

深圳大学 2011 年硕士研究生入学考试初试试题

(答题必须写在答题纸上, 写在本试题纸上无效)

专业: 生物医学工程 (医学)

考试科目代码: 716 考试科目名称: 医学细胞生物学

一、单项选择题 (每题 2.5 分, 共 100 分):

1、微粒体是下列哪种结构通过离心而获得的?

- A. 微体
- B. 内质网
- C. 高尔基复合体
- D. 细胞核
- E. 细胞膜

2、三羧酸循环发生于线粒体的哪个部位?

- A. 外膜
- B. 内膜
- C. 基质
- D. 膜间腔
- E. 基粒

3、由细胞外信号转换为细胞内信使, 从而使细胞对外界信号做出相应的反应, 这个过程叫?

- A. 信号转导
- B. cAMP
- C. 第二信使
- D. 信号分子

4、细胞周期的长短主要差别在:

- A. G1 期
- B. G2 期
- C. M 期
- D. S 期

三、问答题

要求将下列两段文字翻译成中文（每题 10 分，共 20 分）：

1、Cell biology is an academic discipline that studies cells – their physiological properties, their structure, the organelles they contain, interactions with their environment, their life cycle, division and death.

2、Cancer results from mutations that disrupt the controls regulating normal cell growth. The growth of normal cells is subject to many different types of control which may be lost independently of each other, during the multistep progression to malignancy.

四、用中文解释下列专业名词（每题 5 分，共 40 分；考生可任选其中 8 题给以回答；如回答超过 8 题，只按所回答的前 8 道题给分）：

- 1、内膜系统（Endomembrane system）
- 2、细胞分化（Cell differentiation）
- 3、分子“伴侣”（Molecular chaperones）
- 4、印迹术 Blotting
- 5、rDNA
- 6、细胞骨架（cytoskeleton）：
- 7、核酶（Ribozyme）：
- 8、同源染色体（Homologous chromosomes）
- 9、拟核（nucleoid）
- 10、Cell line
- 11、顺式作用元件（Cis-acting elements）
- 12、半自主性细胞器（Semiautonomous organelle）
- 13、细胞周期同步化（synchronization）

五、简答题（每题 20 分，共 40 分；考生可任选两题予以回答，如回答超过两题，只按照所回答的前两道题给分）：

- 1、遗传密码有哪些基本特性？（本题 20 分）
- 2、内质网分为几类？在形态结构和生理功能上各有何特点？（本题 20 分）

3、何谓第二信使？目前已经发现的最重要的第二信使有哪些？（本题 20 分）

4、根据医学细胞生物学的知识解释矽肺发病的机理。（本题 20 分）

六、论述题（本题 40 分，共 40 分；考生可任选一题予以回答，如回答超过一题，只按所回答的第一道题给分）：

1、比较有丝分裂与减数分裂的异同。（本题 40 分）

2、论述内膜系统中膜相互转化的关系。（本题 40 分）

七、问答题（本题 20 分）：

2008 年 4 月至 5 月发生在安徽阜阳的手足口病流行，其病原已经确定为肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)。EV71 属于小 RNA 病毒科(Picornaradae)肠道病毒属(Enterovirus),为一种单正链 RNA 病毒,病毒核酸含有大约 7411 个核苷酸.病毒颗粒大致呈球形,无包膜和突起,直径 24~30 nm.EV71 病毒的核酸序列已经载入 GenBank。请回答以下问题：

(1) 开发一种分子诊断的技术思路。

(2) 开发针对这种病毒的基因工程重组疫苗的技术思路。

八、问答题：

请仔细阅读所附论文，撰写该论文的中文摘要，总字数不得超过 450 个。

（本题 10 分）

九、问答题：

请阅读以下三篇文献所提供的信息，并回答细胞重编程即 iPS 技术(induced pluripotent stem cells)的主要原理、应用前景以及我国科学家在这一领域所作出的学术贡献（本题 10 分）。

文献 1: Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan.

Abstract

Successful reprogramming of differentiated human somatic cells into a pluripotent state would allow creation of patient- and disease-specific stem cells. We previously reported generation of induced pluripotent stem (iPS) cells, capable of germline transmission, from mouse somatic cells by transduction of four defined transcription factors. Here, we demonstrate the generation of iPS cells from adult human dermal fibroblasts with the same four factors: Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc. Human iPS cells were similar to human embryonic stem (ES) cells in morphology, proliferation, surface antigens, gene expression, epigenetic status of pluripotent cell-specific genes, and telomerase activity. Furthermore, these cells could differentiate into cell types of the three germ layers in vitro and in teratomas. These findings demonstrate that iPS cells can be generated from adult human fibroblasts.

文献 2: Nature. 2009 Sep 3;461(7260):86-90.

iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation.

Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q.

State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.

Abstract

Since the initial description of induced pluripotent stem (iPS) cells created by forced expression of four transcription factors in mouse fibroblasts, the technique has been used to generate embryonic stem(ES)-cell-like pluripotent cells from a variety of cell types in other species, including primates and rat. It has become a popular means to reprogram somatic genomes into an embryonic-like pluripotent state, and a preferred alternative to somatic-cell nuclear transfer and somatic-cell fusion with ES cells. However, iPS cell reprogramming remains slow and inefficient. Notably, no live animals have been

produced by the most stringent tetraploid complementation assay, indicative of a failure to create fully pluripotent cells. Here we report the generation of several iPS cell lines that are capable of generating viable, fertile live-born progeny by tetraploid complementation. These iPS cells maintain a pluripotent potential that is very close to ES cells generated from in vivo or nuclear transfer embryos. We demonstrate the practicality of using iPS cells as useful tools for the characterization of cellular reprogramming and developmental potency, and confirm that iPS cells can attain true pluripotency that is similar to that of ES cells.

文献摘要 3: Cell Stem Cell. 2009 Aug 7;5(2):135-8.

iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos.

Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. Graduate Program, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, China.

组织工程气管临床移植

Clinical transplantation of a tissue-engineered airway

【摘 要】

引 言

由于缺乏有效的治疗方法,大气道缺陷目前仍是困扰临床医生的难题。对于患有严重良性和恶性气管病变的患者,气管切除及原位修复仍是唯一可行的根治措施^[1]。然而气管切除的长度受到限制,在儿童以不超过总长度的30%为宜,成人则不超过6 cm。如果安全、功能化的气管置换得以实施,则气管置换的长度将不再成为难题。自体或人工合成的移植物的既往研究结果令人失望^[2-4]。

生物组织工程已经能为其他器官提供具有一定功能的人体器官替代品^[5-6]。以往临床前期气管移植实验过于冗长繁杂或依赖于非生物基质^[4],在一定程度上限制了临床常规应用^[7]。我们已经用小鼠和猪的模型建立了一个改良的实验方法,将自体上皮细胞和间充质十细胞源性软骨细胞种植于去细胞化的供体气管构架

中,并在一种新型生物反应器系统内生长成熟。已有体外实验培育出了一段较短但有活性的气管基质^[8],同时在动物实验中没有产生针对同种和异种移植物的免疫排斥反应^[9]。在这样的研究背景激励下,本研究旨在将超过6 cm的生物工程气管移植于一例患有终末期气道疾病的患者,并评估该技术的应用价值。

方 法

1 移植受体

30岁女性患者,2004年因结核病灶浸润颈部气管和整个左主支气管而出现发音障碍和咳嗽,CT扫描显示围绕气管全周有一3 cm接近闭塞的气管狭窄段,该狭窄段起自声门下2 cm,伴有左主支气管发育不全与呼气时气管塌陷。在随后的6个月中因分枝杆菌感染给予积极治疗好转,但严重的呼吸困难依然存在。病变段组织学检查显示鳞状上皮化生,无残存感染灶,于是作出

“结核后慢性气管炎并继发重度左主支气管软化”的诊断，随后成功地进行声门下气管切除、端-端吻合，并在左主支气管放置Dumon支架以解除气管狭窄。但患者对支架治疗的耐受性极差，尽管经过多次内镜下冲洗，再次放置支架或复位治疗，仍出现左下肺叶反复发作性肺炎、顽固性咳嗽和黏液淤滞，因此去除支架。2008年3月，患者因严重呼吸困难，无法做简单家务工作而再次入院治疗，通过容积重建CT行仿真气管镜检查（图1A和1B），以确认正常颈部气道，检查可见左主支气管内径显著变小（残存直径4 mm），一处固定性狭窄（距离气管隆凸最多1.2 cm），主动脉压迫致支气管上移，并致完全性呼气性气管塌陷。肺功能检查提示从右至左支气管气体分流，血流灌注尚可，休息时严重缺氧，各项参数提示肺功能严重异常（附表）。由于支气管移位致支气管主干无法顺利切除，故此时常规治疗唯一的方法是左全肺切除。但该方法可导致死亡风险，围手术期和远期发病风险升高。因此，根据以往成功的临床经验，决定完整切除病变左主支气管并用人生物工程气管移植置换，同时考虑到将来的补救需要，该治疗亦不会妨碍随后可能进行的肺切除手术。患者签署了书面知情同意书。

2 移植气管基质的准备

移植用气管段（长7 cm）取自一例死于颅内出血的51岁白人女性（O型血，病毒、梅毒螺旋体及血清β人绒毛膜促性腺激素检测阴性）。去除气管中所有疏松结缔组织，并用含有1%青霉素、1%链霉素和1%两性霉素B的磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗（Sigma, Barcelona, Spain）。基于先前报道^[8]的6周25次循环去细胞方案，进行如下改良：气管组织先于蒸馏水中存放72 h，然后相继置于4%脱氧胆酸钠与含有2000 kU脱氧核糖核酸酶Ⅰ（DNaseⅠ）的1 mmol/L氯化钠溶液中进行孵育（Sigma Chemicals, Barcelona, Spain），每次

循环后均对其细胞成分以及主要组织相容性复合体（MHC）阳性细胞的组织学加以核实。在考虑了定期的组织学切片检查需要后，得到长度为6.5 cm的移植基质，最终可再减少到5 cm以匹配受体气管的缺损部位。

3 移植基质的组织学、免疫组织学、免疫荧光组织学表现

为对每次酶洗涤循环后移植基质中残存的细胞进行定量，选取10个有代表性的5 μm石蜡包埋基质切片标本，用4'-6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）进行染色，并利用荧光显微镜计数其细胞核总数[细胞核平均计数=10⁵/μm²（s）]；同时将相邻的石蜡包埋切片用苏木素-伊红（Merck, Darmstadt, Germany）染色以进行形态学评估；研究采用抗人白细胞抗原（HLA）-DR、HLA-DP、HLA-DQ（BD Biosciences, Oxford, UK）和HLA-ABC（Abcam, Cambridge, UK）的一抗和二抗（Vectastain ABC kit, Vector Laboratories）以及过氧化物酶底物试剂盒（DAB, Vector Laboratories）来检测组织中MHC抗原的表达，其中阴性对照未加入一抗。

术前从移植气管基质的外表面刷取细胞，术后第4天从其腔内刷取细胞，然后通过采用鼠抗人胶原Ⅱ单克隆抗体（Abcam）的三色免疫荧光法来鉴定软骨细胞^[10]，采用抗细胞角蛋白5和8的单克隆抗体（BD Biosciences）来鉴定上皮细胞，并对细胞核DNA进行DAPI染色。

4 受体自体上皮细胞的制备

患者在局麻下经支气管镜从右主支气管黏膜取活检，并经鼻腔镜从右下鼻甲黏膜取活检，样品放置于4℃的PBS缓冲液中，因支气管上皮细胞较鼻细胞更容易种植，故仅将支气管黏膜细胞用于随后的气管移植物细胞种植。

附表 肺功能检测结果

肺功能指标	2007年12月 (术前)	2008年8月 (术后2个月)	2008年9月 (术后3月)
FVC (L)	2.35 (62%)	3.81 (100%)	3.86 (100%)
FEV ₁ (L)	1.75 (55%)	3.17 (100%)	3.25 (100%)
FEV ₁ /FVC	0.74	0.95	0.99
气道阻力	5.57	3.06	3.31
特异性气道传导率	0.058	0.122	0.213

术前FEV₁显著降低，FVC降低幅度较小但仍比较显著。术后气道阻塞完全逆转，气道阻力与气道传导率显著改善。健康成人FVC/FEV₁的参考值为0.75~0.80。气道阻力的单位kPa/(L·s)，特异性气道传导率的单位1/(kPa·s)。FVC=用力肺活量，FEV₁=第1秒用力呼气容积。

活检样品存于含青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 的PBS缓冲液中冰浴运输。处理时先放置于70%乙醇30 s, 然后置于含有5 ml 1%胰蛋白酶 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK), 15 ml PBS缓冲液和800 µl青霉素和链霉素的离心管中, 4°C过夜。24 h后, 样品在37°C下持续加温45 min, 然后用巴斯德玻璃吸管反复用力吹散。胰蛋白酶溶液用含10%胎牛血清 (PAA, Yeovil, UK), 青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 µg/ml) 的培养液 [Dulbecco

改良Eagle培养液 (DMEM), Invitrogen, Paisley, UK] 中和。经重复分离操作后, 将细胞悬液于1000转/min下离心10 min, 所获沉淀用5 ml DMEM培养液重悬于25 cm²培养瓶中, 并置于37°C下5%的CO₂孵箱中孵育2~3 d, 使细胞生长融合。然后将培养液更换为含角化细胞的无血清培养液 (Invitrogen, Paisley, UK), 其中添加有25 µg/ml牛垂体提取物, 0.4 ng/ml重组表皮生长因子和0.03 mmol/L的氯化钙。培养液每5 d更换一次。

受体自体上皮细胞经首次传代培养后离心涂片。

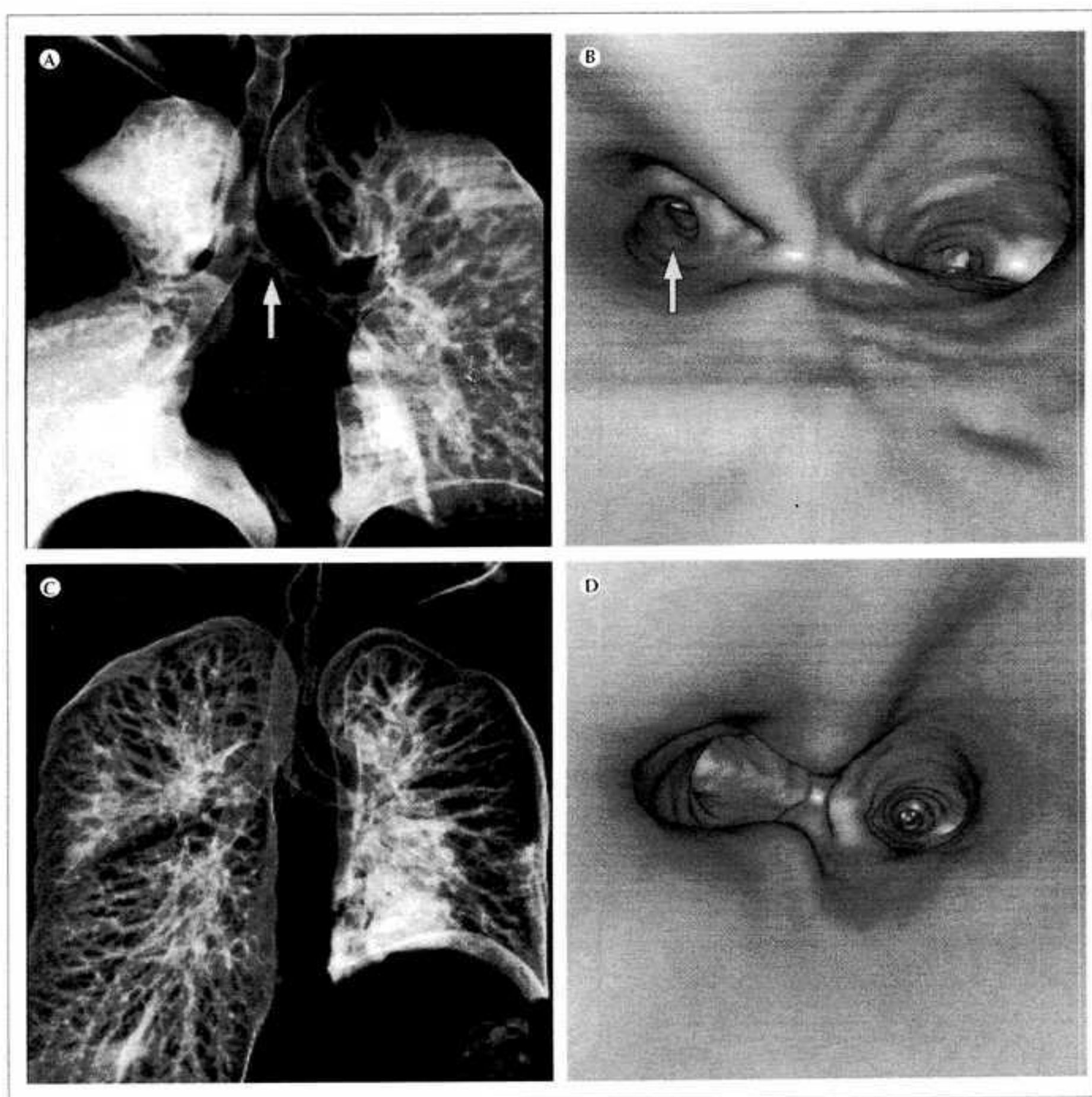


图1 容积重建CT (A和C) 与仿真气管镜检查 (B和D) 分别显示组织工程气管行左主支气管置换术前 (A和B) 和术后1个月 (C和D) 的气管重建图像

图中可见术后位于终末端的一段较长的气管狭窄 (箭头) 已完全改善, 手术部位可见术后膈神经麻痹, 但不影响肺功能, 术后2个月麻痹缓解

通过采用细胞角蛋白5和8的双色免疫荧光法以及DAPI复染进行组织学鉴定。并在其附着于生物反应器中移植气管基质之前完成上皮细胞表型鉴定。所有的上皮细胞培养物在种植前即刻均进行细胞角蛋白染色，并呈阳性反应。此外，研究亦未检测到任何成纤维细胞形态学和免疫组织学改变。

5 受体自体软骨细胞的制备

软骨细胞制备的准备工作如前所述^[11]。在细胞培养的当天，抽取受体骨髓液10 ml，加入40 ml含有10%胎牛血清（Autogen Bioclear, Wilts, UK）、100 U/ml的青霉素、100 μg/ml链霉素和2 mmol/L GlutaMax-I（Invitrogen, Paisley, UK）的DMEM培养液（含1000 mg左旋葡萄糖，Sigma-Aldrich）中^[11]。于600 g离心力下离心5 min，去除表层脂肪及上清液，然后将含有间充质干细胞的细胞沉淀重悬于20 ml DMEM培养液中。行细胞计数，并以 1.1×10^6 /ml的密度接种于含有5 ng/ml碱性成纤维细胞生长因子（PeproTech, London, UK）的175 cm²透气培养瓶中，在37℃、5% CO₂的潮湿条件下稳定培养72 h，以促进细胞黏附。每3 d更换一次新的含有碱性成纤维细胞生长因子的DMEM培养液。待细胞融合达90%时，移去DMEM培养液，用Hanks平衡盐溶液洗涤细胞1次，然后用0.25%的胰蛋白酶-EDTA溶液（依地酸，Invitrogen, Paisley, UK）进行细胞传代。每一次传代时细胞接种密度控制在 1×10^6 /ml。为诱导软骨细胞分化，研究将培养液改为含有10 ng/ml重组人转化生长因子β（R&D Systems, Abingdon, UK）、10 nmol/L重组甲状旁腺激素相关肽（PeproTech, London, UK）、100 nmol/L

地塞米松和10 μg/ml胰岛素（Sigma-Aldrich, Dorset, UK）的完全培养液，并将培养时间延长至72 h。种植前所有软骨细胞培养物均未检测到成纤维细胞。

6 生物反应器的设计

为便于实际应用，本研究设计了一种新型生物反应器，可同时满足不同种类细胞在管状基质的任何一面进行种植与培养的需求；此外，还能完成细胞营养支持和废物清除；以流体切应力来表示其生物力学状态；可高压消毒，便于无菌处理；所获结果可靠，精密度符合实验室标准规范（GLP）要求。该装置沿着气管构架的纵轴旋转，根据两种不同类型细胞的种植条件要求特制培养液，使细胞在液相（培养液）和气相（空气）之间交替移动（旋转速率1.0~1.5转/min；图2）。该装置的外壳为聚砜材料，由一个与培养室相分离的子系统控制的直流电动机驱动旋转。其次级元件可使培养液持续混合，以加速细胞供氧。营养交换以及黏附细胞的新陈代谢。

7 种子细胞种植

受体的种子细胞分别种植于生物反应器内移植基质的不同部分。首先，从细胞培养瓶中分离出软骨细胞，并用培养液（ 1×10^6 个细胞/ml）稀释，然后用微量注射器将细胞沿长轴散布在移植基质外层，同时利用另一种独立的定位针将相同密度的上皮细胞种植在移植基质内层。每30 min将供体气管旋转90°，直至所有的表面完全接触细胞。之后再加入细胞培养液（外培养液75 ml，内培养液4 ml），并以1.5转/min的速率开始旋转（37℃、5% CO₂），每48 h更换一次外培养液（软骨

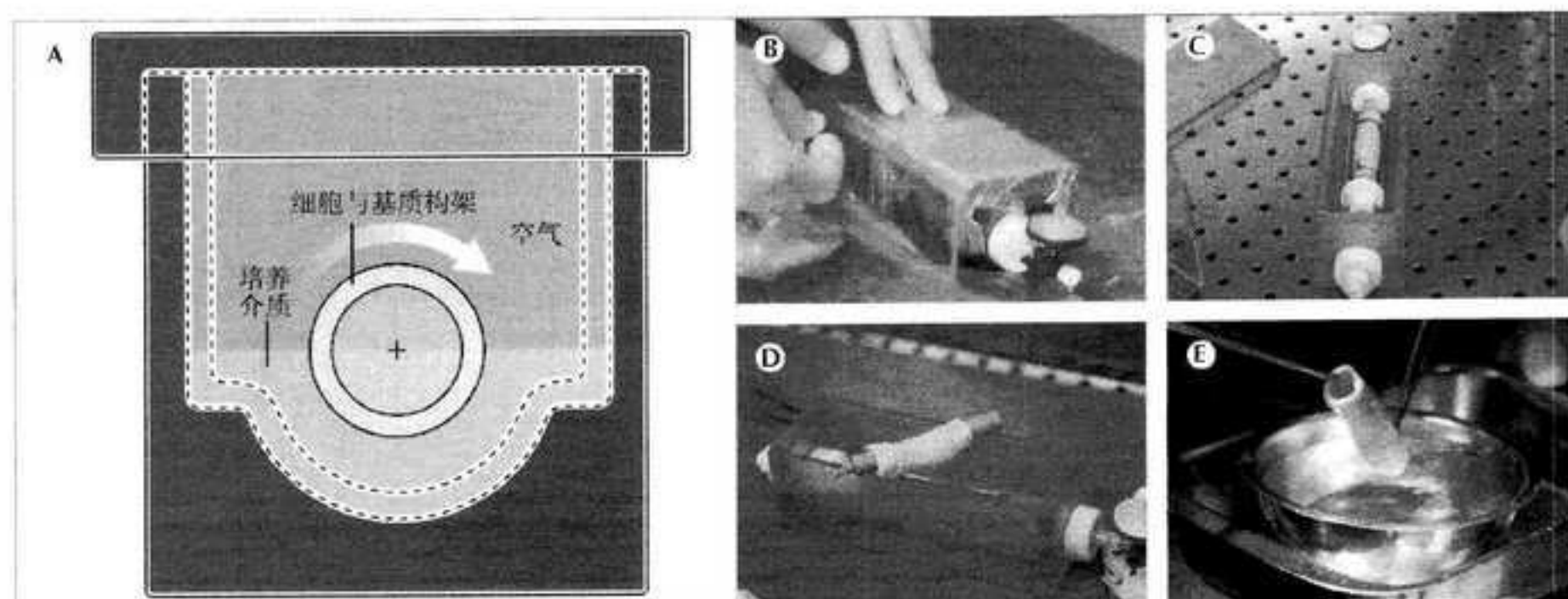


图2 组织工程气管生物反应器

A. 侧面观，可见沿着纵轴旋转的气管基质构架，该反应腔室将气管移植体内腔和外表面分开，通过规律旋转以提供细胞生长、营养支持和废物清除的流体切应力，同时确保细胞均匀黏附种植。B. 密封的生物反应器装置。C. 气管移植体在生物反应器内。D. 移除气管移植体后的生物反应器。E. 手术植入前的气管移植体。

细胞), 每24 h更换一次内培养液(上皮细胞), 并从培养液中取样以检测其微生物群落。该生物反应器总种植时间达96 h。

8 移植物植入

患者经全身麻醉和气管插管后实施左外侧第5肋间入路开胸手术。术中仔细分离并充分游离远端气管、左主支气管、左喉返神经和左膈神经。切除左主支气管, 通过造一个2 cm×2 cm大小的吻合口来重建气管远端侧面的起始端, 并且保留远端上部肺叶的起始端和叶脊。将气管移植物适度修饰后与受体远端和近端气

管行端-端吻合^[12]。两个口径大小有差异的吻合口依靠气管移植物弹性弥补, 吻合后患者双侧肺通气功能立刻得到了恢复。左肺通气功能良好, 检查未见气管吻合口瘘。缝合胸部切口并拔除气管插管。患者在ICU监护2 d病情平稳后转入普通病房, 并于术后第10天痊愈出院。患者的所有治疗得到西班牙移植管理机构 and 巴塞罗那临床医院伦理委员会的批准。

9 术后护理和监测

患者术后病情平稳, 第4天行普通支气管镜检查, 并分别于第14天、1个月、2个月再行支气管镜和血清

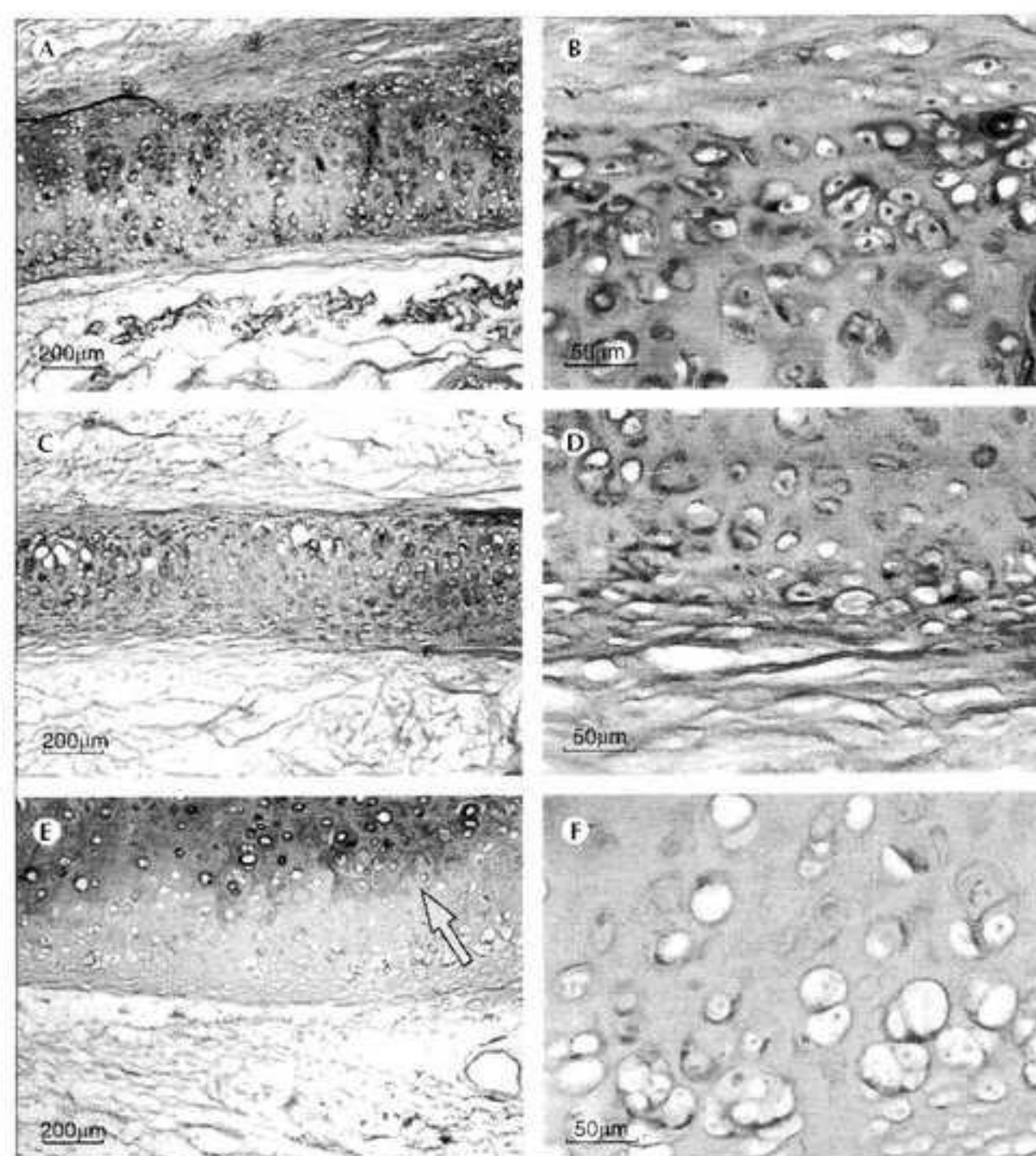


图3 正常气管、17次循环酶洗涤及25次循环酶洗涤时气管移植物管壁切片的免疫组化表现

棕色染色区域分别表示MHC I类分子(A、C和E)和II类分子(B、D和F)。经过25次循环酶洗涤后(E和F), 上皮细胞和腺体完全消失, 仅见少量软骨细胞分布于软骨环内, 大部分软骨细胞已被破坏, 表现为胞核消失和细胞边界不清。与正常气管(A和B)相比, 处理后的气管仍保持正常构架的完整性。经过17次循环酶洗涤后(C和D)可见MHC I类和II类抗原的免疫反应产物散布于气管移植物中; 而经过25次循环酶洗涤(E和F)后几乎所有的HLA阳性细胞被清除, 移植时仅见极少量软骨区域有MHC II类分子的微弱阳性表达(箭头), 未见MHC I类抗原染色。

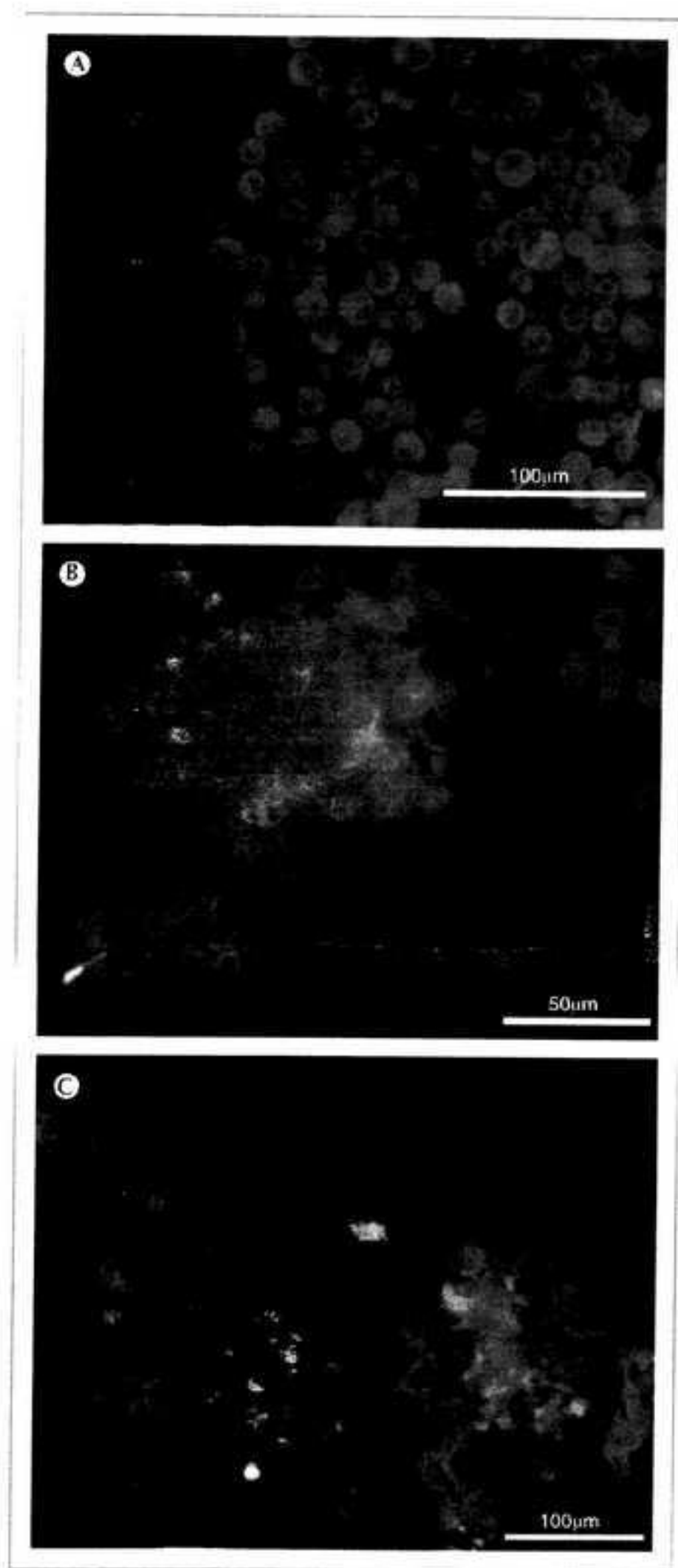


图4 彩色免疫细胞化学表现

A. 第一个阶段，种植到基质前，原有支气管细胞的表现。B. 种植于大鼠，移植基质外表面种植细胞第4天后的表现。C. 大鼠第4天气管移植体内壁细胞表现。在气管移植体内外表面可见到相同的上皮细胞表现（红色），在大鼠气管外表面可见两种活性细胞，即软骨细胞（绿色）和一层上皮细胞（红色），而且气管移植物的内壁上大量存在上皮细胞，并与少量的软骨细胞相混合。红色行免疫组化染色（上皮细胞）；绿色行免疫组化染色（软骨细胞）；蓝色为4'-6-二脒基-2-萘磺酸钠染色。

学检查，并采用专用的激光多普勒探头（moorLAB, Moor Instruments, Axminster, UK）检测气管邻近组织的微血管血流情况，术后第4天刷取气管内壁细胞以进行细胞学检查。

10 抗HLA抗体的血清学检查

患者抗供体HLA抗体及其特异性检测采用美国国立卫生研究院（NIH）推荐的补体依赖性细胞毒试验，即在一组64系细胞板上利用固相抗原试验——流式细胞法群体反应性抗体试验（FlowPRA）的I类和II类筛选珠（One Lambda, Canoga Park, CA, USA）——进行检查。先前报道^[11]显示，固相流式细胞技术敏感度更高，可以常规应用于临床，因此，研究拟采用该方法分别于手术前、手术后第14天、1个月、2个月检测抗体的产生及其特异性。

11 研究基金赞助者的角色

研究基金赞助者未参与研究设计、数据收集、数据分析、数据解释及研究报告撰写。通信作者有权使用所有研究数据，并最终负责论文的提交与发表。

结 果

通过酶洗涤方法，移植气管的细胞被逐步去除（图3）；经过25次循环去细胞方案（图3 E和F），上皮细胞和软骨细胞被去除；仅见极少数形态扭曲的软骨细胞，大多数无细胞核；然而，经酶洗涤后的气管基质仍然保持着与自身对照相同的支气管构架（图3 A和B）；25次循环的去细胞方案（图3 C和F）得以完全去除移植气管中HLA-A、HLA-B和HLA-C抗原，但局部少量区域可见MHC-II类分子表达。

患者术后未出现任何并发症并于术后第10天痊愈出院。出院后一般状况良好，能够走完两段楼梯，并连续步行500 m，能够照顾小孩。术后2个月行肺功能检查，结果提示与同龄和同性别人群相比均处于正常范围内（附表）。术后第14天、1个月及2个月分别行血清学检查未见抗供体HLA抗体。

术后第4天，气管移植体几乎与相邻正常支气管黏膜组织无区别。激光多普勒检查证实气管移植体邻近部位有丰富的微血管床出现。术后第14天，气管移植体表面有一层黏膜附着层出现，细胞学检测局部无炎性细胞浸润。术后第14天、1个月、2个月及3个月分别行激光多普勒检查，提示气管移植体血供良好（2个月时气管移植体局部血流速率为6.0 ml/min，右支气管为5.8 ml/min）。术后1个月时，气管移植体外观与患者自

5、下列细胞类型中表现出最高全能性的是：

- A.卵细胞
- B.精子
- C.体细胞
- D.受精卵
- E.生殖细胞

6、与核糖体组分的合成、定位和行使功能都不相关的细胞器是：

- A. 细胞核
- B. 内质网
- C. 线粒体和叶绿体
- D. 过氧化物酶体

7、细胞凋亡的形态学特征是：

- A.染色质 DNA 的降解
- B.RNA 和蛋白质等大分子的合成
- C.钙离子浓度升高
- D.核酸内切酶的参与
- E.细胞被分割成数个由质膜包裹的凋亡小体

8、要产生不同类型的细胞需通过：

- A.有丝分裂
- B.减数分裂
- C.细胞分化
- D.细胞去分化
- E.细胞分裂

9、2009 年全球流行的甲型流感（H1N1）病毒是：

- A. DNA 病毒
- B. RNA 病毒
- C. 类病毒
- D. 朊病毒

10、下列哪些组分与线粒体的半自主性相关：

- A. 环状质粒 DNA

体气管已无法区分。当取活检时局部黏膜有出血，提示移植血管重建成功。术前和术后1个月对患者分别进行三维CT气管重建，显示病变气管从近乎完全塌陷（术前）到广泛通畅（术后）的形态变化（图1C和D）。

术后第4天对气管腔内表面进行细胞学分析，提示上皮细胞丰富，细胞表型与细胞种植前培养时的表型相同，细胞刷中亦可见活性软骨细胞。移植前从气管移植外表面刷取的细胞经细胞学检查得出类似结果，两种类型的细胞表现如图所示（图4）。

讨 论

采用上述方案，我们从供体气管基质中成功去除了HLA抗原，随后将受体的上皮细胞和软骨细胞源性间充质干细胞种植于内。该移植体经过适度处理后被移植到一例患有左主支气管软化患者的气管部位，构成一段新的气道，使患者的生活质量得以改善。

与实质性器官的移植发生在无菌的间叶细胞环境中不同，气管移植发生在管腔内外表面间的环境中。可以肯定的是，气管黏膜的免疫活性细胞在气管移植中具有非常重要的作用^[14]，可导致急性同种异体移植排斥反应，从而需要高剂量的术后免疫抑制剂治疗^[15]。与其他器官移植不同，气管移植不属于挽救生命的唯一治疗方法^[1]，所以一个保留气管功能和机械特性的完全无免疫原性的气管移植是气管移植成功的最低要求。

胞外基质在调节多种细胞生物活性方面发挥了积极作用，而这也正是保持组织正常功能所必需的^[16]。因此，近来的生物工程研究重点是应用细胞外基质衍生材料作为具备生物活性的支持物。研究表明，来自组织去细胞化后获得的构架可提供若干种细胞的体外黏附、生长并发挥细胞功能^[18,17-18]，还已成功运用于动物和人体实验^[19]及作为组织器官生长和重塑的范本^[20-21]。

生物工程器官的一个潜在主要的问题是能否保证功能性的血供。在本项研究中，激光多普勒检测显示，术后第4天可见移植气管邻近部位正常的微血管床，术后第30天出现移植段气管黏膜出血。虽未将血管生长因子列入本研究，但我们认为血管生长因子（碱性成纤维细胞生长因子，转化生长因子 β ^[8]）在去细胞化的气管基质中依然表达，并假定类似的表达将有助于及时的血管重建。为支持这一观点，将经过酶洗涤处理后猪的气管植入到Balb/c小鼠背部皮肤中，2周后发现移植气管局部有新血管形成^[9]。

25次循环酶洗涤方法可完全去除细胞膜，所有的MHC I类分子和几乎所有的MHC II类分子，但仍有其他一些细胞成分残留于软骨区。基于组织工程实验^[24-25]的结果，作者推测，这些残存的细胞成分可同时对移植体和宿主细胞提供有益的信号，并可能降低炎症反应；相反，残存的细胞成分可能表达微量抗原，从而诱导慢性排异反应。然而，微量抗原在临床移植中仅起到极为有限的作用，本例患者术后2个月时并无炎症征象或抗供体的抗体出现。

尽管既往研究^[26]已描述了鼻黏膜上皮细胞如何培养才能运用于组织工程，但在本研究中，这些细胞生长过快以至于细胞凋亡的发生也先于支气管细胞，如果减少酶洗涤时间，鼻腔上皮细胞可能会成为将来气道组织工程的首选^[26]。虽然1个月时气管移植体被活性黏膜完全覆盖，仍不能肯定这些细胞是来源于种子细胞还是来源于毗邻的健康气管细胞。虽然动物实验研究^[27]提供了间接证据，即植入的种子细胞有可能通过一个重要途径发挥作用，但在使用现有的实验方法进行全临床临床试验之前有必要更深入了解这些种子细胞的作用。

体外试验中，24 h后上皮细胞与软骨细胞已经深植在移植体基质中，这一结果提示移植体基质具有高度容受性，可以作为以上细胞理想的生长环境。事实上，移植体在生物反应器中作用24 h后，培养介质中已不能检测到任何细胞（存活或死亡的），提示将近100%的细胞已经黏附于移植体基质上。移植后第4天，移植体表面清晰可见的活性上皮细胞和软骨细胞证实了这一结果，显示细胞在体内持续发挥功能。尽管两种细胞的生物反应器腔室结构明显隔离，但从气管内外表面收集的细胞学标本经分析后均可发现这两种类型的细胞。一种解释是细胞能够在短时间内自由迁移并通过移植体管壁，如果这种解释成立，将会对将来的组织工程设计产生影响。Zani^[27]通过动物实验证明，对功能性愈合而言，不同细胞之间没有必要形成一个有序的构架。我们的研究结果将这一观察延伸到了人类。

为尽量减少患者和移植体的损伤，对手术前和术后第4天细胞学分析的次数进行了限制，对何时行支气管镜检查的临床适应证也作了限定。猪的异位移植实验^[9]表明，一些去细胞化的移植体在没有自体细胞再种植情况下获得成功，我们无法将这些自体细胞的作用加以量化，但也不排除这种可能性，即实际上分辨自体细胞的这些作用是没有必要的。然而，本研究结果与动物模型结果完全一致，表明自体细胞在其中似乎

发挥了重要作用^[27]。

功能性的生物工程气道的建立,主要的挑战在于有统一、高效的种子细胞种植于三维管状移植物的内外表面、不同类型细胞的共同培养以及细胞群如何以最佳的方式在培养介质和生长的组织之间转输。为解决这些难题,我们开发出了一种适用于体外构建较长气道移植物的新型生物反应器。早期认为这两种类型的细胞需要不同的培养条件,因此为临床前期试验设计的生物反应器原型机提供了两个单独的工艺舱室,每个无菌舱室设有旋转的空气-培养介质界面,每个舱室内都要保持细胞活性状态直至移植之时。生物反应器中的这种动态培养环境,良好的可控性和重现性,是细胞营养供应和废物清除以维持庞大的人工三维构架所必需的。生物反应器的旋转提供了必要的流体剪切力,以促进细胞新陈代谢活动和适度的种子细胞分化。

与猪与牛术前研究相比, 在本临床移植中采用的两造管次数更多, 而且猪与人气管结构具有明显差异, 但术前与术后自体气管在组织处理和弹性方面的变化与临床前研究的结果非常相似, 而且在生物力学性能方面与临床前研究相当^[10]。尤其值得一提的是, 气管移植物的有效扩张性可以使其随肺容量大小以适应受体。

在本项研究中,我们对患者进行了为期4个月的随访,在完成全面临床试验之前,超过6个月的随访是必要的。需要特别提出的是,我们希望评价气管移植物的远期生物力学性能,以及软骨种子细胞能否继续形成新的软骨组织(或骨组织)。然而,气管移植物的早期功能和患者的一般状况良好,尤其移植部位出现新的血供,因此应该不可能出现大的并发症或气管远期再狭窄。在临床移植中,2个月内不出现并发症时,抗供体的抗体就很少出现^[28],因此预期不可能出现任何排异反应征象。

本文中,我们描述了一个创新的方法在人体内运用组织工程手段行大气道置换,从而大大改善了患者的生活质量。结果表明,含有受体细胞的组织工程气管可以产生具有机械性能和正常功能的气道,并且无排异反应。该例患者提供了新的证据,即将来通过自体细胞结合适当的生物材料可成功治疗某些严重临床的疾病。

Acknowledgments

This work was supported by the Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050987), Spain, and the Charles Courtenay-Cowlin Fund, University of Bristol, UK. APH is funded in part by an endowed chair from the UK Arthritis Research Campaign. SCD is funded by a Research Fellowship from the James Tudor Foundation. We thank Laura Morte for her excellent organisation and trouble-shooting; Victor Peinado, and others in his team, for their superb assistance; to whom we are indebted; John Armitage of the Human Tissue Working Group and the Research Enterprise Development team, including Christine Nileshear, Sarah Lewis, Gail, Hope and Brigit Whitman at the University of Bristol for providing logistical support and advice on this project; and all the medical and nursing staff at the Institut d'Investigacions Toràx and Transplant Foundation Sà, for being helpful. I. I. I. of Barcelona, without whom accomplishment of this success would have been impossible. None of the authors have any financial interest in the present work.

Department of General Thoracic Surgery, Hospital Clinic, Barcelona, Spain (Prof P Macchiarelli MD, P Longueux MD, T Sc MCh, Fundació Clinic Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Suñer (IDIBAPS), Barcelona, Spain (P Macchiarelli); CIBER Enfermedades Respiratorias, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (P Macchiarelli); Biomechanics, Politecnico di Milano, Milan, Italy (M A Fagnoli MD, S Vignani PhD); Anatomical Sciences University of Padua, Padua, Italy (S Roca PhD, P Ruggieri PhD, M T Condon PhD); Immunology, Medicine, University of Bristol, Bristol, UK (M J Griffin PhD, J Culligan PhD, J A Macleod PhD); Immunology, Medicine, University of Bristol, Bristol, UK (M J Griffin PhD, J Culligan PhD, J A Macleod PhD); and Clinical Sciences at South Bristol Faculty of Clinical Medicine and Dentistry, University of Bristol, Bristol, UK (P Longueux MD, T Sc MCh, P Ruggieri PhD, M T Condon PhD).

[illegible]

参考文献

- [1] Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73: 1995–2004
- [2] Macchiarini P, Wallis T, Biancosino C, et al. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 638–41
- [3] Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation*; 2008; 85: 1075–80
- [4] Sato T, Tao H, Araki M, et al. Replacement of the left main bronchus with a tissue-engineered prosthesis in a canine model. *Ann Thorac Surg*. 2008; 86: 422
- [5] Atala A, Bauer SB, Soker S, et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006; 367: 1241–46
- [6] Pham C, Greenwood J, Cleland H, et al. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns*. 2007; 33: 946–57
- [7] Macchiarini P. Trachea-guided generation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128: 14–16
- [8] Coneoni MT, De Coppi P, Di Liddo R, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int*. 2005; 18: 727–34
- [9] Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, et al. Structural and morphological evaluation of a novel enzymatic detergent tissue engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg* (in press)

- [10] Rees LE, Gunasekaran S, Sipaul F, et al. The isolation and characterisation of primary human laryngeal epithelial cells. *Mol Immunol*. 2006; 43: 725-30.
- [11] Kafienah W, Mistry S, Perry MJ, et al. Pharmacological regulation of adult stem cells: chondrogenesis can be induced using a synthetic inhibitor of the retinoic acid receptor. *Stem Cells*. 2007; 25: 2460-68.
- [12] Macchiarini P, Altmayer M, Go T, et al. Technical innovations of carinal resection for non-small-cell lung cancer. Hannover Interdisciplinary Intrathoracic Tumor Task Force Group. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82: 1989-97.
- [13] Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation*. 2005; 80: 1194-97.
- [14] Rees LE, Ayoub O, Haverson K, et al. Differential major histocompatibility complex class II locus expression on human laryngeal epithelium. *Clin Exp Immunol*. 2003; 134: 497-502.
- [15] Shaari CM, Farber D, Brandwein MS, et al. Characterizing the antigenic profile of the human trachea: implications for tracheal transplantation. *Head Neck*. 1998; 20: 522-27.
- [16] Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, et al. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2004; 199: 174-80.
- [17] Burra P, Tomat S, Conconi MT, et al. Acellular liver matrix improves the survival and functions of isolated rat hepatocytes cultured in vitro. *Int J Mol Med*. 2004; 14: 511-15.
- [18] Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, et al. Effect of synthetic peptides on osteoblast adhesion. *Biomaterials*. 2005; 26: 4507-15.
- [19] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
- [20] Parnigotto PP, Marzaro M, Artusi T, et al. Short bowel syndrome: experimental approach to increase intestinal surface in rats by gastric homologous acellular matrix. *J Pediatr Surg*. 2000; 35: 1304-08.
- [21] Marzaro M, Vigolo S, Oselladore B, et al. In vitro and in vivo proposal of an artificial esophagus. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 77: 795-801.
- [22] Conconi MT, De Coppi P, Bellini S, et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials*. 2005; 26: 2567-74.
- [23] Conconi MT, Bellini S, Teoli D, et al. In vitro and in vivo evaluation of acellular diaphragmatic matrices seeded with muscle precursors cells and coated with VEGF silica gels to repair muscle defect of the diaphragm. *J Biomed Mater Res*. 2008; published online April 22. DOI:10.1002/jbm.a.31982.
- [24] Marzaro M, Conconi MT, Perin L, et al. Autologous satellite cell seeding improves in vivo biocompatibility of homologous muscle acellular matrix implants. *Int J Mol Med*. 2002; 10: 177-82.
- [25] Gilbert TW, Freund SJM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*. 2008; published online March 13. DOI:10.1016/j.jss.2008.02.013.
- [26] Candrian C, Vonwil D, Barbero A, et al. Engineered cartilage generated by nasal chondrocytes is responsive to physical forces resembling joint loading. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 197.
- [27] Zani BG, Kojima K, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 7046-51.
- [28] Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. 2004; 4: 438-43.

- B. 自身转录 RNA
 - C. 翻译蛋白质的体系
 - D. 以上全是
- 11、建立分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞是通过下列哪项技术构建的：
- A. 细胞融合
 - B. 核移植
 - C. 病毒转化
 - D. 基因转移
- 12、在细胞周期中，DNA 复制发生在：
- A. G₁ 期
 - B. S 期
 - C. G₂ 期
 - D. 分裂中期
 - E. 分裂后期
- 13、摆动的正确含义是：
- A. 一种反密码子能与第三位碱基不同的几种密码子配对
 - B. 使肽键在核糖体大亚基中得以伸展的一种机制
 - C. 在翻译中由链霉素诱发的一种错误
 - D. 核糖体沿着 mRNA 从 5'到 3'的移动
 - E. 热运动所导致的 DNA 的局部变性
- 14、目前所发现的既具有遗传信息载体功能，又具有催化活性的生物大分子是：
- A. DNA
 - B. RNA
 - C. 蛋白质
 - D. 以上都是
- 15、Development of recombinant DNA methodologies is based upon discovery of ():
- A、the polymerase chain reaction(PCR).
 - B、restriction endonucleaese.
 - C、plasmids.
 - D、complementary DNA (cDNA).
 - E、yeast artificial chromosomes (YSCs).

16、分离出单个细胞在适当的条件下使之增殖成均一的细胞群体称为：

- A、细胞培养
- B、原代培养
- C、传代培养
- D、细胞克隆
- E、细胞融合

17、真核细胞中 DNA 分布是：

- A、只在细胞核中
- B、只在细胞质中
- C、主要在细胞核中，也在细胞质中
- D、主要在细胞质中，也在细胞核中
- E、核中一半，质中一半

18、tRNA 柄部末端的碱基顺序是：

- A、5' ACC3'
- B、3' CAC5'
- C、5' CAC3'
- D、5' CCA3'
- E、5' ACA3'

19、真核细胞具有的特征：

- A、转录和翻译在同一场所同时进行
- B、有各种膜性结构的细胞器
- C、都含有细胞壁
- D、无细胞骨架
- E、以上都是

20、不属于跨膜蛋白的是：

- A、载体蛋白
- B、通道蛋白
- C、G 蛋白
- D、核糖体受体蛋白
- E、腺苷酸环化酶

21、膜脂的运动方式中少见的类型是：

- A、旋转异构运动
- B、旋转运动
- C、侧向运动
- D、钟摆运动
- E、翻转运动

22、既可以进行主动运输，又可进行被动运输的是：

- A、载体蛋白
- B、通道蛋白
- C、G 蛋白
- D、笼形蛋白
- E、受体蛋白

23、高尔基复合体最重要的组成部分是：

- A、扁平囊
- B、大囊泡
- C、小囊泡
- D、液泡
- E、分泌泡

24、溶酶体的水解酶形成 6-磷酸甘露糖标志的受体存在于：

- A、粗面内质网
- B、溶酶体
- C、滑面内质网
- D、高尔基体
- E、运输小泡

25、线粒体半自主性的一个重要方面体现于下列哪一事实：

- A、线粒体 DNA (mtDNA) 能独立复制
- B、线粒体含有核糖体
- C、线粒体含有 3 种 RNA
- D、线粒体的 DNA 与细胞核 DNA 的遗传密码有所不同
- E、其遗传上由线粒体基因组和细胞核基因组共同控制

26、rRNA 是：

- A、有反密码子
- B、带有蛋白质合成的遗传信息
- C、构成核蛋白的成分
- D、有双螺旋结构
- E、有密码子

27、在蛋白质合成过程中，核糖体上肽键形成的部位是：

- A、供体部位
- B、受体部位
- C、肽基转移酶位
- D、GTP 酶活性部位
- E、小亚基部位

28、5S rRNA 在（ ）合成

- A、在线粒体中
- B、在细胞核的常染色质区合成
- C、从核仁内 DNA 转录出来
- D、从细胞核的异染色质区转录出来
- E、有时在核仁内、有时在核仁外合成

29、迅速生长的细胞中，可溶性蛋白质合成旺盛，细胞中含量最多的细胞器是：

- A、中心体
- B、附着的多聚核糖体
- C、大、小亚基
- D、游离的多聚核糖体
- E、高尔基复合体

30、形成微管蛋白二聚体的是：

- A、2 个 α 亚单位
- B、2 个 β 亚单位
- C、 α 和 β 亚单位
- D、 α 和 γ 亚单位
- E、 β 和 γ 亚单位

31、可被秋水仙素破坏的结构是：

- A、微管
- B、微丝
- C、中间纤维
- D、核骨架
- E、内质网

32、核仁的大小取决于：

- A、细胞内蛋白质合成的程度
- B、核仁组织区的多少
- C、线粒体的多少
- D、内质网的多少
- E、核仁相随染色质的多少

33、关于核膜，叙述错误的是：

- A、核膜与内质网相连
- B、核膜把核物质集中于细胞特定区
- C、核膜是真核细胞内膜系统的一部分
- D、核膜是一层包围核物质的单位膜
- E、核膜不是封闭的体系，其上有孔

34、两条染色单体相连处狭窄部位是：

- A、主缢痕
- B、次缢痕
- C、随体
- D、端粒
- E、X 小体

35、组蛋白的合成发生在细胞周期的：

- A、G₀ 期
- B、G₁ 期
- C、G₂ 期
- D、M 期
- E、S 期

36、有丝分裂和无丝分裂的主要区别在于后者：

- A、不经过染色体的变化，无纺锤丝出现
- B、经过染色体的变化，无纺锤丝出现
- C、遗传物质不能平均分配
- D、细胞核先分裂，核仁后分裂
- E、染色体数目减半

37、肿瘤组织生长迅速的主要原因是：

- A、细胞周期短
- B、G1 期细胞少
- C、增殖细胞少
- D、细胞周期失控
- E、G0 期细胞少

38、原癌基因的正确含义是：

- A、是人类细胞中固有的基因，不当表达可造成细胞癌变
- B、是由病毒感染传给人类细胞的致癌基因
- C、能编码生长因子的基因，同时可表达合成癌基因
- D、编码生长因子受体的基因，同时也编码癌基因
- E、原癌基因可导致细胞无限增殖而癌变

39、下列哪种现象是干细胞的去分化：

- A、神经干细胞分化形成神经胶质细胞
- B、神经干细胞分化形成神经元
- C、神经干细胞分化成造血细胞
- D、造血干细胞分化成肌细胞
- E、造血干细胞逆转成胚胎干细胞

40、胚胎干细胞是：

- A、未分化的多能性细胞，可分化为外、中、内 3 种胚层
- B、不表达畸胎瘤细胞的表面抗原
- C、具有分化成为外胚层的潜能，但不具有分化为中胚层的潜能
- D、具有分化成为中胚层的潜能，但不具有分化为中胚层的潜能
- E、具有分化成为内胚层的潜能，但不具有分化为中胚层的潜能

二、 填空题（每题 2 分，共 20 分）：

- 1、组蛋白密码（Histone code）指组蛋白的乙酰化、_____、磷酸化、泛素化、糖基化等影响转录因子与 DNA 结合的动态转录调控。
- 2、线粒体是细胞内参与能量代谢的主要结构，它由双层_____构成，内膜上分布着具有电子传递功能的蛋白质系统和使 ADP+Pi 生产 ATP 的 ATP 合酶复合体。
- 3、细胞分化的分子基础是_____，母源效应基因的极性分布和胚胎发育早期细胞的不对称性分裂决定或者影响细胞的分化命运。
- 4、细胞培养时补充二氧化碳的目的是_____。
- 5、通常将真核细胞的基因表达调节蛋白称_____；而将它们所识别的 DNA 序列叫做顺式作用元件。
- 6、丝氨酸/苏氨酸激酶的主要作用是通过变构而激活蛋白质，催化底物蛋白丝氨酸/苏氨酸残基_____，包括 PKA、PKC、PKG、钙调蛋白依赖性激酶和丝裂原激活蛋白激酶。
- 7、R. Virchow 指出：“机体的一切病理现象都是基于_____的损伤”的论点是对细胞学说的重要补充。
- 8、一种技术用来自动化分离和分析各类细胞、微生物或混合群体的细胞器，与传统测量细胞的方法最大不同之点在于细胞是高速运动的。该过程是由一个全自动化仪器来完成的，可将其分为识别和分离两步。将许多细胞注入使其一滴滴流出，被带到一个激发源上（通常是一束激光），光速测值为每秒 10^5 - 10^6 之间。用染料或荧光化合物可测出每种细胞的多个参数。根据细胞与激光相互作用所发射或散发出的光刻确定细胞的特征。不同角度散射出的光强度提供了有关细胞大小、形状、密度、活力和表面形态的一些信息。将这些信息输入计算机，根据光束所带液滴的电荷和静电偏斜，即可从物理学上分拣出所要求的细胞类型。用该技术可测得多项参数吗，包括细胞大小、体积、总蛋白、膜的完整性、DNA 含量、RNA 含量、RNA 合成速率、核酸分型资料以及检测细胞表面标志，特别可用来测量 T 和 B 淋巴细胞群。这一技术称为_____。
- 9、mRNA 成熟过程中的一个步骤，即从 mRNA 前体中去除内含子连接外显子的过程。它是 RNA 加工水平上调节基因表达的重要机制。这一步骤叫_____。
- 10、tRNA 既能识别 mRNA 上的密码子又能携带特定的_____。