

# Smad1 在 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视中的作用机制

崔倩, 杨先, 车成业, 刘桂波, 王青

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81300790)  
作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学附属医院眼科  
作者简介: 崔倩, 硕士研究生, 研究方向: 小儿斜视、弱视。  
通讯作者: 杨先, 博士, 教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 小儿斜视、弱视. yangxian\_zhao@126.com  
收稿日期: 2016-01-11 修回日期: 2016-03-16

## Study of Smad1 in C57BL/6 mice with form-deprived myopia

Qian Cui, Xian Yang, Cheng-ye Che, Gui-bo Liu, Qing Wang

**Foundation item:** the National Natural Science Foundation of China (No. 81300790)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

**Correspondence to:** Xian Yang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. yangxian\_zhao@126.com

Received: 2016-01-11 Accepted: 2016-03-16

### Abstract

• **AIM:** To explore the mechanism of Smad1 during form-deprivation myopia development in C57BL/6 mice model.

• **METHODS:** Sixty 3-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into experimental groups and normal groups (NC) which totally include four groups: form-deprived 3wk group (FDM3W,  $n=20$ ), form-deprived 4wk group (FDM4W,  $n=20$ ), FDM3W normal control group (FDM3W-NC,  $n=10$ ) and FDM4W normal control group (FDM4W-NC,  $n=10$ ). Mice in experimental groups were treated with diffuser wearing on right eyes (MD-T), and their left eyes were naturally exposed as their self-control group (MD-C). The normal control groups were free of all the treatments, but the same measurements were performed at the same time-point. Refractive status was examined at 3 and 4wk after treatments in all mice. The histological analysis was applied to assess the changes of the sclera and the retina. The immunohistochemical staining and quantitative real-time PCR (QRT-PCR) were applied to investigate the expression of Smad1 protein and mRNA in retina.

• **RESULTS:** (1) There was no significant difference between right and left eyes in every group before experiment. The normal control eyes showed physiological farsighted development and the MD eyes demonstrated relatively myopization. After experiments, a significant myopia shift had been induced in MD-T compared with MD-C and NC ( $P < 0.05$ ). (2)

Histopathologic examination showed posterior sclera and retina in MD-T were thinner than in MD-C and NC groups. Compared with MD-C and NC groups, the expression of Smad1 in retina in MD-T was significantly decreased ( $P < 0.01$ ).

• **CONCLUSION:** The expression of Smad1 in retina of form-deprived myopia was down-regulated, and Smad1 likely to be involved in the development of myopia through the transduction of retinal signal.

• **KEYWORDS:** Smad1; form-deprived myopia; refraction; retina; C57BL/6 mice

**Citation:** Cui Q, Yang X, Che CY, et al. Study of Smad1 in C57BL/6 mice with form-deprived myopia. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(4):617-621

### 摘要

**目的:** 通过建立 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视模型, 探究 Smad1 在近视形成中的作用机制。

**方法:** 将 60 只 3 周龄 C57BL/6 小鼠随机分为实验组和正常对照组 (NC), 包括形觉剥夺 3wk 组 (FDM 3W,  $n=20$ ), 形觉剥夺 4wk 组 (FDM 4W,  $n=20$ ), FDM3W 正常对照组 (FDM 3W-NC,  $n=10$ ) 和 FDM4W 正常对照组 (FDM 4W-NC,  $n=10$ ), 实验组右眼遮盖, 左眼自然暴露作为自身对照, 正常对照组不予任何处理。在实验 3wk 及 4wk 时检测所有小鼠屈光状态, HE 染色观察巩膜及视网膜组织结构变化, 免疫组织化学方法及实时荧光定量 PCR 观察 Smad1 在视网膜中的表达情况。

**结果:** (1) 自身对照眼和正常对照组呈生理性远视化发展, FDM3W、FDM4W 实验眼均呈相对近视化发展, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); (2) 与自身对照组及正常对照组比较, FDM3W、FDM4W 实验眼巩膜及视网膜明显变薄; 实验眼视网膜中 Smad1 表达明显下降, 差异具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

**结论:** 小鼠形觉剥夺性近视眼视网膜 (尤其是内核层及内丛状层) 中 Smad1 的表达呈下调趋势, Smad1 极有可能通过转导视网膜信号参与了近视发生发展过程。

**关键词:** Smad1; 形觉剥夺性近视; 屈光度; 视网膜; C57BL/6 小鼠

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2016.4.07

**引用:** 崔倩, 杨先, 车成业, 等. Smad1 在 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视中的作用机制. *国际眼科杂志* 2016;16(4):617-621

### 0 引言

研究发现, 近视是目前全球发生率最高的屈光不正<sup>[1]</sup>。已有大量研究确定高度近视患者并发青光眼、白内障和视网膜脱离等疾病的危险性显著增加, 进而会导致不

可逆性视力损失甚至致盲,但其发病机制目前尚不明确。目前近视发生机制研究中公认的两种学说“巩膜主动重塑机制”学说<sup>[2]</sup>和“局部视网膜调控机制”学说<sup>[3]</sup>均认为近视眼的形成是受局部视网膜信息调控引起巩膜细胞外基质主动重塑的结果。但视网膜与巩膜之间具体的信号转导通路仍需进一步探索。McBrien<sup>[4]</sup>研究已证实 BMP/TGF- $\beta$  信号通路通过调控巩膜重塑过程参与了近视的发生发展过程。

作为 BMP/TGF- $\beta$  信号通路中主要的下游信号转导因子<sup>[5]</sup>,Smads 转录因子在 BMP/TGF- $\beta$  信号转导中起着关键作用,其中 Smad1 已被确定为 BMP-2 的重要信号转导分子。本实验通过建立 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视 (form deprivation myopia, FDM) 模型,观察屈光度及眼球后壁形态学改变以及 Smad1 在视网膜中的表达变化,分析 Smad1 与屈光度及视网膜变化之间的联系,探讨 Smad1 在近视眼中的作用机制,以期通过此次探索能够为近视发病机制的研究提供更多的实验基础和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 近交系 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,21 日龄,体质量  $13.6 \pm 0.8$ g,动物购自常州卡文斯实验动物有限公司。0.5% 复方托吡卡胺滴眼液散瞳后裂隙灯下检查所有小鼠眼部情况,排除标准包括:(1)角膜混浊、晶状体混浊及眼部感染的小鼠;(2)小瞳孔、小角膜、眼部畸形的小鼠;(3)双眼屈光参差  $>10$ D,或 1 眼有明显远视或近视。实验动物饲养室温控制在  $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ,通风良好,室内自然光照,12h/12h 光照/黑暗环境每日交替,小鼠自由进水、摄食。动物的饲养及处理经青岛大学医学院动物伦理委员会审批通过。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 带状光检影验光仪(苏州六六视觉科技股份有限公司)、Olympus 光学显微镜(日本 Olympus 公司)、Smad1 兔多克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司)、PCR 引物(大连宝生物工程有限公司)、Ver. 3.0 型 RNA PCR 试剂盒(大连宝生物试剂公司)、SYBR(日本 TaKaRa 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)、SP 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验小鼠分组** 将 60 只 3 周龄健康 C57BL/6 小鼠随机编号 1~28,剪耳标记,利用随机数字表法将其分成 4 组,分别为:(1)形觉剥夺遮盖 3wk 组(20 只),记为 FDM 3W;(2)形觉剥夺遮盖 4wk 组(20 只),记为 FDM 4W;(3)形觉剥夺 3wk 正常对照组(10 只),记为 FDM 3W-NC;(4)形觉剥夺 4wk 对照组(10 只),记为 FDM 4W-NC。对照组周龄均与实验组相匹配。其中实验组右眼为实验眼(MD-T),左眼为自身对照眼(MD-C),正常对照组双眼不予任何处理。每 3~4 只小鼠饲养在一个标准鼠笼内。

**1.2.2 形觉剥夺性近视小鼠模型的建立** 将半透明试管制成等大、直径约为 8mm、周边边缘约为 1mm 的半透明眼罩进行形觉剥夺。经 5% 枸橼酸芬太尼注射液麻醉后,使用 4-0 缝线将眼罩缝合于小鼠右眼眼周。眼罩边缘距离眼睑的距离足够长,以免影响其功能。手工用塑料片制成的项圈(外直径为 36mm,内直径为 10mm)装在颈部周围,以防小鼠将眼罩抓脱。每天早、中、晚三次检查小鼠眼部情况,查看有无异常分泌物及感染、眼罩有无脱落,以保证

小鼠实验眼一直处于形觉剥夺状态。必要时给予妥布霉素滴眼液预防感染。诱导 3、4wk(即出生后 6、7wk)后,检测实验动物的屈光度,并取视网膜组织进行检测。

**1.2.3 眼屈光度的测量** 小鼠的屈光度检查采用传统的带状光视网膜检影法。由同一位经验丰富的验光师在未知小鼠分组的情况下对其进行检查。测量前小鼠双眼予以 0.5% 复方托吡卡胺滴眼液点眼,每 5min 1 次,连续 3 次,使瞳孔充分散大,直径  $>1.5$ mm,验光时不进行麻醉。暗室条件下,实验者抓握小鼠使其暴露被检眼,验光师取 50cm 工作距离,以 0.50D 间隔手持验光镜片分别在水平及垂直子午线上检影,散光以半量等效球镜计算。测量 3 次,以 D 为单位,记录每只小鼠各眼的屈光度平均值。

**1.2.4 标本处理** 测量屈光度后,颈椎脱臼法处死全部小鼠。在显微镜下,迅速取出整个眼球,用眼科镊和眼科剪剥离眼球周围筋膜,沿角膜缘将眼球剪开,去除眼球内的玻璃体,分离巩膜留取视网膜。各组随机取 5 只小鼠眼球置于 4% 甲醛固定 48h 后行石蜡包埋,备用于常规 HE 染色及免疫组化染色;各组其它小鼠视网膜置于 Trizol 液中,并立即震荡充分裂解后,保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ ,备用于实时荧光定量 PCR 反应。

**1.2.5 免疫组织化学染色法检测 Smad1 蛋白的表达** 在各组中随机取 5 只小鼠眼球,予以常规石蜡包埋,所有组织块于后极部以  $3\mu\text{m}$  的厚度连续切片 4 张,一张用于苏木素-伊红(HE)染色,1 张用做阴性对照,2 张用于免疫组化染色。按照 SP 试剂盒内说明书进行免疫组化染色,一抗工作浓度为 1:100,以 PBS 液代替一抗作阴性对照。显微镜下观察各组标本中 Smad1 的显色程度、分布范围及密度,以细胞核或细胞浆染成蓝色为阳性标准。对 HE 染色及免疫组织化学染色结果行描述性分析。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 Smad1 mRNA** 从  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱内取出冻存的小鼠视网膜组织,用 Trizol 法提取总 RNA。目的基因应用 primer design 基因分析软件设计引物,并由 TaKaRa 生物公司合成。Smad1 上下游引物分别为:5' - GGAATGCTGTGAGTCCCATTG - 3'、5' - TGCTGAGGATTGTACTCGCTGTG - 3',产物片段长为 23bp;内参  $\beta$ -actin 上、下游引物分别为:5' - GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC - 3', 5' - GACTCATCGTACTCTGCTTGC - 3',产物长度 301bp。常规提取总 RNA,采用紫外分光光度计分别测定光密度 OD260 与 OD280,OD260 与 OD280 比值在 1.8~2.0 之间,表明提取的 RNA 蛋白污染少,纯度较好。逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板扩增 Smad1 目的基因,Syber Green 荧光定量 PCR 检测:PCR 热循环参数为  $95^{\circ}\text{C}$  30s,  $95^{\circ}\text{C}$  5s,然后第二步反应  $60^{\circ}\text{C}$  30s,  $95^{\circ}\text{C}$  15s,进行 40 个循环,于每个循环的第二步( $95^{\circ}\text{C}$  15s)收集荧光信号。扩增结束后,进入分析结果界面,以  $\beta$ -actin 作为内参照基因,与对照组相比较,得到 Smad1 相对定量值(RQ 值)。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,实验组内形觉剥夺眼(MD-T)与对侧眼(MD-C)的比较采用配对样本 *t* 检验;不同组间的两两比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义;以  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠实验前后屈光度比较** 各组小鼠实验前后实验眼、自身对照眼及正常对照眼屈光度的比较见表 1。

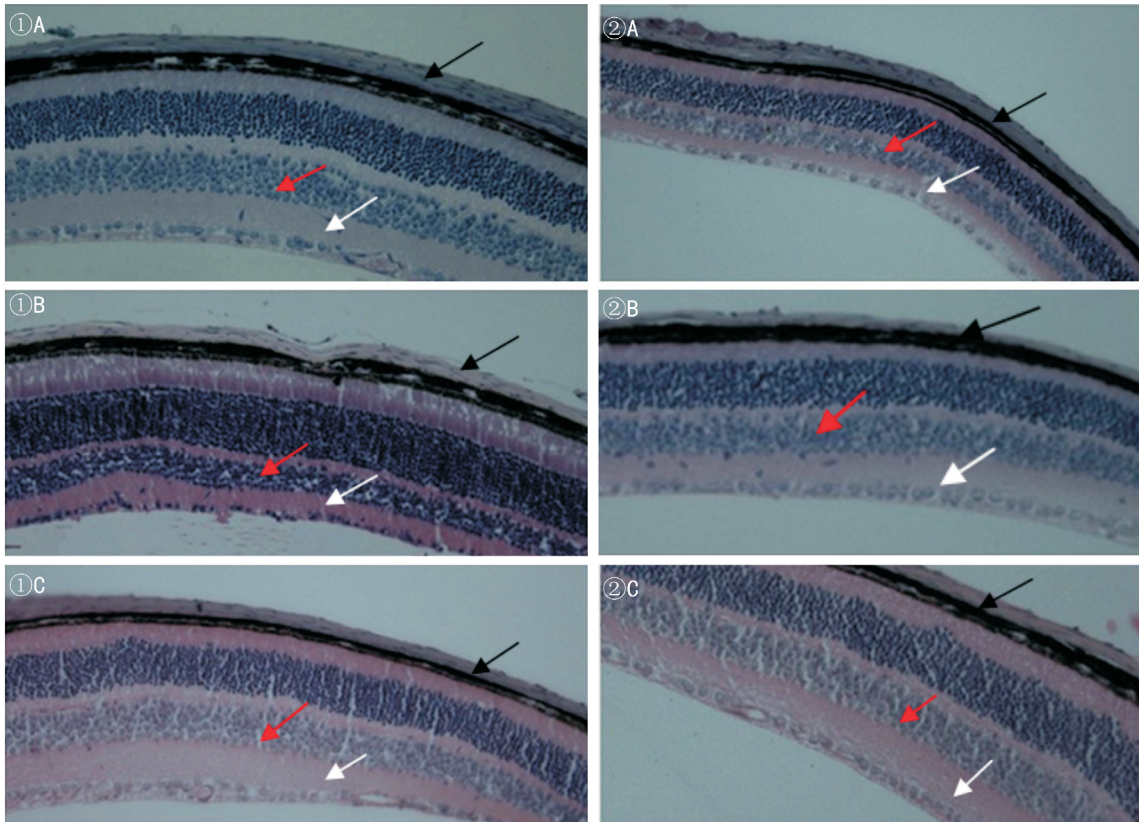


图1 形觉剥夺不同时间眼球后壁的改变(HE,×200) A:形觉剥夺3wk;B:形觉剥夺4wk组;①:自身对照眼;②:实验眼;③:正常对照眼;黑色箭头所指为巩膜,红色箭头所指为内核层,白色箭头所指为内丛状层。

表1 各组小鼠实验前后实验眼、自身对照眼及正常对照眼屈光度的比较 ( $\bar{x} \pm s, D$ )

组别	实验前	实验后
FDM 3W(MD-T)	4.438±0.928	1.938±0.688
FDM 3W(MD-C)	4.438±0.831	6.763±0.497
FDM 3W-NC	4.725±0.432	6.700±0.350
FDM 4W(MD-T)	4.663±0.665	0.913±0.515
FDM 4W(MD-C)	4.688±0.633	8.438±0.458
FDM 4W-NC	5.250±0.624	8.475±0.448

实验前,正常对照组小鼠左右眼屈光度在统计学上无统计学差异( $P>0.05$ ),由于是随机分组,根据正常对照组小样本推断所有实验动物在实验前的屈光度无统计学意义。FDM 3W组、FDM 4W组中,自身对照眼和正常对照组均呈生理性远视化发展。实验眼均呈相对近视化发展,FDM 3W组屈光度分别与自身对照眼、正常对照眼相比,差异均具有统计学意义( $t=-40.52, P<0.01; t=-20.49, P=0.032$ );FDM 4W组屈光度分别与自身对照眼、正常对照眼相比,差异具有显著统计学意义( $t=-49.356, P<0.01; t=-48.992, P<0.01$ )。FDM 3W组中实验眼与FDM 4W组相比差异具有统计学意义( $t=-5.968, P=0.006$ ),这表明随着形觉剥夺时间的延长,实验眼向近视方向漂移程度越高。在不同时间自身对照眼和正常对照眼屈光度在统计学上均无明显差异。

**2.2 光镜下眼球后壁的改变** 眼球后壁石蜡切片行HE染色,光镜下观察可见小鼠巩膜由多层纤维结缔组织构成(图1)。与自身对照眼和正常对照眼相比,FDM 3W时实验眼巩膜变薄,成纤维细胞排列紊乱;FDM 4W时巩膜明

显变薄,胶原纤维紊乱、粗细不均。实验组视网膜厚度变薄,尤其是内核层和内丛状层。而自身对照眼及正常对照眼巩膜厚度无明显差异。各图中眼球后壁分层均清晰可见,从上至下分别为:巩膜-脉络膜-视网膜色素上皮层-外节-内节-外核层-外丛状层-内核层-内丛状层-神经节细胞层-神经纤维层。

**2.3 各组小鼠眼球后壁 Smad1 蛋白的表达** 各组小鼠实验眼及对对照眼 Smad1 蛋白的表达变化见图2。图中可见对照眼中 Smad1 阳性蛋白表达于视网膜,呈棕黄色颗粒状,染色明显。而在 FDM 3W 及 FDM 4W 后,Smad1 表达逐渐下调,胞浆着色明显降低。

**2.4 各组小鼠视网膜 Smad1 mRNA 的表达** 根据实时荧光定量 PCR 结果显示,各组视网膜均有 Smad1 mRNA 的表达。单因素方差分析结果显示,差异有显著统计学意义( $F=31.65, P<0.01$ )。与正常对照组及自身对照眼比较,FDM 3W 组实验眼 Smad1 mRNA 表达呈下调趋势( $t=7.263, P<0.01; t=-9.487, P<0.05$ ),FDM 4W 组实验眼 Smad1 mRNA 表达显著减少( $t=12.778, P<0.01; t=-15.573, P<0.01$ ),差异均具有统计学意义。FDM 3W 组中实验眼与 FDM 4W 组相比差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。在不同时间自身对照眼和正常对照眼 Smad1 的表达在统计学上均无统计学差异( $P>0.05$ )。各实验组视网膜 Smad1 mRNA 表达量比较分别见表2、图3。

### 3 讨论

近视是一类受遗传、环境等多因素共同作用的复杂性疾病<sup>[6-7]</sup>,有关其发病机制的研究也众说纷纭。Smad1 是 BMP/TGF- $\beta$  信号通路中 BMP-2 下游的主要信号转导因

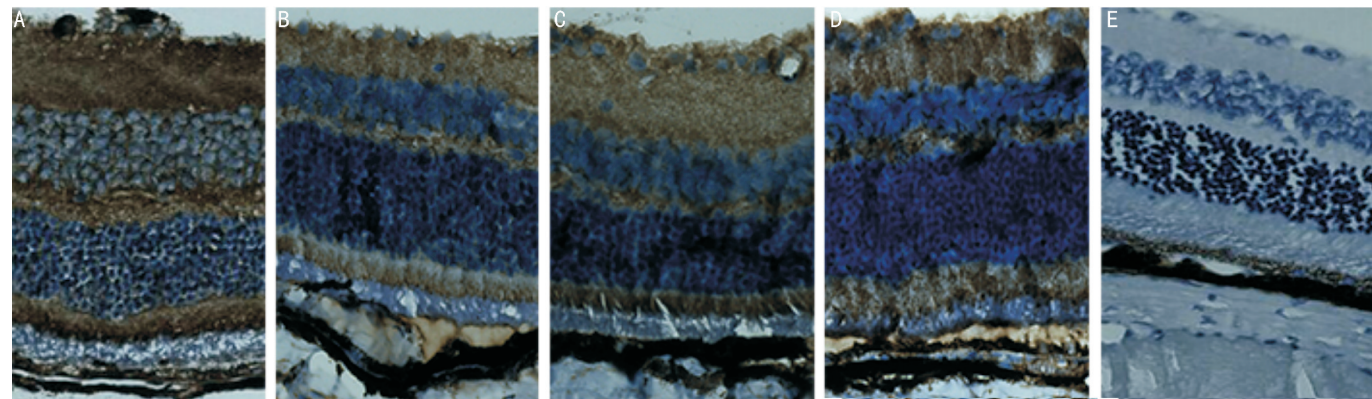


图2 各组小鼠 Smad1 蛋白的表达情况 (SP, ×400) A: FDM 3W 自身对照眼; B: FDM 3W 实验眼; C: FDM 4W 自身对照眼; D: FDM 4W 实验眼; E: 以 PBS 液代替一抗作阴性对照。

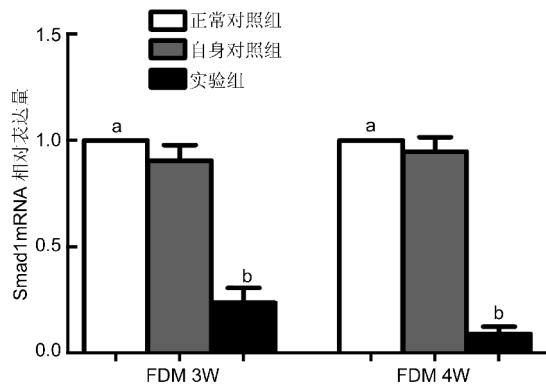


图3 各组 FDM 3W、FDM 4W 小鼠实验组视网膜 Smad1 mRNA 的表达 <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组、自身对照组; <sup>a</sup> $P > 0.05$  vs 自身对照组。

表2 各组小鼠实验后实验眼、自身对照眼及正常对照眼 Smad1 mRNA 相对表达量比较  $\bar{x} \pm s$

时间点	MD-T	MD-C	NC
FDM 3wk	0.264 ± 0.067	1.253 ± 0.585	1.100 ± 0.389
FDM 4wk	0.069 ± 0.068	1.296 ± 0.430	1.131 ± 0.294

子<sup>[8-9]</sup>,在近视形成过程中发挥着不可或缺的信号转导作用。Guo等<sup>[10]</sup>研究发现近视诱导过程中 BMP/TGF- $\beta$  信号通路的下游转录因子 Smad1 表达出现下调趋势。此外 Wang等<sup>[11]</sup>研究发现信号转导蛋白 phospho-Smad 1 的表达在刺激 BMP-2 之后明显升高。这些研究均充分暗示出 Smad1 信号转导通路参与了巩膜重塑过程。之前有关此方面的研究基本是体外细胞培养进行<sup>[12-13]</sup>,本实验的创新之处在于采用 C57BL/6 小鼠不同时间段的形觉剥夺性近视模型观察 Smad1 的动态表达变化,探究其与屈光度、眼球后壁形态之间的关联以及其在近视中的作用机制。

本实验中屈光度结果显示实验眼与自身对照眼及正常对照组相比明显向近视方向漂移,这一趋势与之前的相关研究结果相一致<sup>[14]</sup>。在本实验中,我们还观察到 Smad1 表达于视网膜各层,而且随着剥夺时间的延长、向近视方向漂移程度的加深,实验组视网膜中 Smad1 的表达量明显呈渐进性减少,巩膜及视网膜(特别是内核层和内丛状层)也随之逐渐变薄。Ehrlich等<sup>[15]</sup>曾报道在鸡形觉剥夺性近视眼中视网膜较对照组明显变薄,尤其是外核层、内核层以及内丛状层。Fujikado等<sup>[16]</sup>曾推断视网膜内

层区参与了形觉剥夺性近视形成过程。

目前儿童和青少年近视不仅发生率大幅度增高,逐渐向低龄化发展,且发生后呈进展趋势。神经、肌肉异常导致的上睑下垂,或先天性屈光间质混浊,都可以导致 FDM 的发生<sup>[17]</sup>。研究发现,长时间的光线照射和羟多巴胺等可以抑制 FDM 的形成,但其并不因切断视神经而被抑制,所以 FDM 的形成为局部视网膜变化的结果,所以在此实验基础上我们进一步推测在形觉剥夺性近视中视网膜接受信号释放出的信号因子调控 Smad1 的表达下调,继而引起视网膜细胞数目减少或发生形态学改变使视网膜厚度变薄,并且 Smad1 的表达减少导致 BMP/TGF- $\beta$  信号通路的信息传导受阻,最终影响到 BMP-2 对巩膜重塑的调控作用,形成近视。

综上所述,在形觉剥夺性近视中 Smad1 的表达呈下调趋势,且其表达量与屈光度、视网膜及巩膜表现出相关性,因此我们推测随着近视的加重,视网膜释放出信号之后通过 Smad1 调控信号通路的传导最终影响巩膜的重塑过程,并借此参与近视的形成过程。虽然目前大量国内外研究证实形觉剥夺性近视为巩膜重塑的结果<sup>[18]</sup>,而且 Scheffel等<sup>[19]</sup>表明形觉剥夺性近视与局部视网膜的作用密切相关,但是其具体是如何通过局部视网膜信息调控的机制仍未有定论。有研究报道 Smad1 介导的信号转导途径可以调控胚胎发育和细胞环境稳态<sup>[20]</sup>,同时大量研究发现,在小鼠及其它动物,幼年改变其视觉环境则容易诱导出现近视,所以考虑到在实验性近视研究中环境是一个很好的可控制因素,我们大胆猜测能否在幼年时期从基因水平或者细胞水平上调节 Smad1 的表达来达到近视的防治作用,在今后的研究工作中我们将做进一步的探索。

#### 参考文献

- Andrei V, Tatiana V, Guggenheim Jeremy A, et al. ALPL2 regulates refractive error and myopia development in mice and humans. *Plos Genetics* 2015;11(8):e1005432
- Rada JA, Shelton S, Norton TT. The sclera and myopia. *Exp Eye Res* 2006;82(2):185-200
- Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia. *Neuron* 2004; 43(4):447-468
- McBrien NA. Regulation of scleral metabolism in myopia and the role of transforming growth factor-beta. *Exp Eye Res* 2013;114:128-140
- Wordinger RJ, Sharma T, Clark AF. The Role of TGF- $\beta$  2 and Bone Morphogenetic Proteins in the Trabecular Meshwork and Glaucoma. *Ocul Pharmacol Ther* 2014;30(2-3):154-162
- Morgan G, Ohno M, Saw SM. Myopia. *Lancet* 2012;379:1739-1748

- 7 孙明甦,张丰菊. 病理性近视发病机制相关研究新进展. 中国实用眼科杂志 2014;32(4):393-397
- 8 Liu HP, Lin YJ, Lin WY, *et al.* A novel genetic variant of BMP2K contributes to high myopia. *Clin Lab Anal* 2009;23(6):362-367
- 9 Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):251-263
- 10 Guo H, Jin X, Zhu T, *et al.* SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF- $\beta$  pathway in non-syndromic high myopia. *Med Genet* 2014;51(8):518-525
- 11 Wang Q, Zhao G, Xing S, *et al.* Role of bone morphogenetic proteins in form-deprivation myopia sclera. *Mol Vis* 2011;17:647-657
- 12 Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  induces nuclear import of Smad3 in an importin- $\beta$ 1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2001;12(4):1079-1091
- 13 Xu L, Kang Y, Col S, *et al.* Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF $\beta$  signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* 2002;10(2):271-282
- 14 Zhou X, Ji F, An J, *et al.* Experimental murtin myopia induces collagen type I $\alpha$ 1 (COL1A1) DNA methylation and altered COL1A1 messenger RNA expression in sclera. *Mol Vis* 2012;18:1312-1324
- 15 Ehrlich D, Sattayadai J, Zappia J, *et al.* Effects of selective neurotoxins on eye growth in the young chick. *Ciba Found Symp* 1990;155:63-84
- 16 Fujikado H, Hosohata J, Omoto T. ERG of form deprivation myopia and drug induced ametropia in chicks. *Curr Eye Res* 1996;15(1):79-86
- 17 Leist M, Ghezzi P, Grasso G, *et al.* Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004;305(5681):239-242
- 18 张艳明,瞿佳,周翔天. 形觉剥夺性近视中巩膜重塑的研究. 眼科研究 2007;25(5):390-392
- 19 Scheaffel F, Barmann M, Hagel G, *et al.* Studies on the role of the retinal dopamine/melatonin system in experimental refractive errors in chickens. *Vis Res* 1995;35(9):1247-1264
- 20 Lan Xu, Xiaohao Yao, Xiaochu Chen, *et al.* Msk is required for nuclear import of TGF- $\beta$ /BMP activated Smads. *J Cell Biol* 2007;178(6):981-994