU) and artesunate (ART) in the treatment of traumatic proliferative vitreoretinopathy (TPVR). **Methods** TPVR models were established by injecting 0.3 mL of platelet-rich plasma into the vitreous cavity of the experimental eyes (right eyes) of 16 healthy adult blue rabbits of a similar weight and age. The experimental rabbits were randomly divided into 4 groups, with 4 rabbits in each group. Those in the control group were intravitreally injected with 0.2 mL of normal saline; those in the LU group were intravitreally injected with 0.2 mL of LU; those in the ART group were intravitreally injected with 0.2 mL of ART; and those in the combination group were intravitreally injected with 0.1 mL of LU and ART, respectively. At the 4th week after injection, the vitreous opacity and retinal changes were recorded with the aid of an ophthalmic B-scan ultrasound device and a fundus camera, and proliferative vitreoretinopathy (PVR) grades were determined. Eyeball tissues were removed for Western blotting to measure the expression level of α smooth muscle actin (α -SMA). Eyeball slices were stained with hematoxylin & eosin (HE) to survey structural changes. PVR grading data were compared using the rank sum test. Multi-group comparisons were conducted using the one-way analysis of variance. Differences among groups were analyzed using the Bonferroni test. **Results** The observations under the ophthalmic B-scan ultrasound device and fundus camera showed that changes in the vitreous cavity in the ART, LU, and combination groups were better than those in the control group. The PVR grading in the ART, LU, and combination groups was superior to that in the control group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Western blot results showed that the α -SMA level in the ART, LU, and combination groups was lower than that in the control group (all $P < 0.05$) and the lowest in the combination group, and the difference between the combination group and the LU group was statistically significant ($P < 0.05$) but not significant between the combination group and the ART group ($P > 0.05$). The HE staining results showed that the retinal detachment and edema in the control group were the most serious, while the retinal detachment in the combination group was shallow, the structure was generally flat, and the damage was milder than that in the ART and LU groups. **Conclusion** Intravitreal injection of both LU and ART can effectively inhibit the development of TPVR in experimental animal models, which is superior to the efficacy of LU and ART alone. Further research needs to be conducted on the synergistic mechanisms of the drug combination to lay the foundation for the treatment of TPVR.

[Key words] luteolin; artesunate; drug combination; epithelial-mesenchymal transition; traumatic proliferative vitreoretinopathy