

## · 研究简报 ·

## 人体尿液中新型促红细胞生成素受体激动剂的检测

邢延一\*, 张力思, 徐友宣, 吴侗天, 王 杉

(国际体育总局反兴奋剂中心, 北京 100029)

关键词: 促红细胞生成素受体激动剂; 促红细胞生成素; 等电聚焦; SDS 凝胶电泳; 免疫双印迹; 兴奋剂  
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0820-04

**Determination methods for erythropoietin receptor activator in human urine**

XING Yan-yi\*, ZHANG Li-si, XU You-xuan, WU Mou-tian, WANG Shan

(National Anti-doping Agency, Beijing 100029, China)

**Abstract:** In the present study, isoelectronic focusing with different pH gradients (pH 3-5, 2-6) or migrating distances (8.5, 12 and 17 cm) and SDS-PAGE was used to separate continuous erythropoietin receptor activator (CERA), recombinant human erythropoietin (rhEPO), darbepoetin and endogenous EPO spiked in human urine with 37 °C overnight incubation. Double blotting and chemiluminescent visualization were used to detect the IEF and SDS-PAGE profiles. The bands of CERA profile were detected and well separated from the endogenous EPO and the other two EPO preparations with both SDS-PAGE and the IEF method using a gradient pH 3-5 and a migrating distance of 17 cm, and a significant particular band of CERA profile was found in the IEF result. These preliminary results indicated that the methods were reliable and reproducible for detecting CERA, and could be used as a routine procedure for anti-doping analysis.

**Key words:** erythropoietin receptor activator; erythropoietin; isoelectronic focusing; SDS-PAGE; double blotting; doping

促红细胞生成素类制剂 (erythropoietin stimulating agents, ESAs) 作为治疗肾性贫血的主要药物在临床中被广泛应用<sup>[1,2]</sup>。由于其能促进血液中红细胞数量的增加, 从而提高血液的载氧能力, 也常常被竞技体育中某些耐力项目运动员滥用以提高运动成绩。这不仅违背了体育运动的公平性, 也给运动员的健康带来了极大的损害<sup>[3]</sup>。重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rhEPO) 于 1989 年被世界反兴奋剂机构 (World Anti-Doping Agency, WADA) 列入禁用后, 第 2 代 EPO 类兴奋剂 darbepoetin (也称新红细胞刺激因子, novel erythropoiesis stimulating protein, NESP) 也于 2002 年被禁

用<sup>[4]</sup>。如今, 第 3 代持续性促红细胞生成素受体激动剂 (continuous erythropoietin receptor activator, CERA) 于 2007 年在欧洲问世。CERA 结构与前几代产品相比略有不同, 它在原有的结构上连接了额外的水溶性的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)<sup>[5]</sup>, 其半衰期从 darbepoetin 的 8~20 h<sup>[6]</sup> 延长到 133~150 h<sup>[5]</sup>。在临床中用于治疗肾性贫血时可以延长给药间隔, 从以前每周给药 1~3 次延长到每 3 周甚至 4 周给药 1 次, 并且无论是静脉还是皮下注射 CERA 都可有效地维持血红蛋白水平。同时也有文献<sup>[7]</sup>报道与其他的 ESAs 相比, 使用 CERA 更容易产生程序性低血压、出血和心跳过速等不良反应。

国际上进行 EPO 类兴奋剂的检测时, 一般使用 2001 年法国科学家 Lasne<sup>[8]</sup>提出的等电聚焦配合以免疫双印迹化学发光的方法对运动员的尿样进行分析。

收稿日期: 2008-12-17.

\*通讯作者 Tel: 86-10-64946938, Fax: 86-10-64979303,

E-mail: xingyanyi@tom.com

该方法基于生物标准品 (BRP)、NESP 与内源性 EPO 结构上的差异导致的等电点不同从而判断被检测者是否滥用该类药物。但是, 该方法在分离尿液中的 CERA 时效果并不理想, 并且国内外尚无报道检测尿样中 CERA 的方法, 所以目前只能通过采集运动员的血液样本对 CERA 进行检测<sup>[5]</sup>。考虑到尊重不同地区、宗教、民族的运动员习俗和样本采集的方便程度, 检测尿样中的 CERA 对实际应用具有更高的价值。因此, 改进现有 EPO 类兴奋剂的检测方法, 从而使 CERA 的检测纳入尿检方法检测范围内, 对开展反兴奋剂的工作具有重大意义。

## 材料与方法

**试剂与仪器** rhEPO 标准品 (BRP-EPO) 由法国 Strasbourg 公司生产; Amegen 制剂 (novel erythropoiesis stimulating protein, NESP)、CERA 制剂由奥地利反兴奋剂实验室惠赠; EPO 单克隆抗体 (AE7A5) 和免疫纯化用 ELISA 试剂盒由 R&D 公司生产; 生物素标记羊抗鼠 IgG (H+L) 多克隆抗体由法国 PARIS 公司生产; 生物素标记辣根过氧化物酶 (HRP) 由意大利 BIOSPA 公司生产; Complete<sup>®</sup> 由罗氏公司生产; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (电泳纯, 40% T, 3% C) 由 Fluka 公司生产; 尿素 (urea, 分析纯)、过硫酸铵 (APS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、Tris、甘氨酸 (glycine)、Electrophoresis Power supply EPS-3501、EPS-2A200、MultiphorII 和 TE77 均由 GE 公司生产; 二硫苏糖醇 (DTT) 由 Promega 公司生产; Bis Tris-gels (NuPAGE<sup>®</sup> 10%)、SureLock<sup>™</sup>、NuPAGE<sup>®</sup> (LDS Sample Buffer 4x)、4-吗啉丙磺酸 (MOPS)、Seebue<sup>®</sup> 蛋白质分子量标准均由 Invitrogen 公司生产; 超滤离心管 (Centricon Plus-20, Centricon YM-30, Microcon YM-30)、PVDF 印迹膜、化学发光底物由 Millipore 公司生产; 载体两性电解质 (pH 梯度 2-4, 4-6 和 3-5) 由 Serva 公司生产; 凝胶成像系统由富士公司生产; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 样品制备

**内源性 EPO 对照样品的制备** 取正常健康男性志愿者尿 80 mL, 加入  $3.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris/HCl (pH 7.4) 溶液 2 mL 和 Complete 溶液 (1 片溶于 2 mL 水中) 0.2 mL,  $2\ 700 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 去除沉淀后过滤除菌 (0.22  $\mu\text{m}$  Steriflip)。过滤后的样品倒入第 1 次超滤离心管 (Centricon Plus-20 MWCO 30 kD),  $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 然后用  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris/HCl, pH 7.4 (含 Complete 浓度为  $20 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的溶液洗涤,  $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$

离心 20 min, 将相对分子质量大于 30 kD 的溶液转移至 2 次离心管 (Microcon YM-30) 中继续超滤浓缩至体积 80  $\mu\text{L}$  左右后作为空白阴性对照样品备用。

**外源性对照样品的制备** 取正常健康男性志愿者尿 1 mL,  $2\ 700 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 去除沉淀后过滤除菌 (0.22  $\mu\text{m}$  Steriflip), 然后将尿液转移至超滤离心管 (Microcon YM-30) 中, 浓缩至 100  $\mu\text{L}$  左右, 作为基质尿空白溶液。取基质尿空白溶液 97.5、97.0 和 50.0  $\mu\text{L}$  分别加入  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  BRP 溶液 2.5  $\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{L}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  NESP 溶液 3.0  $\mu\text{L}$  和  $1 \mu\text{L}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  CERA 溶液 1.5  $\mu\text{L}$  混匀, 使最终浓度约为  $3\ 000 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  温浴过夜, 分别作为外源性 BRP-EPO 样品、外源性 NESP 样品和外源性 CERA 样品。

**等电聚焦样品的制备** 分别取内源性 EPO 样品和外源性对照样品各 20  $\mu\text{L}$ ,  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 3 min 并迅速冷却后加入 10% Tween 80 2.2  $\mu\text{L}$ , 混匀后上样。

**SDS-PAGE 电泳样品的制备** 分别取内源性 EPO 对照样品和外源性对照样品各 20  $\mu\text{L}$  放入 ELISA 试剂盒 (R&D) 96 孔板的样品孔中  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜后, 以 PBS 漂洗样品孔后甩干, 每份样品中加入洗脱液 (NuPAGE<sup>®</sup>) 5  $\mu\text{L}$  及  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT 2  $\mu\text{L}$ ,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  加热振荡 5 min 后上样。

**等电聚焦** 使用 2 种不同 pH 梯度范围 (pH 2~6, pH 3~5) 和 3 种不同电极距离 (8.5、12 和 17 cm) 的聚丙烯酰胺凝胶 ( $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素, 5% 丙烯酰胺, 3% 甲叉双丙烯酰胺凝胶) 进行分离。电泳过程中冷凝水温度为  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ 。电泳参数设定见表 1。

**Table 1** Isoelectric focusing electrophoresis parameter

Parameter	pH 2-6	pH 2-6	pH 3-5
Migrating distance /cm	8.5	12	17
Pre-focusing	250 V/150 mA/ 25 W/60 min	250 V/150 mA/ 25 W/60 min	3 500 V/100 mA/ 25 W/60 min
Isoelectric focusing	2 000 V/131 mA/ 25 W/3 600 V·h	2 000 V/131 mA/ 25 W/4 000 V·h	3 500 V/100 mA/ 24 W/9 000 V·h

电泳结束后将胶浸入转印缓冲液 ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris/ $192 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  glycine) 浸泡 2 min 后, 以半干转印法 ( $1.2 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  恒流, 30 min) 将蛋白转印至 PVDF 膜。转印结束后将膜放入  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT/PBS ( $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 下同) 溶液中温浴 45 min 后, 放入 5% 脱脂奶粉/PBS 中封闭 45 min, 再将膜置入一抗/PBS (1:1 000) 溶液中  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜。用 0.5% 脱脂奶粉/PBS 分 3 次漂洗 30 min 后, 以 0.7% 醋酸为缓冲液进行二次印迹, 印迹结束后依次进行 5% 脱脂奶粉/PBS

封闭 45 min, 多克隆抗体/PBS (1:4 000) 中室温孵育 45 min, 0.5%脱脂奶粉/PBS 漂洗 30 min, HRP/PBS (1:2 000) 室温孵育 45 min, PBS 溶液漂洗 30 min 后, 进行化学发光检测。

**SDS-PAGE** SDS-PAGE 中所使用的分离凝胶为 Bis Tris-gel (10% T, 1.5 mm) 的预制胶, 上样后恒压 (200 V) 分离 90 min。电泳结束后将胶浸入转印缓冲液 (48 mmol·L<sup>-1</sup> Tris / 39 mmol·L<sup>-1</sup> glycine / 1.3 mmol·L<sup>-1</sup> SDS / 20%甲醇) 浸泡 2 min 后, 以半干转印法 (1.2 mA·cm<sup>-2</sup> 恒流, 60 min) 将蛋白转印至 PVDF 膜。之后的操作步骤同等电聚焦操作方法。

## 结果

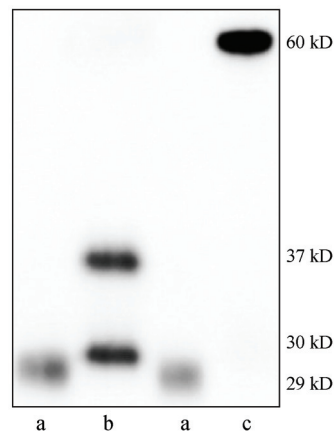
### 1 等电聚焦法分离

使用不同 pH 梯度 (pH 2~6, pH 3~5) 和不同电极间距离 (8.5、12 和 17 cm) 的聚丙烯酰胺凝胶均可对内源性 EPO 样品、BRP 和 NESP 样品进行分离 (图 1A 中条带 a 和 c), 同时可检测到 CERA 样品条带。当使用 pH 梯度为 2~6、电极间的距离相对较短 (8.5 cm) 的凝胶分离 CERA 时, CERA 的条带分布在 pH 4.8~5.3 附近, 且分离效果并不理想 (图 1A 中条带 b)。当拉大凝胶电极间距离后, CERA 样品中的条带  $\alpha$  隐约可见 (图 1B 中条带 b), 条带  $\alpha$  为 CERA 条带中第一条浓度较深的条带, 出现位置相当于 BRP 条带中第 4 和第 5 条带之间, 与其他外源性 EPO 不同, 为 CERA 的特征性条带。而使用 pH 梯度 3~5 的长胶 (电极间距离为 17 cm), 凝胶的分离度显著提高,

CERA 样品的特征性条带  $\alpha$  也清晰可辨 (图 1C 中条带 b)。

### 2 SDS-PAGE 法分离

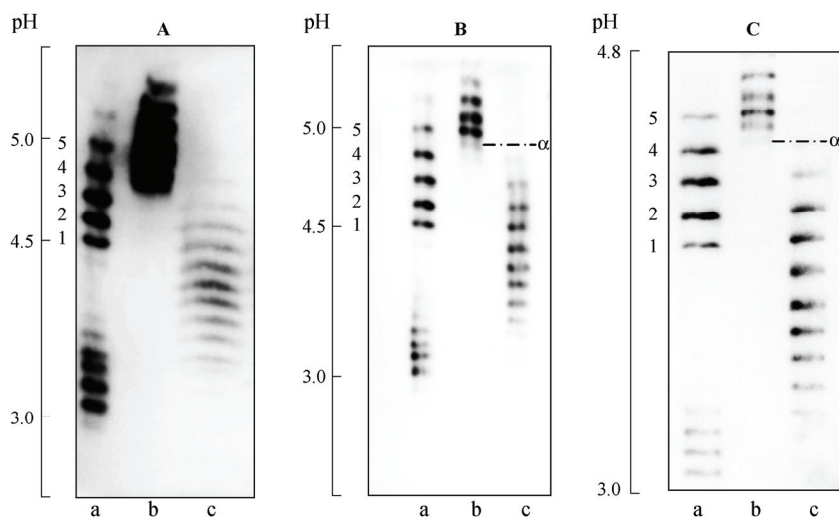
根据肉眼可见的 Seeblue<sup>®</sup> 预染蛋白质分子质量 Marker 的标示结合文献报道判断, 图 2 中内源性 EPO, BRP, NESP 和 CERA 的分子质量依次约为 29 kD<sup>[9]</sup>, 30 kD<sup>[10]</sup>, 37 kD<sup>[11]</sup> 和 60 kD<sup>[5]</sup>。由于 CERA 的分子质量明显大于内源性 EPO, BRP 和 NESP, 因此在 SDS-PAGE 中 CERA 的条带清晰可辨。



**Figure 2** SDS-PAGE profile of EPO (a), BRP-EPO + NESP (b), and CERA (c)

## 讨论

当 EPO 类制剂作为兴奋剂被滥用于竞技比赛中时, 区分药物的内源性和外源性来源成为兴奋剂检测的关键。上述实验研究证明内源性 EPO、BRP、



**Figure 1** Isoelectric focusing electrophoresis graph of different pHs and migrating distances. A: pH 2~6, migrating distance 8.5 cm; B: pH 2~6, migrating distance 12 cm; C: pH 3~5, migrating distance 17 cm. a: Standard of recombinant erythropoietin and novel erythropoietin stimulating protein (BRP-EPO+NESP); b: Continuous erythropoietin receptor activator (CERA); c: Erythropoietin (EPO).  $\alpha$  is a characteristic line

NESP、CERA 虽然有相同的氨基酸序列,但是由于它们的糖基化程度不同,所以生物半衰期、等电点和分子质量均有差异<sup>[12]</sup>,只要选用合适的 pH 梯度和电泳距离,就可以对它们进行分离。结果证明,当使用 pH 梯度 2~6,电泳距离 12 cm 或 pH 梯度 3~5,电泳距离 17 cm 的等电聚焦电泳或 SDS-PAGE 法均可对 CERA 进行分离,从而对运动员体内 EPO 类化合物是否为外源性进行更为全面的判断。

本方法在免疫印迹中使用的单克隆抗体对 CERA 识别良好,但有报道此抗体可与一种血液中常见的糖蛋白 (zinc-alpha-2-glycoprotein, ZAG) 产生交叉反应<sup>[13]</sup>,该蛋白的等电点比 CERA 略高 (约在 5.0~6.5),分子质量则比 CERA 小很多 (约为 33 kD 左右)。这种糖蛋白会在某些特殊生理情况下大量代谢存在于尿中。由于其等电点与 CERA 接近,所以可能会对等电聚焦检测结果判断造成影响。如果用 SDS-PAGE 的方法通过分子质量进行判断,就非常容易将二者区分开。因此在常规检测中,SDS-PAGE 的方法可以用作等电聚焦检测 CERA 的必要辅助检测手段。

长期实践工作中大量的运动员尿样的检测结果证明,本方法对内源性 EPO 检测限约在  $150 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ ,而人体尿液内 EPO 浓度范围约在  $0.15 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$  到  $10 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验中将 3 种 EPO 类制剂添加到浓缩 10 倍的尿样中,此时样品中的内源性 EPO 浓度低于检测限,因此在结果中内源性 EPO 条带不可见。BRP 和 NESP 在单次注射后,会在一定时间内对内源性的 EPO 产生抑制作用<sup>[8, 14]</sup>,但 CERA 在人体尿液中的代谢尚无相关报道,仅有动物实验结果报道其在尿中存在原形代谢物,约占总代谢物的 23%<sup>[15]</sup>。

致谢: CERA 制剂由奥地利反兴奋剂实验室惠赠。

## References

- [1] Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, et al. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis [J]. *Lancet*, 1986, 2: 1175-1178.
- [2] Ling SS, Zhou Y, Sun WL, et al. Effects erythropoietin on experimental anemia in rats with chronic renal failure [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1992, 27: 412-417.
- [3] Yang ZY. *Drugs and Competitive Sports (药物与竞技体育)* [M]. 1st ed. Beijing: China People's Sports Publishing House, 1993: 110-111.
- [4] WADA. Prohibited List [EB/OL]. Lausanne, [2009-02-14]. <http://www.wada-ama.org/en/prohibitedlist.ch2>
- [5] Provenzano R, Besarab A, Macdougall IC. The continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) corrects anemia at extended administration intervals in patients with chronic kidney disease not on dialysis: results of a phase II study [J]. *Clin Nephrol*, 2007, 67: 306-317.
- [6] Green MD. Clinical pharmacology review of novel erythropoiesis stimulating protein NESP [EB/OL]. US, [2009-01-02]. STN:103951-000. [http://www.fda.gov/cder/biologics/review/ARANESP\\_ClnPhrmRvw.pdf](http://www.fda.gov/cder/biologics/review/ARANESP_ClnPhrmRvw.pdf)
- [7] McGahan L. Continuous erythropoietin receptor activator (Mircera) for renal anemia [J]. *Issues Emerg Health Technol*, 2008, 113: 1-6.
- [8] Lasne F, Martin L, Crepin N. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones [J]. *Anal Biochem*, 2002, 311: 119-126.
- [9] Kohler M, Ayotte C, Desharnais P, et al. Discrimination of recombinant and endogenous urinary erythropoietin by calculating relative mobility values from SDS gels [J]. *Int J Sports Med*, 2008, 29: 1-6.
- [10] Lai PH, Everett R, Wang FF, et al. Structural characterization of human erythropoietin [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261: 3118-3121.
- [11] Dwek RA, Buters TD, Platt FM, et al. Targeting glycosylation as a therapeutic approach [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 65-75.
- [12] Zhou GH, Luo GA, Zhang XD. Characterization of N-glycans from recombinant human erythropoietin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1999, 34: 227-231.
- [13] Reichel C. Identification of zinc-alpha-2-glycoprotein binding to clone AE7A5 antihuman EPO antibody by means of nano-HPLC and high-resolution high-mass accuracy ESI-MS/MS [J]. *J Mass Spectrom*, 2008, 43: 916-923.
- [14] Lamon S, Robinson N, Mangin P. Detection window of darbepoetin- $\alpha$  following one single subcutaneous injection [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 379: 145-149.
- [15] Roche. Scientific discussion of Mircera<sup>®</sup> on EMEA [EB/OL]. Switzerland, 2007 [2009-1-20]. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/mircera/H-739-en6.pdf>.