

【实验研究】

王方 万咪咪 乐艳芝 王翰墨 杜莎莎 张兴菊

kg 的雌性新西兰大白兔 80 只 (SPF 级, 远交系)。

1.1.2 实验仪器与试剂 SDS-PAGE 电泳仪和湿法转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)、脱色摇床 (TY-80R, 金坛市医疗仪器厂)、Tanon5200 化学发光检测系统 (海天能科技有限公司)。丙烯酰胺、亚甲丙烯酰胺、Tris-base、过硫酸铵、TEMED、甘氨酸、SDS (上海阿拉丁生化; PVDF 膜 (Millipore)、ECL 发光液 (Thermo)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (碧云天)、甲醇 (分析纯, 南京化学试剂厂)、HCl (分析纯, 南京化学试剂厂)、淫羊藿总黄酮提取物 (98.13% 朝藿定 A、99.94% 淫羊藿苷, 成都曼思特生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药方式 随机将大白兔分为 A 组 (空白组)、B 组 (手术组)、C 组 (淫羊藿总黄酮组)、D 组 (雄激素组), 每组 20 只。A 组以生理盐水灌胃进行干预, 每天一次, 每次 2 mL; B、C、D 三组通过去除雄兔双侧睾丸与附睾建立干眼症模型后分别以生理盐水灌胃 (每天一次, 剂量为 2 mL)、淫羊藿总黄酮灌胃 (每天一次, 剂量为 $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、丙酸睾酮肌肉注射 (每天一次, 剂量为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行干预。每组根据喂养时间不同又分为 A1 ~ D1 组 (喂养 1 个月) 和 A2 ~ D2 组 (喂养 2 个月), 每组 10 只。

1.2.2 干眼症雄兔动物模型建立方法 B、C、D 三组新西兰大耳雄兔摘除双侧睪丸及附睪:术前禁食水,30 g · L⁻¹戊巴比妥钠以 50 mg · kg⁻¹的剂量腹腔注射,待雄兔麻醉后仰卧并固定,碘伏消毒手术区域,铺单,在阴囊中部做一 2 cm 的竖行切口,分离双侧睪丸包膜,将睪丸挤出后结扎睪丸动脉及输精管,切除睪丸,缝合皮肤。术后 3 d 肌肉注射青霉素 (200 × 10³ U · kg⁻¹) 预防术后感染。

1.2.3 眼表检查及诊断 A1 ~ D1 组雄兔于造模前及造模后 2 周、4 周时,A2 ~ D2 组雄兔于造模后 6 周及最后一次给药后分别进行泪液分泌实验 (Schirmer I test,SIT) 和 BUT 检查,检查标准参照文献 [7] 的标准。所有操作均由同一人进行,要求所有兔被检查的时刻、位置、光线、湿度及温度均一致。

1.2.4 Western blot 检测各组凋亡相关因子 Bax、Bcl-2 蛋白的表达 A1 ~ D1 组及 A2 ~ D2 组分别在干预 1 个月、2 个月后,于最后一次给药结束后 2 h,应用 30 g · L⁻¹戊巴比妥钠 (50 mg · kg⁻¹) 腹腔内注射麻醉,使用空气栓塞法处死兔,即刻摘取泪腺,提取其上皮细胞 RNA,使用 Western blot 法检测。Western blot 法的具体操作如下:称取 30 mg 组织,混入 500 μL RIPA 裂解液,冰块上研磨至无明显沉淀后裂解 30 min。完成后,转移至预先冷却的 1.5 mL 离心管 (冰上操作)。4 ℃ 下 12 × 10⁶ r · min⁻¹ 离心 5 min。吸取上清,即样品总蛋白,放于 -20 ℃ 保存。根据碧云天 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据需要

分离蛋白的相对分子质量调配相应的分离、浓缩胶,4 ℃ 保存。将样品总蛋白与 5 × SDS 上样缓冲液混合至 1 × 的浓度,于沸水中煮 5 min 使蛋白变性后上样电泳。浓缩胶电压 60 V 下 30 min,进入分离胶后电压 80 V 下电泳 90 min。电泳后转至 PVDF 膜,常温转移到封闭液后在脱色摇床干预 1 h。一抗孵育参照说明书按 1 : 1000 调配后于 4 ℃ 孵育后用 TBST 液漂 3 遍,每次 10 min。再将二抗用 TBST 按 1 : 5000 稀释,常温孵育 2 h 后 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。用 Thermo ECL 进行化学发光按电化学发光,于 Tanon 凝胶成像仪下拍照,获取图片。得出目标条带 Bax、Bcl-2 光密度值与内参 GAPDH 光密度值的比值。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计处理。实验检测指标的计量资料表示为均数 ± 标准差,组间比较采用方差分析。检验水准:α = 0.05。

2 结果

2.1 各组基础泪液分泌量比较 造模前各组雄兔 SIT 值相比差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。造模后 2 周,B、C、D 组 SIT 值开始减小,与 A 组相比差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$),且 B 组与 C、D 组两两相比差异均有显著统计学意义 (均为 $P < 0.01$),随着实验进程,B、C 组 SIT 值进一步减小,且 B 组 SIT 值小于 C 组,差异仍有显著统计学意义 ($P < 0.01$),D 组 SIT 值变化不大,C、D 组 SIT 值相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 各组基础泪液分泌量比较

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	造模前 SIT 值/mm	造模后 2 周 SIT 值/mm	造模后 4 周 SIT 值/mm	造模后 6 周 SIT 值/mm	末次给药后 SIT 值/mm
A 组	14.26 ± 3.23	14.07 ± 3.01	15.33 ± 4.41	14.27 ± 3.25	13.65 ± 1.77
B 组	15.31 ± 0.33	7.44 ± 1.13 ^{△□}	6.63 ± 2.31 [△]	4.66 ± 2.10 [△]	3.81 ± 1.87 [△]
C 组	14.83 ± 5.71	13.73 ± 5.61 ^{*□}	12.81 ± 2.67 [*]	11.75 ± 4.41 [*]	11.02 ± 1.69 [*]
D 组	14.51 ± 2.61	12.23 ± 2.07 ^{△*□}	13.75 ± 2.77 [*]	13.67 ± 2.38 [*]	14.91 ± 4.21 [*]

注:与本组造模前相比,△ $P < 0.01$;与 B 组相比,* $P < 0.01$;与 A 组相比,□ $P < 0.05$

2.2 各组泪膜稳定性比较 造模前各组 BUT 值相比差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$)。造模后 2 周,B、C、D 组 BUT 值开始减小,与 A 组相比差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$),且 B 组与 C、D 组相比差异均有显著统计学意义 (均为 $P < 0.01$),随着

实验进程,B、C、D 组 BUT 值进一步减小,且 B 组 BUT 值小于 C 组,差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$),C 组与 D 组 BUT 值相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 各组泪膜稳定性比较

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	造模前 BUT 值/s	造模后 2 周 BUT 值/s	造模后 4 周 BUT 值/s	造模后 6 周 BUT 值/s	造模后 8 周 BUT 值/s
A 组	9.44 ± 1.01	9.11 ± 1.26	10.21 ± 1.30	9.52 ± 1.06	9.10 ± 1.12
B 组	9.20 ± 0.78	6.80 ± 1.03 ^{△□}	5.20 ± 0.63 [△]	4.90 ± 0.94 [△]	2.40 ± 0.51 [△]
C 组	9.11 ± 1.17	7.90 ± 2.21 ^{*□}	7.20 ± 0.78 [*]	6.80 ± 1.07 [*]	6.70 ± 0.67 [*]
D 组	9.40 ± 0.96	8.60 ± 2.21 ^{*□}	8.10 ± 0.82 [*]	7.50 ± 1.03 [*]	7.80 ± 0.82 [*]

注:与本组造模前相比,△ $P < 0.01$;与 B 组同期相比,* $P < 0.01$;与 A 组同期相比,□ $P < 0.05$

2.3 各组 Bax 蛋白相对表达量结果 各组 Bax 蛋白表达量见图 1。Western blot 检测结果显示,B 组 Bax 蛋白表达高于 C 组、D 组,差异均有显著统计学意义 (均为 $P < 0.01$);C 组 Bax 表达均高于 D 组,但差异均无统计学意义 (均为 $P > 0.05$) (见表 3)。B2

组、C2 组、D2 组 Bax/GAPDH 值均分别小于 B1 组、C1 组、D1 组,差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$) (见表 4)。以上结果说明,淫羊藿总黄酮可减少 Bax 在泪腺中的含量,其与雄激素的作用无明显区别,且随时间增加效果逐渐增强。

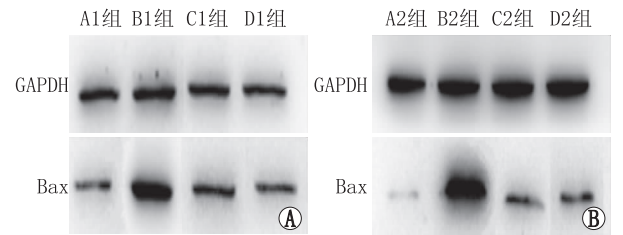


图1 各组泪腺中 Bax 蛋白表达结果 A: A1 ~ D1 组泪腺中 Bax 蛋白表达结果; B: A2 ~ D2 组泪腺中 Bax 蛋白表达结果

表3 各组 Bax 蛋白表达量

组别	Bax 蛋白表达	GAPDH
A1 组	0.35 ± 0.14	1.76 ± 0.24
A2 组	0.47 ± 0.04	1.85 ± 0.08
B1 组	2.38 ± 0.17	1.78 ± 0.26
B2 组	2.07 ± 0.06	1.91 ± 0.06
C1 组	1.15 ± 0.50 [△]	1.75 ± 0.26
C2 组	1.01 ± 0.04 [*]	1.94 ± 0.10
D1 组	1.03 ± 0.44 [△]	1.78 ± 0.28
D2 组	0.93 ± 0.02 [*]	1.84 ± 0.04

注:与 B1 组相比, [△]*P* < 0.01; 与 B2 组相比, ^{*}*P* < 0.01

表4 各组 Bax/GAPDH 值

组别	Bax/GAPDH	组别	Bax/GAPDH
A1 组	0.20 ± 0.05	A2 组	0.25 ± 0.02
B1 组	1.35 ± 0.08	B2 组	1.09 ± 0.04
C1 组	0.68 ± 0.31	C2 组	0.51 ± 0.01
D1 组	0.62 ± 0.30	D2 组	0.53 ± 0.04

2.4 Bcl-2 蛋白相对表达量结果 各组 Bcl-2 蛋白表达量见图 2。Western blot 检测结果显示, B 组 Bcl-2 蛋白表达低于 C 组、D 组, 差异均有显著统计学意义(均为 *P* < 0.01); C1 组 Bcl-2 表达低于 D1 组, 差异有显著统计学意义(*P* < 0.01); C2 组 Bcl-2 表达仍低于 D2 组, 但差异无统计学意义(*P* > 0.05) (见表 5)。C2 组较 C1 组 Bcl-2/GAPDH 值增加, 差异有显著统计学意义(*P* < 0.01); D2 组较 D1 组 Bcl-2/GAPDH 值增加, 差异有统计学意义(*P* < 0.05) (见表 6)。以上结果提示, 淫羊藿总黄酮可提高泪腺中 Bcl-2 的蛋白含量, 随时间增加与雄激素效果的差别逐步减小, 且效果逐渐增强。

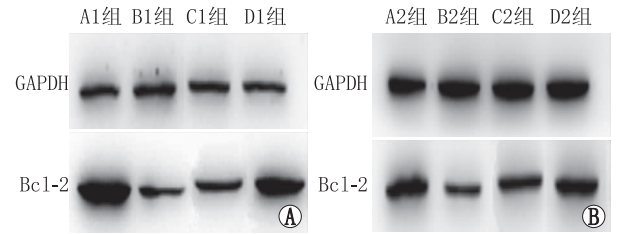


图2 各组泪腺中 Bcl-2 蛋白表达结果 A: A1 ~ D1 组泪腺中 Bcl-2 蛋白表达结果; B: A2 ~ D2 组泪腺中 Bcl-2 蛋白表达结果

表5 各组 Bcl-2 蛋白表达量

组别	Bcl-2 蛋白	GAPDH
A1 组	2.49 ± 0.33	1.76 ± 0.24
A2 组	2.06 ± 0.04	1.85 ± 0.08
B1 组	0.42 ± 0.03	1.78 ± 0.26
B2 组	0.95 ± 0.08	1.91 ± 0.06
C1 组	1.07 ± 0.11 ^{△*}	1.75 ± 0.26
C2 组	1.64 ± 0.19 [□]	1.94 ± 0.10
D1 组	1.42 ± 0.28 [△]	1.78 ± 0.28
D2 组	1.76 ± 0.17 [□]	1.84 ± 0.04

注:与 B1 组相比, [△]*P* < 0.01; 与 D1 组相比, ^{*}*P* < 0.01; 与 B2 组相比, [□]*P* < 0.01

表6 各组 Bcl-2/GAPDH 值

组别	Bcl-2/GAPDH 值	组别	Bcl-2/GAPDH 值
A1 组	1.43 ± 0.20	A2 组	1.12 ± 0.04
B1 组	0.24 ± 0.05	B2 组	0.50 ± 0.03
C1 组	0.63 ± 0.14	C2 组	0.90 ± 0.08
D1 组	0.84 ± 0.27	D2 组	0.91 ± 0.04

3 讨论

眼部属于性激素作用的部位, 泪腺、睑板腺及角膜等眼表组织均可见雄激素受体^[8]。目前干眼的理论大多基于泪腺组织单位, 其病变可见于细胞凋亡、组织破坏、炎症浸润, 致使腺体分泌功能下降甚至丧失^[9]。因此, 有学者认为干眼症的起始因素之一很可能是雄激素的下降^[10]。有研究显示, 泪液分泌量与人体睾酮分泌水平呈正比, 睾酮可抑制泪腺细胞的凋亡、坏死^[11]。此外, 低雄激素水平可加速 Sjögren 综合征的发展, 并证实与泪腺炎症、重症干眼有关^[12]。本实验结果显示, B 组雄兔泪液分泌量减少, 泪膜稳定性减低, 由此可见, 雄兔泪腺细胞的炎症、凋亡与去势导致的雄激素水平降低有直接关系, 最终导致了干眼的形成。至少 10 个以上的基因构成了 Bcl-2 家族, 它们对凋亡的调控是经构成同二聚体、异二聚体来实现的, Bcl-2 和 Bax 是相对的一组控制凋亡的重要基因^[13]。Bcl-2 可提高细胞生存率, 减少因各种原因诱导的细胞凋亡, Bax 与 Bcl-2 功能相反, 能够诱导细胞凋亡。Bcl-2 与 Bax 的比值及 Bcl-2 与 Bax 蛋白量的变化在细胞的生长与凋亡过程中起重要作用^[14]。研究发现, 使用雄激素后, 在缓解泪腺炎症浸润的同时, Bax 表达也同时降低, 而 Bcl-2、c-myc 蛋白及雄激素受体 mRNA 都明显增加^[15]。本实验结果也证实, B 组雄兔的 Bcl-2 表达显著减少, Bax 的表达显著升高, 而 C 组与 D 组的 Bcl-2 的表达显著升高, Bax 的表达显著减少。综上所述, 干眼的形成脱离不了雄激素降低的因素, 而因雄激素降低导致的泪腺细胞凋亡、坏死又与 Bcl-2 和 Bax 有着密不可分的关系。

迄今为止, 雄激素替代是雄激素缺乏型干眼仅有的病因疗法, 但长期使用雄激素会导致前列腺肥大、前列腺癌、女性男性化等副作用, 给患者带来了

长期的苦恼。因此,作为一个中医人,亟需从中药中找到可以替代雄激素的有效疗法。淫羊藿的根、叶、花和种子等部位含有与雄激素化学结构类似的杂环多酚类的黄酮类化合物,可起到模拟雄激素的效果。淫羊藿总黄酮是一种天然药物,资源丰富,分离提纯工艺成熟,且其疗效肯定^[16]。过去,黄酮类化合物被明确证实有抗炎、抗氧化等效果,现代医学发现其可以刺激雄激素受体^[17],可激活雄激素受体 α 与 β 的转录活性,表现出植物雄激素样作用,产生生物学效应^[18],发挥拟雄激素效果^[19],从而可以治疗某些与雄激素水平低下相关的疾病,如干眼症等。本实验结果显示,C1组和C2组均减缓了因雄激素水平降低导致的干眼的发展,使雄兔泪液分泌量增加,泪膜稳定,且C2组与D2组的疗效对比差异无统计学意义。可见,淫羊藿总黄酮疗效与雄激素相当,能够有效代替雄激素进行干眼症的治疗。

综上所述,淫羊藿总黄酮可通过抑制泪腺细胞凋亡而治疗因雄激素水平降低导致的干眼症,泪腺中Bcl-2表达上升、Bax表达下降可能是其发挥治疗作用的机制之一。淫羊藿总黄酮可以开发为新的雄激素替代的中药,以避免使用西药进行干眼症治疗所带来的不良反应。以后可以进一步对淫羊藿总黄酮替代治疗的用量、剂型及疗程进行临床研究。同时干眼症的发病机制复杂,期待从干眼症发生的其他机制来研究淫羊藿总黄酮的治疗作用。

参考文献

- [1] 梁庆丰. 干眼患者诊治的精细化管理[J]. 眼科, 2016, 25(3): 145-147.
LIANG Q F. Fine management of diagnosis and treatment of dry eye[J]. *Ophthalmol CHN*, 2016, 25(3): 145-147.
- [2] 袁媛. 干眼危险因素的研究[J]. 眼科新进展, 2017, 37(12): 1173-1177.
YUAN Y. Risk factors for dry eye[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(12): 1173-1177.
- [3] AZCARATE P M, VENINCASA V D, FEUER W, STANCZYK F, SCHALLY A V, GALOR A. Androgen deficiency and dry eye syndrome in the aging male[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(8): 5046-5053.
- [4] 邵毅. 国际干眼新共识(TFOS DEWS II)解读[J]. 眼科新进展, 2018, 38(1): 1-12.
SHAO Y. Interpretation of TFOS DEWS II[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(1): 1-12.
- [5] 高阳, 周瑾, 孙晓芳. 雄激素疗法对去势雌性大鼠泪膜稳定性的改善作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(7): 595-599.
GAO Y, ZHOU J, SUN X F. Ameliorative effect of androgen therapy tear on film stability in castrate female rats[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(7): 595-599.
- [6] 欧阳云, 彭俊, 彭清华, 谭涵宇, 李文娟, 吴权龙. 密蒙花颗粒剂对去势雄兔泪腺细胞凋亡因子Bax, Bcl-2, Fas和FasL的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(7): 858-862.
OU-YANG Y, PENG J, PENG Q H, TAN H Y, LI W J, WU Q L. Effect of buddleia granule on Bax, Bcl-2, Fas, and FasL of lacrimal gland cells of castrated male rabbits[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2017, 37(7): 858-862.
- [7] 张梅, 陈家祺, 刘祖国. 干眼症检查的进展[J]. 眼科研究, 2001, 19(2): 184-187.
ZHANG M, CHEN J Q, LIU Z G. Recent development on diagnostic tests of dry eye[J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2001, 19(2): 184-187.
- [8] WICKHAM L A, GAO J, TODA I, ROCHA E M, ONO M, SULLIVAN D A. Identification of androgen, estrogen and progesterone receptor mRNAs in the eye[J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2000, 78(2): 146-153.
- [9] 杨继红, 李凯, 王育良, 黄爱灵, 钱婷. 鬼针草水提物对雄激素缺乏性干眼大鼠泪液分泌和泪腺炎症的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2017, 27(4): 211-217.
YANG J H, LI K, WANG Y L, HUANG A L, QIAN T. Effects of aqueous extract of *Bidens pilosa* L. on tear secretion and lacrimal gland inflammation of dry eye due to androgen deficiency in rats[J]. *China J Chin Ophthalmol*, 2017, 27(4): 211-217.
- [10] 马佰凯, 刘容均, 齐虹. 基于国际干眼新共识的干眼研究进展[J]. 中华眼科医学杂志(电子版), 2018, 8(1): 36-43.
MA B K, LIU R J, QI H. Development of dry eye research based on international dry eye new consensus[J]. *Chin J Ophthalmol Med (Electron Edit)*, 2018, 8(1): 36-43.
- [11] 陈佳文, 彭清华, 姚小磊, 王方, 李怀凤, 吴权龙. 密蒙花总黄酮对去势雄兔干眼症泪腺TGF- β 1及其基因表达的影响[J]. 眼科研究, 2010, 28(4): 311-314.
CHEN J W, PENG Q H, YAO X L, WANG F, LI H F, WU Q L. Effect of buddleja officinalis flavones on TGF- β 1 expression in lacrimal gland of castrated rats[J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2010, 28(4): 311-314.
- [12] 邵毅, 余瑶, 王乐, 裴重刚, 高桂平, 涂萍. 鬼针草滴眼液治疗去势雄兔干眼症的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(21): 21-25.
SHAO Y, YU Y, WANG L, PEI C G, GAO G P, TU P. Therapeutic efficiency of spanishneedles herb eye drops for castrated dry eye rabbit model[J]. *China J Mod Med*, 2015, 25(21): 21-25.
- [13] 董雅洁, 高维娟. bcl-2, bax, caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(21): 4828-4830.
DONG Y J, GAO W J. The role and relationship of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in apoptosis[J]. *Chin J Gerontol*, 2012, 32(21): 4828-4830.
- [14] 王玉, 何昱, 杨洁红, 万海同. 养阴通脑颗粒对大鼠脑缺血/再灌注损伤后Caspase-3, Bcl-2, Bax mRNA表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 3875-3878.
WANG Y, HE Y, YANG J H, WAN H T. Effects of Yangyin Tongnao Granules on the expression of Caspase-3, Bax, Bcl-2 mRNA in rats after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(9): 3875-3878.
- [15] 姚小磊, 彭清华, 陈启雷, 唐勇华, 钟茜. 菊花总黄酮对去势导致雄兔干眼症泪腺细胞Bax, Bcl-2表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2014, 34(7): 12-17.
YAO X L, PENG Q H, CHEN Q L, TANG Y H, ZHONG Q. Effects of total flavonoids of chrysanthemum on Bax and Bcl-2 expressions of lacrimal gland cells apoptosis of castrated rabbits with dry eye[J]. *J Human Univ Chin Med*, 2014, 34(7): 12-17.
- [16] 于春红, 王云松. 睑板腺功能障碍的治疗及研究进展[J]. 海南医学, 2018, 29(4): 93-96.
YU C H, WANG Y S. Progress in the treatment and research of meibomian gland dysfunction[J]. *Hainan Med J*, 2018, 29(4): 93-96.
- [17] NIFLI A P, BOSSON-KOUAME A, PAPADOPOULOU N, KOGIA C, KAMPA M, CASTAGNINO C, et al. Monomeric and Oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 309(2): 329-339.
- [18] YAO X L, PENG Q H, PENG J, TAN H Y, WU Q L, WU D L, et al. Effects of extract of buddleja officinalis on partial inflammation of lacrimal gland in castrated rabbits with dry eye[J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 3(2): 114-119.
- [19] 黄秀兰, 周亚伟, 王伟. 淫羊藿黄酮类化合物药理研究进展[J]. 中成药, 2005, 27(6): 719-721.
HUANG X L, ZHOU Y W, WANG W. Research progress in the pharmacology of epimedium flavonoids[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2005, 27(6): 719-721.

Effect of epimedium total flavonoids on Bax and Bcl-2 expression based on male rabbit of dry eye syndrome

WANG Fang¹, WAN Mimi², LE Yanzhi¹, WANG Hanmo¹, DU Shasha¹, ZHANG Xingju¹

1. Department of Ophthalmology, the Second Hospital Affiliated to Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou Province, China
2. Department of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, Xishan Traditional Chinese Medicine Hospital of Wuxi, Wuxi 214194, Jiangsu Province, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of epimedium total flavonoids on Bax and Bcl-2 expression based on male rabbit of dry eye syndrome. **Methods** Eighty male healthy rabbits (2.0–2.5 kg for each rabbit) were divided into blank group (group A), operation group (group B), epimedium total flavonoids group (group C), and androgen group (group D), 20 rabbits in each group. Rabbits in the group A were treated with normal saline. After the dry eye models were established in group B, C, and D, group B was treated with normal saline, group C was treated with epimedium total flavonoids, group D was treated with androgen intramuscular injection. Each group was subgrouped into groups A1 to D1 (feeding for 1 month) and A2 to D2 group (feeding for 2 months) according to the feeding time, 10 animals in each group. In groups A1-D1, the male rabbits were subjected to tear secretion test (Schirmer I test, SIT) and tear film break-up time (BUT) inspections before and at 2 and 4 weeks after the model was created, and in the A2-D2 groups, they were performed at 6 weeks after the model building and after the last medication. Each group of rabbits at the time of the first and second month were sacrificed, with the lacrimal glands taken immediately for extracting the lacrimal gland epithelial cells, and Bax and Bcl-2 protein expression were checked on Western blot. **Results** SIT and BUT tests showed that dry eye models were established in males of B, C, and D groups after one month. The relative quantity of expression of Bax in lacrimal glands of group C1, C2 and D1, D2 were significantly lower than that of the group B1, B2 (all $P < 0.01$). The quantity of expression of Bax in the group C2 was lower than that in the group C1 ($P < 0.05$), while the difference was not significant between C1 and D2 ($P > 0.05$). The quantity of expression of Bcl-2 in lacrimal glands of group C1, C2 and D1, D2 were significantly higher than that of the group B1, B2 (all $P < 0.01$). The quantity of expression of Bax in the group C2 was higher than that in the group C1 ($P < 0.05$), while the difference was not significant between C2 and D2 ($P > 0.05$). **Conclusion** Epimedium total flavonoids can promote the expression of Bcl-2 in male rabbit of dry eye syndrome, down-regulate the expression of Bax and the effect gradually became similar to that of androgen. It is possible that the epimedium total flavonoids achieve the inhibition of apoptosis by promoting the expression of Bcl-2 and inhibiting the expression of Bax in lacrimal gland epithelial cells.

[Key words] epimedium total flavones; dry eye syndrome; lacrimal gland; Bax; Bcl-2