

兴奋剂重组人促红细胞生成素及其类似物检测方法的研究进展

杨 霞, 庞楠楠, 廖一平, 刘虎威

(北京分子科学国家实验室 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 :重组人促红细胞生成素(rhEPO)是一种激素类兴奋剂,近年来被滥用在一些耐力性比赛项目中。由于重组与内源性 EPO 的氨基酸序列相同,区别很小,并且在尿样或血样中的浓度低,代谢快,给检测带来了很大的难度。本文从直接方法和间接方法两个方面综述了近几年来兴奋剂 rhEPO 及其类似物检测的研究进展,并结合本小组的工作展望了 rhEPO 检测的发展方向。

关键词 :重组人促红细胞生成素 ;兴奋剂 ;检测 ;直接方法 ;间接方法 ;综述

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)04-0413-04 栏目类别 :兴奋剂检测方法专栏

Recent advances in the detection of recombinant human erythropoiesis and its analogs in doping control

YANG Xia, PANG Nannan, LIAO Yiping, LIU Huwei

(*Beijing National Laboratory for Molecular Sciences, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China*)

Abstract :Recombinant human erythropoietin (rhEPO) is one of hormone dopings. In the recent years, it has been always misused in endurance competition sports. It is extremely difficult to discriminate between the natural endogenous erythropoietin (EPO) and recombinant exogenous hormone because they have identical amino acid sequences, and EPO has a relatively short half-life and very low concentration in blood or urine. In this paper, the research progress on the analysis and detection of rhEPO and its analogs by direct and indirect methods are reviewed. Future direction and prospects of the detection of rhEPO in doping control are discussed based on the research of our group.

Key words :recombinant human erythropoietin (rhEPO) ;doping ;detection ;direct methods ;indirect methods ;review

兴奋剂问题一直是国际体坛面临的严峻挑战之一,随着 2008 年北京奥运会的日益临近,反兴奋剂工作作为奥运会工作的一个重要方面也受到社会的极大关注。使用兴奋剂不仅严重损害运动员的身心健康,干扰运动员的科学训练和刻苦训练,而且违背公平竞争原则和国际公认的体育道德,是一种欺骗行为,严重影响体育事业的健康、可持续发展。对于现代奥运会来说,激素类的检测,如兴奋剂重组人生长因子(rhGH)、重组人促红细胞生成素(rhEPO)、绒毛膜促性腺激素(HCG)等是分析化学的难点。其原因在于,在检测过程中难以将基因重组的激素与内源性激素区分开来,而且这些激素在血液和尿液中的半衰期短、浓度低。本文综述了近几年来采

用直接或间接方法检测 rhEPO 及其类似物的研究进展,并结合本小组的工作展望了兴奋剂检测的发展方向。

1 rhEPO 及其类似物的简单介绍

促红细胞生成素(EPO)是一种糖蛋白,绝大部分由肾脏产生,其最主要的功能是促进红细胞的生成,提高机体血红蛋白的浓度,临床上主要用于治疗肾性贫血和一些继发性贫血^[1]。1988 年出现了与天然 EPO 活性几乎相同的重组人 EPO 产品,它能够改善机体携氧能力,明显提高人体的红细胞数量及血红蛋白含量,从而提高人体运输氧的能力,提高人体最大摄氧量,增强人体耐力,对肌体的有氧工作

能力有明显的促进作用,可减少肌体的运动性疲劳,故而有人在比赛或赛马中滥用,以提高运动成绩。因此,从 1990 年起,国际奥委会(International Olympic Committee, IOC)正式将 EPO 列为禁用药物^[2]。

重组人促红细胞生成素是一种高度糖基化的糖蛋白,其分子骨架为 165 个氨基酸组成的肽链,具有 3 个 N 连接的糖基化位点和 1 个 O 连接的糖基化位点。天然 EPO 的相对分子质量约为 34 000,其中糖基部分的质量约占 40%^[3,4]。影响 rhEPO 生物学活性的部分主要是糖基上的唾液酸。唾液酸存在于糖链的末端,它是 rhEPO 的活性成分,唾液酸含量多少对其体内生物学活性高低起决定性的作用。2001 年,市场上又出现了一种新近开发的红细胞生成刺激蛋白(erythropoiesis stimulating protein, NESP),也称 Darbepoietin- α (DPO)^[5],它是在促红细胞生成素分子的基础上进一步改造形成的。与 rhEPO 不同的是,DPO 有 5 个糖基化位点,而不是 3 个;DPO 的糖基化位点增加,相应的其唾液酸含量也随之明显增加,与内源性和基因重组的 EPO 相比,DPO 的唾液酸含量更高,这就赋予了它更长的半衰期和生物活性。此外,随着商品的更新换代,EPO 的小分子仿照品,如 EPO-zeta^[6]和基因型兴奋剂,也会渐渐面世,这将给反兴奋剂工作者带来巨大的挑战。

2 rhEPO 及其类似物的检测

2.1 直接方法

2000 年,法国科学家 Lasne 和 de Ceaurriz^[7]首次报道了人尿中内源 EPO (uEPO)和 rhEPO 的检测方法。之后,Lasne 等^[8]完整详细地描述了该方法。该方法基于重组和内源 EPO 电荷上的微小差别,利用等电聚焦法(IEF)、二次印迹、化学免疫发光检测等技术来改进不同糖蛋白的分离效率和提高检测的灵敏度。具体来说该方法包括以下 4 个步骤:首先,将 20 mL 的尿样过滤(采用截留相对分子质量为 30 000 的超滤膜过滤以去除尿液中的盐和其他杂蛋白),并浓缩至 2 mL(使尿样中的 EPO 的浓度达到 1 500 IU/L);将浓缩后的尿液进行等电聚焦(由于 rhEPO 和 uEPO 之间存在等电点的差别,故可以通过 IEF 将其区分开来);之后,将凝胶上的条带转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上进行二次印迹(Double-blotting)(二次印迹可以有效地阻止第二抗体的非特异性结合,从而避免假阳性结果的出现);最后,在发光氨和过氧化氢的作用下进行化学发光检测。该方法可以检测出当事人在 3 d 内是否

注射过 rhEPO。

然而,该方法过程复杂,步骤繁多,容易出现误差,存在着很大的缺陷。近几年来,许多反兴奋剂工作者为了寻求更加简单、更加准确的检测方法进行着不断的探索。

毛细管电泳(CE)方法是最初研究最多的。de Frutos 等^[9]和 Sanz-Nebot 等^[10]利用涂层毛细管区带电泳法在缓冲溶液中加入腐胺(1,4-二氨基丁烷)、尿素、两性离子来抑制 EPO 在管壁上的吸附,实现其微多相性的分析。腐胺动态涂层毛细管柱虽然可实现 EPO 几种糖化体的基线分离,但平衡时间长,检测时间长(约 90 min),重现性差,缓冲溶液不稳定,并且因为所用缓冲溶液体系中含有过多的不挥发物质而无法采用质谱(MS)联用技术。Yu 等^[11]合成了 6,6-ionene 聚合物,并对毛细管进行永久涂层以分析 EPO 糖化体,结果证明该方法具有检测时间短(约 16 min)、重现性好的特点。该方法由于使用了易挥发的缓冲溶液,使得作者可采用 CE-MS 法对 rhEPO 和 uEPO 的混合物进行在线分离检测。与其他文献报道的方法相比,该方法具有检测时间短、分辨率高等特点,但方法的灵敏度和重现性还需要进一步提高。Balaguer 等^[12]采用新型的聚丙烯酰胺为基础的低常态(LN)毛细管涂层材料,并对毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱(CE-ESI-TOF MS)方法进行进一步的优化和改进,从而检测到了更多次要的低含量的 rhEPO 糖型。rhEPO 经 PNGase F 酶解后释放出自由的 N-多糖,由于 TOF MS 可以提供高的质量分辨率,故 N-多糖可以清楚地被辨认出是否经过了乙酰化、氧化、磺化,甚至是氨基对羟基的取代。该方法可更直接、完整地分析糖蛋白及多糖部分。

最近,我们小组经研究发现,以羧甲基壳聚糖作为毛细管的涂层材料对 rhEPO 及一些蛋白质的分析具有良好的效果^[13],而且这种方法可与质谱联用,相信对 rhEPO 糖型的分析能得到更好的分离效率。此外,我们还应用这一涂层的毛细管,用荧光试剂 3-(2-呋喃甲酰)喹啉-2-羧醛(FQ)对 rhEPO 进行在线衍生,并采用毛细管电泳和激光诱导荧光检测器联用技术进行分析检测,结果证明这种方法的灵敏度比紫外(UV)检测提高了 2 个数量级。

然而,对于人尿或血液中 rhEPO 的检测,其灵敏度还远远不够(EPO 在尿液中的浓度很低,约 1 IU/L,即约 10 ng/L)。因此,很多研究者把目光转向了实际样品的前处理和浓缩上。采用固定有单克隆或多克隆抗体的免疫亲和毛细管柱对样品中的 EPO 及 rhEPO 进行浓缩,再利用毛细管电泳进行

分离,以达到提高检测灵敏度的效果。Benavente 等^[14]采用接有 EPO 多克隆抗体的免疫亲和固相萃取毛细管选择性地预浓缩稀释溶液中的 rhEPO,再与毛细管电泳方法联用进行分离分析。实验证明,仅用 CE-UV 方法,其检出限高于 0.05 mg/mL;而用免疫亲和毛细管电泳方法,0.01 mg/mL 的 rhEPO 仍然有响应。但是该方法分析时间长,无法得到糖型的信息,故仍需要进一步研究和优化。与此相比,单克隆抗体具有更好的选择性。Bornemann 等^[15]报道了特异性多肽抗体用于 EPO 的分析方法。该方法通过毛细管等点聚焦能检测到低于 100 pmol 的 EPO。通过进一步的优化和降低样品量,该方法有望满足人体体液中内源 EPO 和 rhEPO 的分析和检测。除了采用抗体对 rhEPO 进行亲和富集之外,Nagano 等^[16]考察了采用凝集素对 rhEPO 进行富集和纯化的可能性。研究证明凝集素对糖蛋白的糖基片段有特异性的结合,可以用来选择性地富集 EPO。内源和重组 EPO 的唯一区别是在多糖部分,而凝集素可以识别多糖结构上的微小差别,这一独特的能力使凝集素很有可能被用于尿液中 rhEPO 的亲和富集及纯化处理中。但是在富集尿液时,尿液中的其他糖蛋白也会一并被富集,这就需要与其他纯化方法相结合,以达到最佳的效果。

近几年,毛细管电泳检测 EPO 的方法得到了迅速的发展,但关于高效液相色谱(HPLC)这个传统分析检测方法的研究也没有停止,尤其是随着质谱的高速发展,液相色谱与质谱联用方法也越来越多地被用于兴奋剂 rhEPO 的检测。Luykx 等^[17]利用 rhEPO 本身的荧光响应高于其紫外响应的特点,采用高效阴离子交换色谱-荧光检测法检测了 rhEPO,其线性范围为 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 。从检测灵敏度角度来看,该方法比较适用于药物产品中 rhEPO 的检测,而不适合对人体内流体中含量极低的兴奋剂的检测。与此类似,也有采用尺寸排阻 HPLC-荧光检测方法对 rhEPO 的二聚体及低聚体的总和进行定量的报道^[18]。该方法对药物产品中 rhEPO 总和的测定非常有效,其定量限可达到 80 ng/mL。此外, rhEPO 与其类似物 DPO 也被用在了马术比赛上,而马体的内源性 EPO 与人体内的内源性 EPO 不同。人体的内源性 EPO 与 rhEPO 的区别在于糖基上的微小差别,而由此导致等电点不同;马体的内源性 EPO 在氨基酸序列上就与 rhEPO 有区别,这一特点为马术比赛中兴奋剂 rhEPO 和 DPO 的检测(rhEPO 与 DPO 的氨基酸序列是非常相似的)打开了方便之门。Guan 等^[19]先采用免疫亲和的方法对实际样品进行浓缩,然后用胰蛋白酶酶解,针对人

EPO 与马 EPO 在胰蛋白酶酶解后得到不同肽段的特点,选择 rhEPO 和 DPO 都具有的同样的酶解片段 T6⁴⁶VNFYAWK⁵²和 T17¹⁴⁴VYSNFLR¹⁵⁰作为标志物,采用 LC-MS/MS 方法,利用标准样品中两个标志肽段的色谱保留时间和产生的子离子对实际样品中的 rhEPO 或 DPO 进行定性和定量。该方法对马血清中 rhEPO 和 DPO 的检出限达到了 0.1 ng/mL,而马血液中有有效的该兴奋剂浓度为 1 ng/mL,可见此方法具有足够的灵敏度和准确性,完全可以作为赛马是否使用了兴奋剂 rhEPO 和 DPO 进行判断和确认的方法。Singh 等^[20]也针对赛马中滥用 rhEPO 和 DPO 开发了一种新的检测方法。由于血浆中含有包括白蛋白在内的大量的高丰度蛋白,干扰了 rhEPO 和 DPO 的检测,作者采用固定有凝集素(*canavalia ensiformis* agglutinin, ConA)的萃取柱和固定有 EPO 抗体的免疫亲和柱相结合的方法,使得回收率达到 70% 左右;再经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行纯化,以胰蛋白酶和烯醇酶及肽段 EYEATLEECCAK 作为内标,利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)得到了线性的剂量-响应关系,分别对纯化后的整个蛋白及酶解产物进行定量分析。实验证明该方法对酶解片段检测的灵敏度高于整个蛋白的检测灵敏度,并使得采用 MALDI-TOF MS 对马体内 rhEPO 和 DPO 进行定量成为可能。

然而,虽然人们在研究兴奋剂 rhEPO 的检测上有了很大的进展,但仍然还没有一种方法来代替复杂的尿检法对人滥用 rhEPO 进行快速准确的检测。

2.2 间接方法

rhEPO 的使用会不可避免地导致全血或血清中一些生理生化指标的改变^[21,22]。这些指标包括可溶性转铁蛋白受体和与血红细胞及网织红细胞相关的各种参数,如红细胞压积(Hct)、血红蛋白含量(Hb)、网织红细胞压积(reticulocyte hematocrit, RetHct)、可溶性转铁蛋白(sTfr)浓度、血清中 EPO 浓度及巨细胞百分数(% Macro)等^[23]。依赖于对这些间接指标的检测,与没有使用 rhEPO 的正常人的评价结果相比较,可查明运动员是否滥用 rhEPO。

由堪培拉澳大利亚体育学院科学家发明的血检方法能够查出数星期内使用 EPO 的情况。该方法依据的是统计模型,即 ON-model 和 OFF-model:

$$\text{ON-model score} = 3.721\text{Hct} + 30.45\text{RetHct} + 0.1871 \ln(\text{EPO}) + 0.1267 \ln(\text{sTfr}) + 0.115 \ln(\% \text{Macro} + 0.1)$$

$$\text{OFF-model score} = 6.149\text{Hct} - 92.87\text{RetHct} - 0.1463 \ln(\text{EPO})$$

ON-model 适用于正在使用 EPO 的滥用者,若计算值大于 2.62 (男性)/2.47 (女性) 就为阳性; OFF-model 适用于近期 (2 ~ 4 周内) 使用过 EPO 但已经停药者,若计算值大于 2.24 (男性)/2.08 (女性) 为阳性^[24-26]。这个公式模型从数学角度增强了该检测方法的科学性,实践证明这种综合思维的方式是可行的,该方法已成为 2000 年悉尼奥运会 EPO 的初筛方法。但这一方法的准确度大受怀疑,有可能产生大量的假阳性反应。因此,只有将尿检法和血检法互相取长补短,两种方法联合使用才能在未来的兴奋剂检测中起到加强检测效果的作用。

我们实验室正致力于研究正常人体注射 rhEPO 前后其血清及尿液中小分子蛋白及多肽的变化,并进行大量的对比实验,试图寻求一种或几种小分子蛋白或多肽作为标志物来指示正常人体中是否注射了 rhEPO。如果我们能发现一种或几种这样的标志物,便可以间接快速、准确地检测人体中的 rhEPO。

3 总结与展望

本文综述了近几年来对兴奋剂 rhEPO 及其类似物检测方法的研究进展,从直接方法和间接方法两方面介绍了针对 rhEPO 检测而发展的新技术及其存在的优势和不足。然而,虽然人们在技术发展上有了很大的进步,但仍然还没有从根本上解决问题,仍然没有开发出一种快速准确的方法来代替步骤复杂的尿检法检测人体中的 rhEPO。对于科学工作者来说,我们一方面要从样品的前处理着手,采用免疫亲和技术尽可能地对尿样或血样中的 rhEPO 进行富集和浓缩,再采用有效的分离技术和高灵敏度的检测技术对内源和重组的 EPO 进行分离和检测;另一方面,针对 rhEPO 在体内代谢快的特点,利用代谢组学的思想,努力寻找一种间接的生物指示剂来准确地判断是否存在 rhEPO 滥用。总之,兴奋剂检测技术的发展任重而道远。随着分子生物学技术的发展,新的内源性兴奋剂药物不断产生,兴奋剂检测将面临巨大的挑战。我们一方面要加快反兴奋剂检测研究的步伐,另一方面还应当加大力度呼吁全世界人民提高对兴奋剂危害性的认识,同时应当教育运动员人人从自我做起,拒绝使用兴奋剂,使奥运会成为干净公正的体育盛会。

参考文献：

[1] Winearls C G, Pippard M J, Downing M R, et al. Lancet, 1986, 328 (8 517) :1 175

[2] Mottram D R. Sports Med, 1999, 27 (1) :1

[3] Davis J M, Arakawa T, Strickland T W, et al. Biochemistry, 1987, 26 (9) :2 633

[4] Krantz S B. Blood, 1991, 77 (3) :419

[5] Diamanti-Kandarakis E, Konstantinopoulos P A, Papailiou J, et al. Sports Med, 2005, 35 (10) :831

[6] Segura J, Pascual J A, Gutierrez-Gallego R. Anal Bioanal Chem, 2007, 388 (7) :1 521

[7] Lasne F, de Ceaurriz J. Nature, 2000, 405 (6 787) :635

[8] Lasne F, Martin L, Crepin N, de Ceaurriz J. Anal Biochem, 2002, 311 (2) :119

[9] de Frutos M, Cifuentes A, Diez-Masa J C. Electrophoresis, 2003, 24 (4) :678

[10] Sanz-Nebot V, Benavente F, Vallverdu A, et al. Anal Chem, 2003, 75 (19) :5 220

[11] Yu B, Cong H, Liu H, et al. J Sep Sci, 2005, 28 (17) :2 390

[12] Balaguer E, Demelbauer U, Pelzing M, et al. Electrophoresis, 2006, 27 (13) :2 638

[13] Fu X, Huang L, Gao F, et al. Electrophoresis, 2007, 28 (11) :1 958

[14] Benavente F, Hernandez E, Guzman N A, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 387 (8) :2 633

[15] Bornemann C, Burggraef T, Heimbuchel G, et al. Anal Bioanal Chem, 2003, 376 (7) :1 074

[16] Nagano M, Stubiger G, Marchetti M, et al. Electrophoresis, 2005, 26 (9) :1 633

[17] Luykx D M A M, Dingemanse P J, Goerdal S S, et al. J Chromatogr A, 2005, 1 078 (1) :113

[18] Gunturi S R, Ghobrial I, Sharma B. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43 (1) :213

[19] Guan F, Uboh C E, Soma L R, et al. Anal Chem, 2007, 79 (12) :4 627

[20] Singh A K, Gupta S. Proteomics Clin Appl, 2007, 1 (7) :626

[21] Audran M, Gareau R, Matecki S, et al. Med Sci Sports Exerc, 1999, 31 (5) :639

[22] Breyman C. Bailliere's Clin Endocrinol Metab, 2000, 14 (1) :135

[23] Wilber R L. Sports Med, 2002, 32 (2) :125

[24] Parisotto R, Ashenden M J, Gore C J, et al. Haematologica, 2003, 88 (8) :931

[25] Parisotto R, Gore C J, Emslie K R, et al. Haematologica, 2000, 85 (6) :564

[26] Parisotto R, Wu M, Ashenden M J, et al. Haematologica, 2001, 86 (2) :128