

小鼠 TGFBI 基因真核表达载体的构建和表达

牛静宜 陈鹏 王晔 谢立信 王宜强

Construction and expression of eukaryotic expression vector of mouse TGFBI gene

Niu Jingyi, Chen Peng, Wang Ye, Xie Lixin, Wang Yiqiang. Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Abstract Objective It has been recognized that the mutation of over 30 types of transforming growth factor beta-induced gene (TGFBI) can induce corneal dystrophy, but its molecular mechanism is below understood. The goal of this study was to construct and express mouse TGFBI in eukaryotic expression vector for the further study on the effect of TGFBI in corneal biology and the pathogenesis of corneal dystrophy. **Methods** The eyeball from 5-week-old BALB/cBy mouse was utilized in this experiment. TGFBI cDNA was obtained by reverse transcription-PCR from total RNA extracted from mouse corneas and cloned into pcDNA3.1 vector. Recombinant plasmids were identified by restrictive digestion and direct sequencing. Different doses of pcDNA3.1-TGFBI plasmids were applied for transfection of cultured NIH3T3 cells. NIH3T3 mRNA and protein were harvested from transfected cells for real-time PCR (RT-PCR) analysis and Western blot assay respectively. **Results** Restriction digestion and sequencing indicated that TGFBI cDNA fragment was successfully inserted into the vector. Transfection of recombinant pcDNA3.1-TGFBI into NIH3T3 cells resulted in effective expression of TGFBI (about 90%), showing the green fluorescence under the fluorescence microscope. TGFBI mRNA from transfected pcDNA3.1-TGFBI cells was obviously increased by RT-PCR and TGFBI protein level followed the same pattern by Western blot. **Conclusion** Recombinant eukaryotic expression vector harboring murine TGFBI cDNA is obtained and efficiently expressed in NIH3T3 cells. The construction might be applied in studying the function and role of TGFBI in pathogenesis of corneal dystrophy.

Key words transforming growth factor beta-induced gene; eukaryotic expression vector; corneal dystrophy

摘要 目的 构建小鼠 TGFBI 基因的真核表达载体,为研究角膜营养不良的发病机制奠定基础。**方法** 提取 BALB/cBy 小鼠正常角膜组织总 RNA,经反转录-PCR 合成 TGFBI cDNA,克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 并测序验证。用不同剂量重组质粒 pcDNA3.1-TGFBI 转染 NIH3T3 细胞,通过 SYBR 荧光实时定量 PCR 和 Western blot 检测 TGFBI 在细胞中的表达。**结果** 测序结果显示扩增到的 TGFBI cDNA 以正确序列和方式插入载体,实时定量 PCR 和 Western blot 结果显示 TGFBI 在 NIH3T3 细胞中表达增强。**结论** 成功构建了小鼠 TGFBI 基因真核表达载体,并在细胞中进行表达,为进一步研究 TGFBI 在角膜内的生理、病理功能奠定基础。

关键词 TGFBI; 构建; 真核表达载体; 角膜营养不良

分类号 R 772 Q 812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0161-05

TGFBI (transforming growth factor beta-induced gene) 又称 BIGH3 基因,由 Skonier 等^[1]在培养的用 TGF- β 处理的人肺腺癌细胞系 A549 中发现,并得到其 cDNA 序列,TGFBI 的蛋白产物(也可称为 β igh3)为

细胞外基质蛋白,表达于人类许多重要组织中,说明其可能参与多种机体活动。其中最受关注的是 TGFBI 基因突变与角膜营养不良的关系,目前已知 TGFBI 的 30 余种突变均可引起不同的角膜营养不良^[2],但具体的分子机制尚不明确。TGFBI 基因突变导致的细胞信号传导通路的异常激活是近年来研究的热点。为研究 TGFBI 在角膜中的生理、病理作用,本实验构建了表达小鼠 TGFBI 的真核载体,并在哺乳动物细胞进行了表达,为进一步揭示 TGFBI 在角膜生理和病理过程中的

本课题为国家自然科学基金(30630476)、973 前期研究专项基金(2007CB516705)资助

作者单位:266071 青岛,山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地

通讯作者:王宜强 (Email: yiqiang_wang@126.com)

分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种与细胞 大肠杆菌 DH5 α (北京天根生化科技有限公司); 真核表达载体 pcDNA3.1 (浙江大学生命研究所王春霞博士惠赠); NIH3T3 细胞为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 2 \times Pfu PCR MasterMix、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (普通离心柱型)、RealMasterMix (SYBR Green) (北京天根生化科技有限公司); BamHI、XhoI、DL2000、DNA Ligation Kit (Mighty Mix) (大连宝生物工程有限公司); AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (加拿大 Bio Basic 公司); Effectance Transfection Reagent (德国 Qiagen 公司); Macherey-Nagel NucleoSpin RNA II (美国 MN 公司); DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 抗小鼠 TGFBI 的单克隆抗体 (美国 R&D Systems 公司); 质粒小量快速提取试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限责任公司); 羊抗鼠 HRP-IgG 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); BCA Protein Assay Reagent、ECL Western Blotting Substrate (美国 Pierce 公司); 引物合成及测序 (大连宝生物工程有限公司)。

1.1.3 主要仪器设备 Mastercycler PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); G-BOX Chemi XT16 自动凝胶图像分析仪 (美国 Syngene 公司); CO₂ 气体培养箱 (德国 Heraeus 公司); The Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (美国 Applied Biosystems 公司); Nikon TE 2000-U Microscope (日本 Nikon 公司)。

1.1.4 引物 根据 GENE BANK 公布的小鼠 TGFBI 基因序列, 分别设计引物。FW: 5'-CGCGGATCCATGGCGCTCTCATGCGACTGC-3' 和 RW: 5'-CCGCTCGAGAACTGGCGGAAGCTGCTGCAG-3'。用以从角膜 cDNA 中克隆表达片段, 并以 BamHI 和 XhoI 位点连入真核表达载体 pcDNA3.1。用于重组 TGFBI 表达的实时定量 PCR 检测的引物序列分别为 FW: 5'-GCTGTATACAGACCGCACAGAA-3' 和 RW: 5'-GCAGGCAAGGAAGACCAGG-3'。GAPDH 作为内参, 引物序列为: FW: 5'-CTGCCAGAACATCATCCCT-3', RW: 5'-GGTCTCAGTGTAGCCCAAGA-3'。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成 脱臼处死健康 5 周龄 BALB/cBy 小鼠, 摘除眼球, 完整取下角膜, 放入含 350 μ L RA1 裂解液的微量离心管中, 匀浆器磨

碎, 按 MN NucleoSpin RNA II (10 preps) 步骤提取小鼠角膜总 RNA, 按照 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将 1 μ g 总 RNA 在 20 μ L 体系中反转录为 cDNA。

1.2.2 PCR 合成 TGFBI 以上述总 cDNA 为模板, FW 和 RW 为引物, PCR 合成 TGFBI。20 μ L 体系: cDNA 模板 0.8 μ L, FW 和 RW (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, 2 \times Pfu PCR MasterMix 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳并切胶纯化回收。

1.2.3 构建重组真核表达载体及测序 将 TGFBI 胶回收产物与载体 pcDNA3.1 分别进行双酶切, 酶切体系 40 μ L: 目的片段 20 μ L, BamHI 和 XhoI 各 2 μ L, 10 \times K buffer 4 μ L, ddH₂O 12 μ L。37 $^{\circ}$ C 5 h 后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳并切胶纯化回收。15 μ L 体系进行连接反应: TGFBI 酶切后胶回收产物与载体 pcDNA3.1 共 7.5 μ L (摩尔比 3:1), TAKARA ligation mix 7.5 μ L。16 $^{\circ}$ C 30 min 后, 取连接产物 10 μ L 转化 100 μ L 大肠杆菌感受态 DH5 α , 在含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上涂板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12 ~ 16 h 后, 挑取单克隆菌落, 提取质粒, 进行菌落 PCR 和 BamHI、XhoI 双酶切鉴定。将疑似阳性重组克隆送大连宝生物工程有限公司测序验证。测序确认后, 大量扩增和制备重组质粒, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.4 重组表达载体转染 NIH3T3 细胞 用 DMEM + 10% FCS 常规方法培养 NIH3T3 细胞, 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化细胞并传代至 6 孔板中, 在细胞铺满 80% 左右准备转染, 转染前日细胞换液, 转染前用 PBS 洗细胞, 每孔加入 1 600 μ L 新鲜 DMEM + 10% FCS 培养液。根据说明书推荐方法和各试剂比例 (即 0.4 μ g 质粒, 100 μ L EC buffer, 加入 3.2 μ L enhancer 混匀静置 5 min, 再加入 10 μ L effectance, 混匀静置 10 min 后, 加入 600 μ L DMEM + 10% FCS 培养液, 混匀后加入培养孔中), 分别设置低、中、高 3 个组, 所用重组质粒量分别为 0.4、0.7、1.0 μ g。同时设置未转染阴性对照、空质粒 pcDNA3.1 转染对照和 pGFP-C2 阳性对照组, 其中后者用以判断转染过程有效性。7 h 后换为正常新鲜 DMEM + 10% FCS 培养液, 48 h 后激光共聚焦显微镜观察转染 pGFP-C2 后绿色荧光蛋白的表达情况, 并用实时定量 PCR 或 Western blot 检测 TGFBI 表达情况。

1.2.5 SYBR 荧光实时定量 PCR 检测转染后 TGFBI 基因的表达水平 转染后 48 h, 提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA。用 SYBR 荧光法和特异性引物检测

TGFBI 表达情况,并以 GAPDH 作为内参。按以下 20 μ L 反应体系进行:cDNA 模板 0.5 μ L,引物 FW、RW 各 0.25 μ L,dd H₂O 11 μ L, 20 \times SYBR + 2.5 \times Mastermix (125 μ L 20 \times SYBR 与 1.0 mL 2.5 \times Mastermix 混合) 8 μ L。每个样本设 3 个复孔。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预解链 10 min,之后以 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 1 min 执行 40 个循环。反应完成后根据 Ct 值比较目的基因的相对表达量。

1.2.6 Western blot 检测转染后 TGFBI 蛋白的表达
不同量质粒转染 NIH3T3 细胞后 48 h,吸弃培养液加入 4 \times 蛋白上样缓冲液刮取细胞,超声破碎,总蛋白含量按 BCA 法测定。每泳道加总蛋白 50 μ g,进行 8% SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上,加抗小鼠 TGFBI 单克隆抗体(工作浓度 1:100)进行杂交,4 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,加入羊抗鼠 HRP-IgG(工作浓度 1:3 000)二抗孵育 1 h 后,进行 ECL 显色,所有信号在 G:BOX Chemi XT16 图像分析系统进行扫描定量。

2 结果

2.1 TGFBI 基因克隆及载体构建

应用 RT-PCR 合成 TGFBI cDNA 片段,产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,在 2 100 bp 可见清晰条带。将 TGFBI cDNA 和 pDNA3.1 载体质粒经双酶切后连接、转化,挑选克隆并提取质粒后进行 BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳显示,pcDNA3.1-TGFBI 阳性克隆可见目的片段和载体片段(图 1)。采用位于载体的引物序列对阳性克隆进行双向测序,综合后获得阳性克隆的全长序列,与 NCBI 基因文库中 TGFBI 序列(NM_009369)比对显示,克隆入的 TGFBI 基因序列、与载体的连接方式以及读码框完全正确(图 2)。

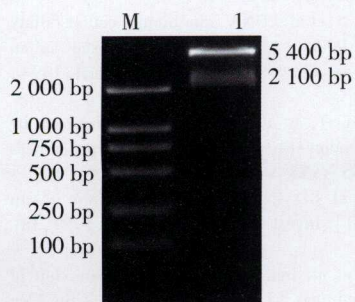


图 1 pcDNA3.1-TGFBI 的酶切鉴定 M:DNA 分子量标准 DL 2 000 1:重组质粒酶切产物
Fig.1 Restrictive endonuclease digestion of recombinant plamid
M:DNA marker DL 2 000 Lane 1: product of recombinant plasmid by restriction enzyme

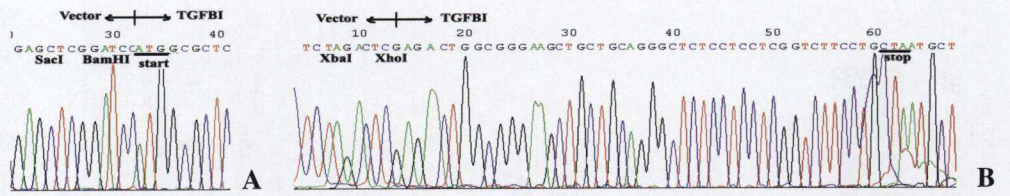


图 2 克隆的 TGFBI 的测序结果(仅显示 TGFBI 基因与载体连接部位测序结果,基因其他部分省略)
A:克隆 TGFBI 的测序起始端 B:克隆 TGFBI 的测序终止端
Fig.2 Sequence analysis results of cloned TGFBI (Only the cloning site regions are shown) A:the beginning region of cloned TGFBI B:the stop region of cloned TGFBI

2.2 pGFP-C2 转染 NIH3T3 的效果

阳性对照组转染后 48 h,在激光共聚焦显微镜下可见细胞内有绿色荧光表达,计算荧光显微镜下绿色成像细胞数量与普通光镜下的细胞数量,可知转染效率约为 90%(图 3),提示拟用于 TGFBI 基因转染的体系有效、可靠。

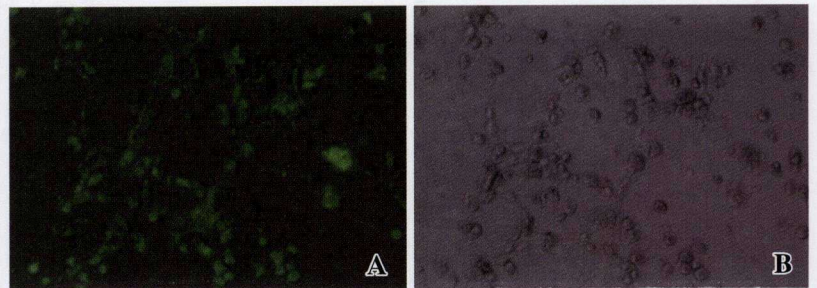


图 3 pGFP-C2 转染 NIH3T3 细胞 48 h 后出现绿色荧光($\times 100$) A:光镜下 pGFP-C2 转染后 NIH3T3 细胞的形态 B:荧光显微镜下 pGFP-C2 转染后 NIH3T3 细胞的形态
Fig.3 Green fluorescence in NIH3T3 cells 48 hours after transfection with pGFP-C2 transfected recombinant A:The NIH3T3 cells 48 hours after transfection with pGFP-C2 transfected recombinant under the light microscope($\times 100$) B:The NIH3T3 cells 48 hours after transfection with pGFP-C2 transfected recombinant under the fluorescence microscope($\times 100$)

2.3 SYBR 荧光实时定量 PCR 检测结果

将阴性对照中 TGFBI/GDPDH 的信号比设为 1,获得转染后 TGFBI 表达的相对强度。可见转染 pcDNA3.1-TGFBI 的细胞内 TGFBI 的 mRNA 明显增加(图 4)。

2.4 Western blot 检测 TGFBI 蛋白结果

阴性对照及转染空质粒 pcDNA3.1 的 NIH3T3 细胞内有 TGFBI 的微弱表达,为 NIH3T3 细胞的内源性表达。转染 pcDNA3.1-TGFBI 后 NIH3T3 细胞的 β ig-h3 表达明显增强(图 5)。

3 讨论

本实验通过基因克隆完成了小鼠 TGFBI 基因的真核表达载体的构建,经转染 NIH3T3 细胞实验证明

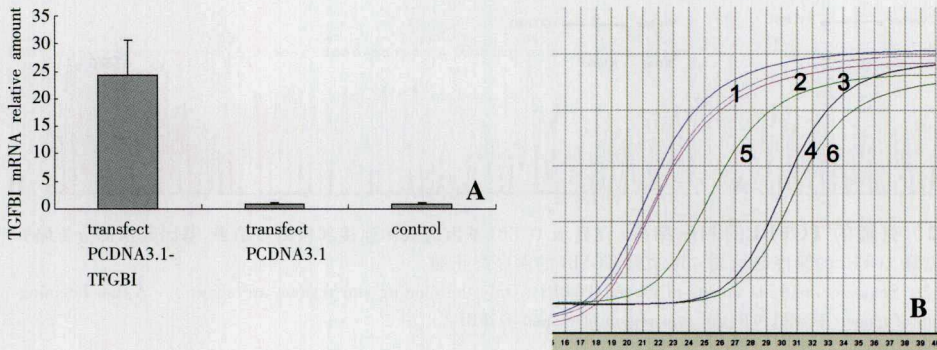


图 4 SYBR 荧光实时定量检测 TGFBI 的 mRNA 的相对量 A: 每组 3 个复孔的平均值 B: TGFBI/GAPDH 的动态扩增曲线 1,4: 阴性对照细胞样本中 GAPDH 和 TGFBI 扩增动力曲线 2,5: 转染 pCDNA3.1-TGFBI 的细胞样本中 GAPDH 和 TGFBI 扩增动力曲线 3,6: 转染空质粒 pCDNA3.1 的细胞样本中 GAPDH 和 TGFBI 扩增动力曲线
 Fig. 4 Dection of TGFBI mRNA by SYBR PCR method (A) and dynamic curve of TGFBI/GAPDH amplification(B) 1,4: GAPDH and TGFBI amplification dynamic curve of negative control cells 2,5: GAPDH and TGFBI amplification dynamic curve of pcDNA3.1-TGFBI transfected cells 3,6: GAPDH and TGFBI amplification dynamic curve of pcDNA3.1-transfected cells

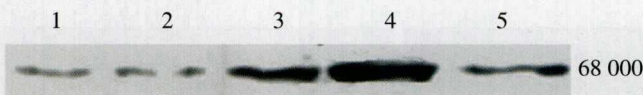


图 5 Western blot 鉴定结果 1: NIH3T3 阴性对照 2: 转染空质粒 pcDNA3.1 3: 转染 0.4 μg pcDNA3.1-TGFBI 4: 转染 0.7 μg pcDNA3.1-TGFBI 5: 转染 1.0 μg pcDNA3.1-TGFBI
 Fig. 5 Western blot of TGFBI protein in NIH3T3 cells 1: NIH3T3 control 2: pcDNA3.1-transfection 3: transfection with 0.4 μg pcDNA3.1-TGFBI 4: transfection with 0.7 μg pcDNA3.1-TGFBI 5: transfection with 1.0 μg pcDNA3.1-TGFBI

TGFBI 的 mRNA 和蛋白水平均明显上升,提示该重组载体可以在细胞内对 TGFBI cDNA 进行有效表达。重组质粒 pcDNA3.1-TGFBI 转染 3T3 细胞的过程中发现转染后的 3T3 细胞略变圆,并且随着转染剂量的增加 NIH3T3 细胞形态变化更加明显,提示转染过程或 TGFBI 基因表达产物对细胞的生长状态有影响。Western blot 检测 TGFBI 蛋白表达发现:转染 0.7 μg pcDNA3.1-TGFBI 时的 TGFBI 表达最强,继续增加到 1.0 μg TGFBI 的表达反而减少,也旁证这一推测。

TGFBI 在机体其他部位的功能主要体现在构成细胞外基质成分。尽管大量的流行病学和遗传学证据表明 TGFBI 的突变是角膜营养不良的主要原因,但 TGFBI 突变仅导致这些患者的角膜异常而其他组织、器官均无异常表现的原因仍不清楚^[3-9]。因此,了解 TGFBI 在不同部位的功能异同是研究这些问题的关键。在眼病方面,目前仅知道 TGFBI 定位于角膜上皮和基质,尚不明确 TGFBI 基因在正常角膜中的生理作用^[10]。免疫组织化学实验表明在所有 TGFBI 突变相关的角膜营养不良的病理沉积物中均明显着色。还有报道称 TGFBI 不仅表达于正常的角膜组织而且还存

在于创伤愈合期的角膜组织中^[11-13],在角膜瘢痕形成过程中也可以检测到正常 TGFBI 的高水平表达^[14],分析认为 TGFBI 可能是 TGF-β 参与角膜混浊机制或调节角膜愈合过程的途径之一^[15]。

本研究构建的小鼠 TGFBI 真核表达载体为研究该基因的产物如何行使其正常生理功能及各种病理情况下的结构和功能变化奠定基础,也将帮助探讨角膜透明性的基础及 TGFBI 基因异常导致角膜病理性产物积累的分子机制。

参考文献

- 1 Skonier J, Neubauer M, Madisen L, et al. cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor-beta [J]. *DNA Cell Biol*, 1992, 11(7): 511 - 522
- 2 Kannabiran C, Klintworth GK. TGFBI gene mutations in corneal dystrophies [J]. *Hum Mutat*, 2006, 27(7): 615 - 625
- 3 Kim JE, Han MS, Bae YC, et al. Anterior segment dysgenesis after overexpression of transforming growth factor-beta-induced gene, beta igh3, in the mouse eye [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 1942 - 1952
- 4 Karring H, Valnickova Z, Thøgersen IB, et al. Evidence against a blood derived origin for transforming growth factor beta induced protein in corneal disorders caused by mutations in the TGFBI gene [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 997 - 1004
- 5 Korvatska E, Munier FL, Chaubert P, et al. On the role of kerato-epithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(10): 2213 - 2219
- 6 Stix B, Leber M, Bingemer P, et al. Hereditary lattice corneal dystrophy is associated with corneal amyloid deposits enclosing C-terminal fragments of keratopithelin [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(4): 1133 - 1139
- 7 Korvatska E, Henry H, Mashima Y, et al. Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato-epithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 11465 - 11469
- 8 El Kochairi I, Letovanec I, Uffer S, et al. Systemic investigation of keratopithelin deposits in TGFBI/BIGH3-related corneal dystrophy [J]. *Mol Vis*, 2006, 12: 461 - 466
- 9 Morand S, Buchillier V, Maurer F, et al. Induction of apoptosis in human corneal and HeLa cells by mutated BIGH3 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(7): 2973 - 2979
- 10 Ferguson JW, Mikesch MF, Wheeler EF, et al. Developmental expression patterns of Beta-ig (betaIG-H3) and its function as a cell adhesion protein [J]. *Mech Dev*, 2003, 120: 851 - 864
- 11 Escribano J, Hernando N, Ghosh S, et al. cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to beta-igh3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium [J]. *Cell Physiol*, 1994, 160: 511 - 521
- 12 Hirano K, Klintworth GK, Zhan Q, et al. Betaigh3 is synthesized by corneal epithelium and perhaps endothelium in Fuchs' dystrophic corneas [J]. *Curr Eye Res*, 1996, 15: 965 - 972
- 13 Rawe IM, Zhan Q, Burrows R, et al. Beta-ig: Molecular cloning and in situ hybridization in corneal tissues [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38: 893 - 900
- 14 Takacs L, Csutak A, Balazs E, et al. Immunohistochemical detection of betaIG-H3 in scarring human corneas [J]. *Graefes Arch Clin Exp*

Ophthalmol, 1999, 237: 529 - 534

15 Saika S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target[J]. Cornea, 2004, 23: S25 - 30

(收稿:2008-09-23 修回:2008-12-01)

(本文编辑:刘艳)

· 技术方法 ·

虚拟现实手术模拟仪在白内障手术培训中的运用

吴敏 胡竹林 和 丹

我院与国际奥比斯合作于 2007 年 7~8 月首次将虚拟现实眼科手术模拟仪(EYESI Surgical simulator)运用到白内障手术培训中,结果报告如下。

1 对象与方法

学员均来自基层医院眼科,男 5 名,女 4 名;曾参加过常规的白内障手术培训 1~2 年,均独立完成过 10~4 000 例白内障手术,具有其他显微手术经验。培训为期 1 个月,包括眼科理论培训、手术模拟仪 EYESI(图 1)练习和动物眼实验。将学员分为 A 组(独立完成白内障手术例数 ≤ 300 者)5 人和 B 组(独立完成白内障手术例数 > 300 者)4 人。采用问卷调查、结业操作考核和专题小组访谈 3 种方式进行总结。问卷调查着重于基本信息、培训经历、显微手术经验和白内障手术技巧等;结业操作考核包括模拟仪和动物眼实验(小切口白内障操作)。专题小组访谈调查员根据事先拟定的访谈提纲,组织学员集中讨论手术模拟仪的练习感受、手术模拟仪培训的优缺点和改进建议。

2 结果

2.1 操作考核 模拟仪考核前房操作和撕囊得分为 77~99 分,平均 94.5 分;超声乳化部分得分为 80~98 分,平均 89.4 分。动物眼实验得分为 90~92 分,平均 90.4 分。

2.2 专题小组访谈 所有学员均认为利用模拟机进行的综合培训优于传统培训方式,A 组学员认为本次培训使显微操作的熟练程度明显提高,手术操作更加规范;B 组学员认为培训使自己有了更好的防范手术并发症发生的意识,手术操作更加精细化。学员认为手术模拟仪的优点包括:(1)具有良好的仿真度,利于训练手眼脚配合,对内眼手术产生直观体验;(2)可以循序渐进和反复练习,减少了直接在动物眼操作产生的浪费和在人眼手术产生的风险;(3)仪器的实时提醒功能(例如:接触角膜内皮

和虹膜的提示、超声能量泄露等)有利于避免并发症的发生,培养手术创伤最小化的意识;自带的评分系统可以精确量化手术操作的优劣,利于学员自我练习和改进;(4)可进行前后节手术的练习、扩展知识面;(5)练习时无紧张感,有助于克服心理障碍。缺点包括:(1)尚不能模拟手术全过程;(2)撕囊模

拟;(3)操作界面为全英文,基层眼科医师需借助翻译;(4)仿真度不足以替代人眼,操作所需力度不同。改进建议:(1)进一步完善手术模拟仪的程序,实现完整手术模拟;(2)侧重考虑对手法小切口白内障手术的模拟;(3)将操作界面汉化。

3 讨论

虚拟现实技术目前在航空模拟训练、医学领域等方面都得到了运用^[1]。虚拟手术是利用各种医学影像数据,采用虚拟现实技术,在计算机中建立一个虚拟环境,创造一个极具真实感和浸润感的训练环境^[2]。虚拟手术培训的优点在于可以使受训者观察高分辨率三维图像,使术者感觉像在人体上手术,可重复练习、节约成本、规避风险和实现实时更新^[3-7]。

由于动物眼无法复制人类特有疾病的特征参数,且解剖结构和组织强度与人体有相当的差距,眼科显微手术的能力培养目前不能完全通过动物实验实现。近年来,国外不断研发和运用手术模拟系统,取得了良好的效果,然而由于价格昂贵这些系统尚未在我国投入使用^[5]。本研究采用的 EYESI 系统是一种内眼手术模拟仪,其先进的计算机技术的运用可使眼科医师获得亲临内眼手术的感觉,显示屏可以实时播放练习过程和练习结束后操作的各项指标评分。本研究对受模拟仪培训的学员进行问卷调查、操作考核和专题小组访谈法以了解该手术模拟系统的实用价值。结果表明学员均认为这种新颖的培训方式更灵活和个性化,使自己的显微手术操作能力和白内障手术技巧得到了很大提高;对前后节手术产生了直观体验,这是其他培训方式所达不到的^[8]。但该模拟仪系统目前还不足以替代动物眼实验和带教老师的作用。

(志谢:感谢国际奥比斯中国代表处昆明办公室和云南省第二人民医院眼科全体工作人员对本次培训的大力支持。)

参考文献

- 1 谭珂,郭光友,王勇军,等.虚拟现实技术在医学手术仿真训练中的应用[J].军医进修学院学报,2002,23(1):77-79
- 2 Hohne KH, Pflesser B, Pommert A, et al. A virtual body model for surgical education and rehearsal [J]. IEEE Comput, 1996, 29(1):25-31
- 3 尹毅东.谈医学虚拟手术的运用[J].中国医学教育技术,2002,16(6):355-357
- 4 韩泉洪,惠延年,杜红俊.虚拟现实在现代眼科手术继续教育中的运用[J].西北医学教育,2002,10(9):143-144
- 5 梁莉,魏锐利,汤智.虚拟现实在眼科教育中的运用[J].中国高等医学教育,2005,5:86-87
- 6 左玲燕,杨鹏.虚拟现实技术在医学上的运用[J].医学信息学,2002,15(5):260-261
- 7 李辉.计算机辅助外科的现状和前景[J].中华外科杂志,2004,42(6):698-699
- 8 Verma D, Wills D, Verma M. Virtual reality simulator for vitreoretinal surgery[J]. Eye, 2003, 17(1):71-73



图 1 眼科手术模拟仪 EYESI 拟与手法小切口白内障手术有差