与声束夹角的调节、操作者探头对观察部位加压、彩色血流取样的熟练程度、患者体型胖瘦以及配合程度均可直接影响到肿物内部及周边血流的显示和频谱多普勒的记录。提示我们在操作时应对以上因素加以关注。

综上所述，肿物的边缘、内部回声、点状钙化、后方声衰减以及淋巴结形态，彩色多普勒技术提供的肿物及淋巴结内部血流丰富程度的非定量指标和血流动力学的定量指标对乳癌及其转移淋巴结的诊断有重要的意义。

关键词：乳癌；转移淋巴结；二维声像图；彩色多普勒血流
中图法分类号：R730.41；R737.9 文献标识码：B

参考文献：

[1] Alder D D, Carson P L, Robin J M, *et al*. Doppler ultrasound color flow imaging in the study of breast cancer: Preliminary findings[J]. Ultrasound Med Biol, 1990, 16(6): 553—559.

[2] 李建初，袁光华，柳文仪. 血管和浅表器官彩色多普勒超声诊断学[M]. 北京：中国医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1999. 345—347, 381.

[3] Lister D, Evans A J, Burrell H C, *et al*. The accuracy of breast ultrasound in the evaluation of clinically begin discrete, symptomatic breast lumps[J]. Clin Radiol, 1998, 53(7): 490—492.

[4] 沈 理，方 超. 小乳癌的彩色多普勒超声诊断[J]. 中国医学影像技术，1997, 13(5): 447—449.

[5] Duenne A A, Wemer J A. Functional anatomy of lymphatic vessels under the aspect of tumer invasion[J]. Recent Results Cancer Res, 2000, 157: 82—89.

（编辑 陈聪连）

经验交流

文章编号：1000-5404(2003)10-0928-01

人小肠粘膜防御素-5 cDNA的克隆与序列分析

The cDNA cloning and sequencing analysis of human defensin-5 from human small intestinal mucosa

李广阔，粟永萍，刘晓宏，艾国平，王军平，程天民 （第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所，重庆 400038）

小肠粘膜Paneth细胞合成、分泌的天然抗菌物质防御素-5（HD-5），因具有独特的杀菌/抑菌作用而颇受国内外学者关注。我们采用RT-PCR方法，从人回肠粘膜中获得了HD-5编码序列HD-5 cDNA，并进行了克隆和测序分析，为重组防御素5（rHD-5）的高效表达奠定了基础[1]。

1 材料与方法

低温无菌条件下，自右半结肠癌根治性切除患者的回肠末端剥离粘膜组织，置液氮中保存备用。根据Jones等[1]的经验，合成上游引物：5′-ACCGGATCCATGA GGACCATCGCCATCCT TG-3′（31 bp），下游引物：5′-GCGGAATTCTTAGCG ACAGCAGAGTCTG-TAG-3′（31 bp），分别引入*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ酶切位点。

按照RNA提取试剂盒（TaKaRa）和PolyA tractR mRNA分离试剂盒（Promega）的说明进行回肠粘膜总RNA提取和mRNA的分离，并进行RT-PCR反应，反应体系：5.0μl 10× 反转录缓冲液，10.0μl 25mmol/L $MgCl_2$，5.0μl 10.0 mmol/L dNTP，1.0μl RNA酶抑制剂，1.0μl AMV反转录酶（2× 10^8 U/L），2.0μl引物P1，2.0μl引物P2，Taq酶1.0μl，mRNA 2.0μl（1.0μg），最后加超纯水至50μl。反应条件：50 ℃ 30 min，94℃ 2 min；94 ℃变性30 s，58 ℃复性30 s，68 ℃延伸45 s；35循环后，68 ℃延伸7 min。反应产物通过低熔点凝胶电泳后回收HD-5 cDNA片段，用*Bam*HⅠ和*Eco*RⅠ进行双酶切，常规方法重组入pcDNA3.1（+）中，酶切鉴定正确的质粒送TaKaRa公司测序。

2 结果

所获得的HD-5 cDNA序列大小约300 bp，与预期片段长度303 bp（包括酶切位点12 bp，保护性碱基6 bp，终止子3 bp，目的片段282 bp）相一致；该片段经双酶切后插入质粒pcDNA3.1（+）中。重组质粒经测序证实，插入片段的序列与预期完全一致，长度为291 bp（包括酶切位点6 bp，终止子3 bp，目的片段282 bp），其序列与GenBank中的HD-5序列完全相同。

3 讨论

粘膜是病原微生物侵袭机体的主要门户，大约95%以上的急危重症患者的继发性感染与粘膜防御功能低下所致的肠源性感染有关[2]。临床上使用广谱抗生素治疗后常导致耐药和菌群失调，尤其菌体崩解释放的内毒素还会导致严重的内毒素血症，加重业已存在的全身损害，因此，最理想的物质当属既能杀菌、又能阻止内毒素入血的HD-5[3,4]。HD-5是Paneth细胞分泌的内源性天然杀菌物质，与其分泌的其他抗菌物质（防御素-6、溶菌酶、磷脂酶A2和乳铁蛋白）一道，共同构筑起小肠粘膜的天然防御屏障[1,5,6]。由于HD-5对革兰阳性菌、革兰阴性

作者简介：李广阔（1968—），男，重庆市梁平县人，博士，主治医师，主要从事重症急性胰腺炎及外科重大疾病肠源性感染的防治方面的研究。电话：(023)68753663

收稿日期：2002-03-29；修回日期：2002-10-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌、霉菌、真菌及包被病毒等、以及一些耐药菌株有强力杀灭作用，且能弥补广谱抗生素治疗的不足而备受重视。

目前国外学者正积极进行 HD-5 的体外重组生产，但尚未见成功的报道；而获得正确的 HD-5 编码序列是进行重组表达的前提。我们通过自行设计的引物，从结肠癌患者根治性切除时切下的回肠粘膜中获得了 mRNA，用 RT-PCR 的方法成功获得了 HD-5 cDNA。通过与 GenBank 的标准序列对比发现，其序列是完全一致的。该序列具有编码信号肽(Met-Arg-Thr-Ile-Ala-Ile-Leu-Ala-Ala-Ile-Leu-Leu-Val-Ala-Leu- Gln-Ala-Gln-Ala-)、前片段(-Glu-Ser-Leu-Gln-Glu-Arg-Ala-Asp-Glu-Ala-Thr-Thr-Gln-Lys-Gln- Ser-Gly-Glu-Asp-Asn-Gln-Asp-Leu-Ala-Ile-Ser-Phe-Ala-Gly-Asn-Gly-Leu-Ser-Ala-Leu-Arg-Thr- Ser-Gly-Ser-Gln-Ala-Arg-)和成熟肽(Ala-Thr-Cys-Tyr-Cys-Arg-Thr-Gly-Arg-Cys-Ala-Thr-Arg- Glu-Ser-Leu-Ser-Gly-Val-Cys-Glu-Ile-Ser-Gly-Arg-Leu-Tyr-Arg-Leu-Cys-Cys-Arg)的碱基序列，其中，决定表达产物功能的 6 个半胱氨酸和 2 个精氨酸残基也处于其保守位置[7]。上述 HD-5 编码序列的成功克隆，为今后运用甲醇酵母高效表达系统生产 rHD-5 奠定了基础。

关键词：防御素-5；克隆
中图法分类号：R394.3 文献标识码：B

参考文献：

[1] Jones D E, Bevins C L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene[J]. J Biol Chem, 1992, 267(32): 3216—3225.
[2] 王 华. 粘膜免疫细胞研究进展[J]. 国外医学免疫学分册, 2000, 23(3): 143—144
[3] Davies J. Bacteria on the rampage[J]. Nature, 1996, 383(6597): 219—220.
[4] Scott M G, Vreugdenhil A C E, Burman W A, *et al*. Cutting Edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein[J]. J Immunol, 2000, 164(1): 549—553
[5] Nissen-Meyer J, Nes I F. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action[J]. Arch Microbiol, 1997, 167(2/3): 67—77.
[6] Selsted M E, Miller S I, Hensehen A H, *et al*. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense[J]. J Cell Biol, 1992, 118(4): 929—936
[7] Zhao C, Wang I, Lehrer R I. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretary glands and epithelial cells[J]. FEBS Letters, 1996, 396(2/3): 319—322.

(编辑 郭建秀)

文章编号：1000-5404(2003)10-0929-01

经验交流

TSRH 内固定系统治疗青少年特发性脊柱侧凸手术配合体会

Experience in the cooperative measure in the treatment of adolescent idiopathic scoliosis with TSRH fixing system

甘晓琴，聂智蓉 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所麻醉科手术室，重庆 400038)

脊柱侧凸是一种由于椎体序列复杂移位而导致的三维脊柱畸形，特发性脊柱侧凸的发病率在中国人群中可达 0.61%～2.4%，它严重危害着青少年的身心健康[1]。1987 年美国德洲斯克瑞特医院(TSRH)研制成功 TSRH 脊柱矫正器械，它具有三维矫形功能，TSRH 系统不仅可用于脊柱侧凸的矫形，还可用于脊柱创伤、脊柱肿瘤及脊柱退行性病变的治疗[2]。我们于 2001～2002 年期间应用 TSRH 系统治疗青少年特发性脊柱侧凸 4 例，效果满意，现将手术配合体会介绍如下。

术前访视：患者术前出现紧张、焦虑等情绪变化，手术室护士术前访视患者尤为重要，护士首先热情介绍自己，建立良好的护患关系，了解病人的病情、手术部位、手术方式、病人的心理准备向病人介绍麻醉方式、配合要求、手术人员的技术及水平及责任心、听取病人的主诉和要求，取得患者的理解和配合，使其以最佳的心理状态接受手术治疗。

术前准备：① 器械准备：骨科常规器械，脊柱手术专用器械，植入部分：TRSH 棒，固定钩(椎板钩及椎弓根钩)，环首螺栓，锁紧螺帽，横向连接钢板以及钢丝。手术操作器械：持钩钳，钩打入器，导钩，瓶塞钻，环首螺栓分离器，扳手(T 形柄及六角形两种)，转矩，撑开钳，加压钳，象鼻钳。② 其他物品准备：麻醉机、监护仪、电刀及双极电凝、吸引器、自体血回收机以及术中所需的各种物品和药品，术前对仪器及所有物品进行全面检查，确保仪器正常，药品、物品完备。③ 麻醉及体位：局麻下建立动、静脉测压装置，颈内静脉置双腔静脉插管，诱导麻醉后行气管插管。置患者于俯卧位，胸部用软枕垫高，髂部垫气圈，腹部悬空，以利于呼吸；头部置于头托上，防止气管导管滑脱，眼部贴眼膜以保护眼睛并避免受压；膝部、踝部分别垫一软枕，四肢摆放舒适，防止受压。铺无菌单及手术膜，暴露手术切口。

主要手术步骤及配合：① 胸廓成形：于胸背部做右侧旁正中切口，显露 3～6 肋，钝性剥离肋骨，保护胸膜，离断 3～6 肋骨约 8 cm，递骨蜡残端心血。检查胸膜有无破损，放置半管引流，逐层缝合切口。② 脊柱矫形：做脊柱后正中切口，递骨刀剥离两侧骶棘肌，备小纱布条压迫止血，显露两侧椎板、关节突及横突，所有需要固定椎体的进钉点均为每一椎体的相同解剖位置，即位于椎体的中央，椎弓根基底部的前方。定位无误后将椎弓根钩、椎弓根钉植入战略椎，将钉钩固定在预弯好的 TRSH

作者简介：甘晓琴(1972—)，女，重庆市江津人，护师，主要从事手术室护理方面的研究，电话：(023)68757347
收稿日期：2002-08-15；修回日期：2003-02-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net