

## ·论著/近视研究·

# C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视视网膜 Pax6 的表达及其启动子区域 CpG 岛甲基化的改变

王晓静 陈阿银 刘懋 赵福新 黄芙蓉 周翔天

**【摘要】** 目的 研究 C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视形成和恢复期视网膜 Pax6 mRNA 表达及其启动子区域 CpG 岛甲基化水平的变化情况。方法 实验研究。采用单眼形觉剥夺(MD)建立 C57BL/6 小鼠近视动物模型和恢复期动物模型,将入选的小鼠按随机数字表法分为:MD 4 周实验组(12 只)、同龄对照组(12 只);MD 4 周再恢复 1 周实验组(6 只)、同龄对照组(NC, 6 只)。实验前后分别用红外偏光摄影验光仪检测小鼠眼球的屈光状态,光学相干断层扫描(OCT)检测小鼠的眼轴长度和玻璃体腔深度。RT-PCR 检测视网膜 Pax6 mRNA 表达水平;用硫化测序聚合酶链式反应(BSP)检测 C57BL/6 小鼠视网膜 Pax6 启动子区 CpG 岛甲基化水平。实验组形觉剥夺眼(MD-T)与对侧眼(MD-C)比较采用配对  $t$  检验,不同组小鼠比较采用独立样本  $t$  检验。结果 MD 4 周后,MD-T 屈光度 $[(-3.27\pm 0.52)D]$ 与 MD-C $[(1.13\pm 1.17)D]$ ( $t=-12.726, P<0.01$ )、NC $[(1.65\pm 1.69)D]$ ( $t=-6.832, P<0.01$ )相比明显向近视方向漂移。MD 4 周再恢复 1 周后,实验性近视完全恢复。MD 4 周后,MD-T 相对定量值 $(0.495\pm 0.247)$ 相比 MD-C $(1.011\pm 0.477)$ ( $t=-3.16, P<0.05$ )、NC $(1.071\pm 0.401)$ ( $t=-2.99, P<0.05$ )Pax6 mRNA 表达水平明显下降;而恢复 1 周后 Pax6 mRNA 表达水平恢复到正常对照水平。MD 4 周后,MD-T Pax6 启动子区 CpG 岛甲基化水平与 MD-C、NC 比较,差异无统计学意义。结论 形觉剥夺性近视 C57BL/6 小鼠视网膜 Pax6 mRNA 表达明显下降,启动子区 CpG 岛的甲基化水平无明显变化,提示近视形成可能和 Pax6 的下降相关,但这一改变可能不是由视网膜 Pax6 启动子区 CpG 岛的甲基化变化引起。

**【关键词】** 近视; 视网膜; Pax6; DNA 甲基化; CpG 岛; 小鼠

**Study on mRNA expression and DNA methylation of Pax6 in form-deprived myopia in C57BL/6 mice** Wang Xiaojing, Chen Ayin, Liu Mao, Zhao Fuxin, Huang Furong, Zhou Xiangtian. Eye Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China  
Corresponding author: Zhou Xiangtian, Email: zxt-dr@wz.zj.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes in refraction and ocular biometric parameters in monocular form-deprivation myopia, and to investigate whether myopia development is associated with changes in the retinal levels of Pax6 messenger RNA (mRNA) and the DNA methylation state in cytosine-phosphate-guanine (CpG) sites in the Pax6 promoter. **Methods** Experimental study. A diffuser lens was worn over one eye of one group of C57BL/6 mice for 4 weeks to establish a monocular form deprivation (MD) myopia model, and another group wore a diffuser lens for 4 weeks, then the goggles were removed for 1 week to build a recovery model. A total of 36 C57BL/6 mice (postnatal day 21) were randomly assigned to the MD group ( $n=12$ ), a normal control (NC) group ( $n=12$ ); and MD recovery group ( $n=6$ ), a corresponding control group ( $n=6$ ). Ocular biometry was determined in mice by an EIR (eccentric infrared photorefractor) and OCT (optical coherence tomography). The Pax6 mRNA level in the retina was determined by real-time PCR, and the Pax6 methylation state was observed by bisulfite DNA sequencing. Data were analyzed using paired  $t$  test or independent  $t$  test. **Results** After 4 weeks of form deprivation, a significant myopic shift had been

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2015.06.003

基金项目:国家 973 计划(2011CB504602);国家自然科学基金(81170870、81170880、81422007);浙江省自然科学基金(LZ14H120001);中组部青年拔尖人才支持计划

作者单位:325027 温州医科大学附属眼视光医院

通信作者:周翔天,Email:zxt-dr@wz.zj.cn

induced in the treated eyes (MD-T) ( $-3.27 \pm 0.52$  D) compared to the contralateral eyes (MD-C) ( $1.13 \pm 1.17$  D) ( $t = -12.726$ ,  $P < 0.01$ ) and normal control eyes (NC) ( $1.65 \pm 1.69$  D) ( $t = -6.832$ ,  $P < 0.01$ ). Pax6 mRNA in the MD-T eyes ( $0.495 \pm 0.247$ ) decreased significantly compared to the MD-C eyes ( $1.011 \pm 0.477$ ) ( $t = -3.16$ ,  $P < 0.05$ ) and the NC eyes ( $1.071 \pm 0.401$ ) ( $t = -2.99$ ,  $P < 0.05$ ). One week after the removal of the diffuser lenses, Pax6 mRNA expression in recovery eyes had been fully restored to levels in the control eyes. The methylation percentage in CpG sites of the Pax6 promoter in the MD-T eyes was not significantly different compared to MD-C and NC eyes. **Conclusion** Monocular form deprivation myopia can be induced in C57BL/6 mice. Retinal Pax6 mRNA was reduced in the MD-T eyes compared to MD-C and NC eyes, but the changes in Pax6 mRNA may not be caused by DNA methylation of the CpG island in the promoter region of Pax6.

**【Key words】** Myopia; Retina; Pax6; DNA methylation; CpG island; Mice

近视是一种常见的屈光不正,在美国人群中其发病率达 33%<sup>[1]</sup>,而在一些东亚国家其发病率甚至高达 70%<sup>[2]</sup>,且发生年龄日趋提前。目前普遍认为近视受遗传因素和环境因素共同调控<sup>[3]</sup>,但其确切发病机制尚未完全明了。

其中环境因素所引起的近视,本身不会导致基因序列发生改变,这种不影响基因序列但可产生可遗传的改变可能是由于表观遗传所致。而 DNA 甲基化是表观遗传学的重要形式<sup>[4]</sup>。在形觉剥夺性近视动物模型 C57BL/6 小鼠近视形成过程中, COL1 $\alpha$ 1 mRNA 水平下降并且 COL1 $\alpha$ 1 启动子区的 DNA 甲基化状态与 I 型胶原表达下降密切相关<sup>[5]</sup>,提示诱导近视形成过程中存在着 DNA 甲基化现象。

在人类, Pax6 基因突变会导致各种眼部畸形<sup>[6-7]</sup>。一些研究表明 Pax6 与近视相关<sup>[8-10]</sup>。然而, Simpson 等<sup>[11]</sup>在大量种群研究中发现, Pax6 基因与单纯性近视无明显关联性。对小鸡、恒河猴动物近视动物模型进行研究表明,近视形成过程中视网膜 Pax6 表达发生了相应的变化<sup>[12-13]</sup>。由此推测在近视的发生发展过程中可能存在 Pax6 表达的改变。因此本研究将以形觉剥夺性近视小鼠为模型,研究视网膜 Pax6 在近视形成过程中表达是否发生改变及其是否与 DNA 甲基化水平改变相关。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

本研究使用的 21 日龄雄性 C57BL/6 小鼠均由温州医科大学实验动物中心[SYXK(浙)2014-0006]提供,并通过温州医科大学伦理委员会同意,遵循 ARVO(The Association for Research in Vision and Ophthalmology)关于眼科和视觉研究中对动物的处理原则。饲养条件按照国际要求的标准实验室条件:控制室温在 20~26℃,日光灯照明控制在 250~300 lx 且装配有自动定时装置(12/12 h 光照/黑暗环境),

小鼠在正常饲养环境下能够自由摄食、进水。

### 1.2 方法

1.2.1 眼生物参数的测量 21 日龄雄性近交系 C57BL/6 小鼠 36 只,按随机数字表法分为:①单眼形觉剥夺(monocular visual deprivation, MD; 剥夺眼为 MD-T, 对侧眼为 MD-C)4 周实验组(12 只);②同龄对照组(12 只, NC);③MD 4 周再恢复 1 周实验组(6 只);④相对恢复 1 周组的同龄对照组(6 只)。

实验前后分别用本实验室自行搭建的红外偏心仪<sup>[14]</sup>测量小鼠眼球的屈光状态,采用自行搭建的 OCT<sup>[15]</sup>测量眼球生物学参数,包括眼前节、玻璃体腔深度和眼轴长度等。

1.2.2 小鼠视网膜取材 采用颈椎脱臼法将小鼠迅速处死,立即用弯镊迅速将眼球取出(尽量少带出肌肉组织),用剪刀和镊子在显微镜下仔细去除球外筋膜及肌肉组织。沿角巩膜缘处剪开眼球,迅速分离出视网膜,每只眼的视网膜作为 1 个样本放入 EP 管中,上述操作过程均在手术显微镜下进行。用于 MD 4 周 mRNA 水平检测、甲基化水平检测的样本量均为 6 眼;用于 MD 4 周再恢复 1 周 mRNA 水平检测的样本量也为 6 眼。

### 1.2.3 实时聚合酶链反应(Real-time PCR)检测

1.2.3.1 引物设计及合成 小鼠 Pax6 基因序列由 NCBI(National Center for Biotechnology Information)获取,并用 Primer Express 5.0(Applied Biosystems, 英国)软件设计定量引物。引物序列见表 1。

1.2.3.2 视网膜 RNA 提取和逆转录 ①将加有 500  $\mu$ l Trizol 的视网膜组织利用 Retsch 高通量组织研磨仪研磨至组织完全磨碎;②加入氯仿 100  $\mu$ l (1/5 Trizol 体积);③混匀后离心,吸取上清液至新 EP 管中;④加异丙醇沉淀 RNA;⑤轻轻混匀, -20℃ 冰箱放置过夜使 RNA 充分沉淀;⑥过夜后离心,弃异丙醇;⑦加 75% 乙醇清洗后离心,吸干乙醇;⑧加焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,

表 1 小鼠 Pax6 及内参 18S 基因引物序列

基因	序列
Pax6	上游引物:5'-CTGAGGAACACAGAGAAGACAGG-3'
	下游引物:5'-CATGGAACCTGATGTGAAGGAGG-3'
18S	上游引物:5'-CGGACACGGACAGGATTGAC-3'
	下游引物:5'-TGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'

DEPC)处理过并经高压灭菌的超纯水溶解RNA。取 1  $\mu$ l 提取液,检测 A260/A280 比值及浓度。每个样本取 900 ng 进行反转录合成 cDNA。Real-time PCR 检测条件:50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 10 min, 然后 40 个循环, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min。扩增结束后,进行熔解曲线分析,单峰  $T_m$  判断为 PCR 扩增的单一性。

### 1.2.4 硫化测序 PCR(BSP)

1.2.4.1 CpG 岛预测 使用 NCBI 基因库查找 Pax6 启动子及部分第一外显子区序列,预测软件:Methyl Primer Express v1.0,预测结果发现有 2 个 CpG 岛。引物序列见表 2。

表 2 Pax6 基因硫化测序 PCR 引物序列

基因	序列
Pax6-1	上游引物:5'-AGGATGGAGGAGTTAGATTTTG-3'
Pax6-1	下游引物:5'-AATTCACACTTCTCAAAC-3'
Pax6-2	上游引物:5'-TTGGGAAAGTTAATTTGAGGTT-3'
Pax6-2	下游引物:5'-CCAACTTCTACCAAACCTTTT-3'

1.2.4.2 DNA 提取和亚硫酸氢盐处理 采用酚-氯仿法抽提 C57BL/6 小鼠视网膜基因组 DNA,紫外线分光光度仪测量视网膜基因组 DNA 纯度及浓度,确保 OD 值 260/280 在 1.6~1.9 之间。用 EZ DNA Methylation<sup>TM</sup> Kit(Zymo Research, USA)对视网膜基因组 DNA 进行重亚硫酸氢钠修饰,修饰后的 DNA 用设计好的 Pax6 引物在 Hotstart 酶(promega)作用下进行 PCR 反应,PCR 反应结束后在每管中加入 0.5  $\mu$ l 普通 Takara 酶 72  $^{\circ}$ C, 延伸 10 min。取 5  $\mu$ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察是否扩增出特异性产物。

1.2.4.3 克隆和测序 PCR 产物采用 QIAquick PCR Purification Kit(Qiagen)试剂盒进行纯化回收,采用 Invitrogen 公司的 One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli 试剂盒进行 T 载体连接,将连接产物转化至含氨苄的培养板上,进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落进行菌落 PCR 鉴定,挑选鉴定后的阳性菌落 28~30 个摇菌后送菌液测序。

1.2.4.4 多序列比对和数据分析 利用 DNAMAN 软件对测序结果进行比对分析。每个样本各 CpG 位点 CpG 二核苷酸的甲基化状态用“甲基化比例”来

表示。

### 1.3 统计学方法

实验研究。利用 SPSS 19.0 软件对结果进行统计学分析,MD-T 与 MD-C 相比采用配对  $t$  检验,MD-T 和 MD-C 与 NC 相比采用独立样本  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验前后眼屈光度和各生物学参数的变化

实验前,NC、MD-C、MD-T 的平均屈光度数分别是  $(-3.20 \pm 1.41)D$ 、 $(-2.96 \pm 2.03)D$ 、 $(-3.44 \pm 1.64)D$ ,实验前屈光度差异均无统计学意义。MD 4 周后,剥夺眼向近视方向漂移,MD-T 平均屈光度数为  $(-3.27 \pm 0.52)D$ ,相比 MD-C 偏向近视约 4.50 D,MD-T 与 MD-C ( $t = -12.726, P < 0.01$ )及 NC ( $t = -6.832, P < 0.01$ )相比均产生明显近视;MD 4 周去遮盖 1 周后,MD-T 近视屈光度完全恢复。同时,实验前 MD 组与 NC 组眼轴长度及玻璃体腔深度差异无统计学意义,MD 4 周后 MD-T 眼轴及玻璃体腔深度与 MD-C 和 NC 相比有延长但差异无统计学意义,去遮盖后 1 周各组间的眼轴和玻璃体腔也没有明显变化,各实验组间差异无统计学意义。见表 3。

表 3 对照小鼠(NC)及形觉剥夺小鼠对侧眼(MD-C)及剥夺眼(MD-T)的屈光度及眼球生物学参数( $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	屈光度 (6 眼, D)	眼轴长度 (mm)	玻璃体腔深度 (mm)
MD 4 周	NC	1.65 $\pm$ 1.69	2.814 $\pm$ 0.038 (4 眼)	0.656 $\pm$ 0.019 (4 眼)
	MD-C	1.13 $\pm$ 1.17	2.817 $\pm$ 0.037 (5 眼)	0.660 $\pm$ 0.031 (5 眼)
	MD-T	-3.27 $\pm$ 0.52 <sup>ab</sup>	2.830 $\pm$ 0.039 (5 眼)	0.656 $\pm$ 0.007 (5 眼)
MD 4 周+ 恢复 1 周	NC	0.13 $\pm$ 1.50	2.814 $\pm$ 0.051 (4 眼)	0.640 $\pm$ 0.005 (4 眼)
	MD-C	0.05 $\pm$ 0.56	2.830 $\pm$ 0.027 (5 眼)	0.642 $\pm$ 0.012 (5 眼)
	MD-T	0.42 $\pm$ 0.57	2.856 $\pm$ 0.040 (5 眼)	0.652 $\pm$ 0.015 (5 眼)

注:与 NC 相比,<sup>a</sup>  $P < 0.01$ ;与 MD-C 相比,<sup>b</sup>  $P < 0.01$

### 2.2 形觉剥夺性近视形成及恢复期 Pax6 mRNA 表达情况

在 MD 4 周后,MD-T 组视网膜的 Pax6 mRNA 水平与 NC 组相比下降了 46% ( $t = -2.99, P < 0.05$ ),与 MD-C 相比下降了 49% ( $t = -3.16, P < 0.05$ );MD-C 组与 NC 组相比差异无统计学意义。而在 MD 4 周再恢



复 1 周后, MD-T 组 Pax6 mRNA 水平上调, 与 MD-C 组及 NC 基本一致, 差异无统计学意义(见表 4)。

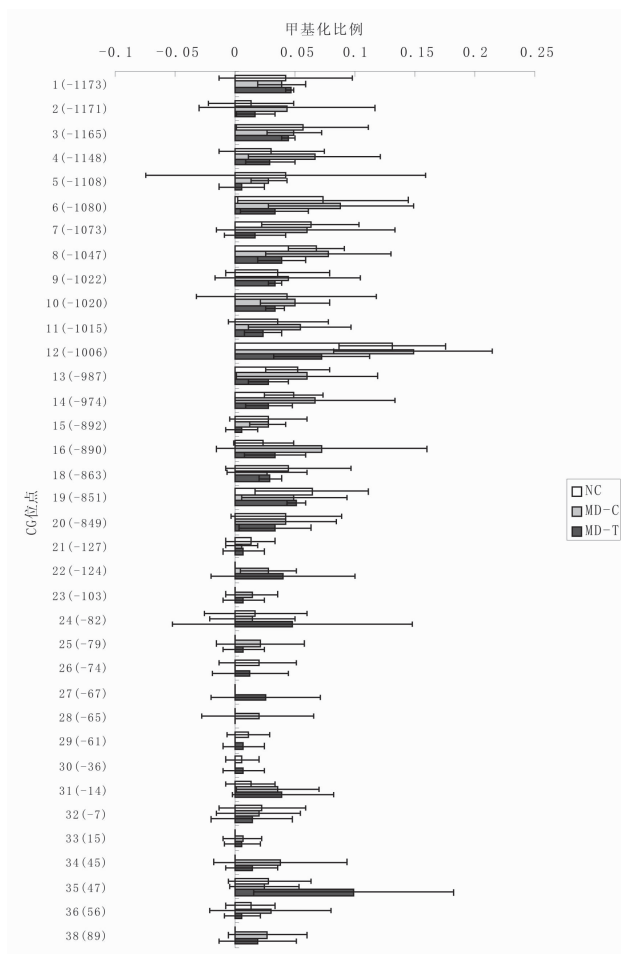
**表 4** 对照小鼠(NC)形觉剥夺小鼠对侧眼(MD-C)、剥夺眼(MD-T) Pax6 mRNA 相对定量值(均为 6 眼,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	组别	Pax6 相对定量值
MD 4 周	NC	1.071±0.401
	MD-C	1.011±0.477
MD 4 周+恢复 1 周	MD-T	0.495±0.247 <sup>ab</sup>
	NC	1.068±0.424
	MD-C	1.043±0.601
	MD-T	1.163±0.763

注:与 NC 组相比, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ ; 与 MD-C 组相比, <sup>b</sup>  $P < 0.05$

### 2.3 BSP 结果

经过 4 周的形觉剥夺, MD 组、NC 组启动子区域各个 CpG 位点的甲基化比例均未发现有统计学意义的改变(见图 1)。CpG 位点总的甲基化比例各组间也无统计学意义的改变。



NC 为对照小鼠眼; MD-C 为形觉剥夺小鼠对侧眼; MD-T 为剥夺眼。y 轴表示 CpG 位点在基因中的具体位置: 以 Pax6 基因转录本起始位点为 0, 负数表示转录起始位点上游, 正数表示转录起始位点下游  
**图 1** 形觉剥夺 4 周各组视网膜 Pax6 基因启动子区域 CpG 二核苷酸甲基化比例(6 眼)

### 3 讨论

近视形成过程中局部视网膜机制<sup>[6]</sup>已形成共识, 该学说认为近视形成过程中眼轴的延长及巩膜变薄可能是受局部视网膜信息调控的结果。Pax 基因家族的共同特点为含有配对盒基元序列, 而 Pax6 作为眼发育的关键基因, 1991 年被发现与先天性无虹膜症有关<sup>[17]</sup>, 这是 Pax6 首次被证实与眼部疾病相关。在随后的研究中发现, 小鼠及人不同发育阶段视网膜中均有 Pax6 的表达<sup>[18-19]</sup>。Bhat 等<sup>[12]</sup>对小鸡进行形觉剥夺 2 周后发现, 实验眼视网膜 Pax6 mRNA 水平相对于对照眼有升高趋势, 但差异无统计学意义。Zhong 等<sup>[13]</sup>发现在负镜片诱导的恒河猴近视模型中, 处理眼 Pax6 表达水平较对侧眼有升高, 并且差异有统计学意义。我们推测 Pax6 可能通过视网膜机制参与近视的发生发展, 其表达在近视形成过程中可能会发生变化。本研究发现 C57BL/6 小鼠形觉剥夺近视动物模型剥夺眼视网膜 Pax6 mRNA 表达较对侧眼及对照眼均有明显降低, 这与先前实验性近视模型小鸡及恒河猴实验结果不同。可以归因于以下 2 点: ①小鸡正常眼球发育过程中视网膜 Pax6 mRNA 表达呈现出明显的两级分布现象(出生后 3 d 至 17 d 视网膜 Pax6 mRNA 迅速减少, 而出生后 17 d 至 31 d 又开始缓慢增加), 而小鼠视网膜 Pax6 mRNA 在胚胎 18 d 达到最大, 出生后开始减少直至稳定<sup>[17]</sup>; ②恒河猴近视动物模型是采用负镜片诱导的方式, 而本实验采用单眼形觉剥夺的方式诱导近视, 2 种不同处理方式制作的动物模型其近视发病机制不同<sup>[20]</sup>。

本研究采用单眼形觉剥夺方法建立近视动物模型, 实验前后对小鼠进行屈光、眼轴的测量。屈光结果显示, MD-T 与 MD-C 和 NC 相比明显向近视方向漂移, MD-T 与 NC 比较有统计学差异, MD-C 与 NC 组相比无明显变化, 这一结果与之前研究一致<sup>[5, 21]</sup>。同样采用形觉剥夺诱导近视, 有研究表明屈光改变近 5.0 D, 测出眼轴相对延长 30  $\mu\text{m}$ , 差异均有统计学意义<sup>[22]</sup>; 而 Barathi 等<sup>[21]</sup>研究显示眼轴改变 50  $\mu\text{m}$  而屈光无变化。本实验结果显示屈光改变约 4.5 D, 测出眼轴相对延长 16  $\mu\text{m}$ , 但由于小鼠个体差异较大, 而本实验样本数量相对较少, 无法得到一个明确的结论。

生物体中细胞生物信息的表达是受遗传因素及表观遗传因素所调控的。前者为生命活动所需的蛋白质提供了核苷酸序列, 而后者则为遗传信息的表达传递准确的时间及空间定位信息, 以确保基因的

表达在时间及空间上的有序性。DNA 甲基化作为表观遗传学的研究热点之一,在实验性近视动物模型中 Zhou 等<sup>[5]</sup>经研究发现,近视形成过程中巩膜 COL1 $\alpha$ 1 基因启动子区甲基化状态发生了明显变化。矫诗明等<sup>[23]</sup>对小鼠近视动物模型巩膜 COL1 $\alpha$ 2 基因启动子区甲基化状态研究发现,其启动子区甲基化状态未发生变化。本实验对实验性近视动物模型视网膜 Pax6 启动子区 CpG 岛甲基化进行研究并没有发现在近视形成过程中甲基化水平的改变。通过本研究排除了 DNA 甲基化对视网膜 Pax6 基因在近视形成过程中的调控作用,但尚不能排除其他表观遗传(如组蛋白修饰、非编码 RNA 等)调控的可能,因此仍有待进一步研究,为近视形成机制研究提供了新的表观遗传方面的研究方向。

### 参考文献:

- [1] Vitale S, Ellwein L, Cotch MF, et al. Prevalence of refractive error in the United States, 1999-2004[J]. *Arch Ophthalmol*, 2008, 126(8):1111-1119.
- [2] Wojciechowski R. Nature and nurture: the complex genetics of myopia and refractive error[J]. *Clin Genet*, 2011, 79(4):301-320.
- [3] Goldschmidt E, Jacobsen N. Genetic and environmental effects on myopia development and progression[J]. *Eye (Lond)*, 2014, 28(2):126-133.
- [4] Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK. Epigenetics, plasticity, and evolution; How do we link epigenetic change to phenotype? [J]. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2014, 322(4):208-220.
- [5] Zhou X, Ji F, An J, et al. Experimental murine myopia induces collagen type I $\alpha$ 1 (COL1A1) DNA methylation and altered COL1A1 messenger RNA expression in sclera[J]. *Mol Vis*, 2012, 18:1312-1324.
- [6] He Y, Pan Z, Luo F. A novel PAX6 mutation in Chinese patients with severe congenital aniridia[J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(10):879-883.
- [7] Sonoda S, Isashiki Y, Tabata Y, et al. A novel PAX6 gene mutation (P118R) in a family with congenital nystagmus associated with a variant form of aniridia[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2000, 238(7):552-558.
- [8] Hammond CJ, Andrew T, Mak YT, et al. A susceptibility locus for myopia in the normal population is linked to the PAX6 gene region on chromosome 11: a genomewide scan of dizygotic twins[J]. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(2):294-304.
- [9] Liang CL, Hsi E, Chen KC, et al. A functional polymorphism at 3' UTR of the PAX6 gene may confer risk for extreme myopia in the Chinese[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6):3500-3505.
- [10] Han W, Leung KH, Fung WY, et al. Association of PAX6 polymorphisms with high myopia in Han Chinese nuclear families[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(1):47-56.
- [11] Simpson CL, Hysi P, Bhattacharya SS, et al. The Roles of PAX6 and SOX2 in myopia: Lessons from the 1958 British Birth Cohort[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(10):4421-4425.
- [12] Bhat SP, Rayner SA, Chau SC, et al. Pax-6 expression in posthatch chick retina during and recovery from form-deprivation myopia[J]. *Dev Neurosci*, 2004, 26(5-6):328-335.
- [13] Zhong XW, Ge J, Deng WG, et al. Expression of pax-6 in rhesus monkey of optical defocus induced myopia and form deprivation myopia[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(5):722-726.
- [14] Schaeffel F, Burkhardt E, Howland HC, et al. Measurement of refractive state and deprivation myopia in two strains of mice[J]. *Optom Vis Sci*, 2004, 81(2):99-110.
- [15] Zhou X, Xie J, Shen M, et al. Biometric measurement of the mouse eye using optical coherence tomography with focal plane advancement[J]. *Vision Res*, 2008, 48(9):1137-1143.
- [16] Wallman J, Winawer J. Homeostasis of eye growth and the question of myopia[J]. *Neuron*, 2004, 43(4):447-468.
- [17] Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region[J]. *Cell*, 1991, 67(6):1059-1074.
- [18] Rath MF, Bailey MJ, Kim JS, et al. Developmental and daily expression of the Pax4 and Pax6 homeobox genes in the rat retina: localization of Pax4 in photoreceptor cells[J]. *J Neurochem*, 2009, 108(1):285-294.
- [19] Stanescu D, Iseli HP, Schwerdtfeger K, et al. Continuous expression of the homeobox gene Pax6 in the ageing human retina[J]. *Eye (Lond)*, 2007, 21(1):90-93.
- [20] Morgan IG, Ashby RS, Nickla DL. Form deprivation and lens-induced myopia; are they different? [J]. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2013, 33(3):355-361.
- [21] Barathi VA, Boopathi VG, Yap EP, et al. Two models of experimental myopia in the mouse[J]. *Vision Res*, 2008, 48(7):904-916.
- [22] 纪风涛, 李冀, 祝银玲, 等. C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视动物模型的建立[J]. *中华眼科杂志*, 2009, 45(11):1020-1026.
- [23] 矫诗明, 郑帆, 应黄芳, 等. C57BL/6 小鼠形觉剥夺性近视巩膜 COL1 $\alpha$ 2 启动子区域 CpG 岛甲基化水平[J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2014, 16(6):324-327.

(收稿日期:2015-01-23)

(本文编辑:季魏红)