

促红细胞生成素和人生长激素兴奋剂检测方法的研究进展

郭 磊, 张朝阳, 唐吉军, 谢剑炜

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 在2008年世界反兴奋剂组织颁布的兴奋剂目录中, S2项肽类激素及相关品种均属于内源性生物大分子物质, 如何区分所检测物质属于外界摄入还是机体分泌是此项检测的重点与难点。本文针对其中应用最为普遍、研究较为深入的促红细胞生成素(EPO)和人生长激素(hGH)的检测, 从间接血液指标检测、直接检测途径等方面进行了分类评述, 侧重于从理化分析方法、免疫分析方法角度阐述识别及区分重组蛋白与内源性蛋白的新途径。

关键词: 内源性物质; 促红细胞生成素; 人生长激素; 兴奋剂检测方法; 进展

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2008)04-0437-07 栏目类别: 兴奋剂检测方法专栏

Recent advances in the detection of human erythropoietin and human growth hormone doping

GUO Lei, ZHANG Zhaoyang, TANG Jijun, XIE Jianwei

(Beijing Institute of Toxicology and Pharmacology, Beijing 100850, China)

Abstract: In the World Anti-doping Agency 2008 Prohibited List, the prohibited substances of S2 item are hormones and related substances, which are belonging to the endogenous biomacromolecules. How to identify the substances derived from endogenous secretion or exogenous administration is the main problem in doping control analysis and attracts more attention. The present report summarizes the main analytical strategies, including indirect blood tests and direct detection approaches developed to identify the presence of erythropoietin (EPO) and human growth hormone (hGH), which have wide pharmaceutical applications and thus been fully examined. The recent physico-chemical or immunoanalytical methodologies on the discrimination of recombinant and endogenous proteins are emphasized.

Key words: endogenous substances; erythropoietin (EPO); human growth hormone (hGH); doping detection methods; advance

在2008年世界反兴奋剂组织(WADA)颁布的兴奋剂目录中, S2项肽类激素及相关品种包括5大项(1)促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)。EPO属于单链酸性糖蛋白, 主要由肾脏皮质肾小管周围细胞及髓质外层细胞合成、分泌, 少量来自肝脏, 它的主要生理功能是促进骨髓红细胞的生成、提高机体血红蛋白的浓度、改善机体的携氧能力和增强耐力。(2)人生长激素(human growth hormone, hGH)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor I, IGF-I)、生长因子素。hGH主要由垂体分泌产生, 它最主要的生理功能是诱导肝细胞产生IGF-I在所有细胞中的基因表达; 而IGF-I具有促进软骨、骨、肌肉以及其他组织细胞的分裂增殖作用, 可促进机体的生长和代谢, 增加肌肉的大小和

重量。hGH的生理功能主要是通过IGF-I作为媒介完成(又称hGH/IGF-I轴^[1])。(3)促性腺激素。仅对男性禁用。(4)胰岛素。(5)促肾上腺皮质激素。

由于生物工程技术的飞速发展, 日益成熟的重组脱氧核糖核酸(DNA)技术为兴奋剂滥用提供了新的途径——重组蛋白和基因兴奋剂。代表性的重组蛋白如重组人促红细胞生成素(rhEPO)和重组人生长激素(rhGH)等早已被国际奥委会(IOC)列为禁用药物。因重组蛋白与内源性蛋白的结构极为相似, 其检测技术亟待发展。另外, 滥用重组蛋白除在短时间内大量增进运动效能外, 也具有显著的副作用。例如, EPO可能由于增加组织的摄氧量, 促进血管生长及抑制细胞凋亡而有利于肿瘤的生存及增生^[2]。因此, 从公平竞赛及机体健康角度, 对重

组蛋白兴奋剂进行有效的检测势在必行。本文针对 EPO 和 hGH 的检测技术的发展进行了分类评述。

1 促红细胞生成素

完整的内源性 EPO(uEPO)分子由多肽链和高分支及唾液酸化的糖链构成,其相对分子质量(M_r)为 32 ~ 39 kDa, pI 为 3.8 ~ 5.2; 其多肽链部分由 165 个氨基酸残基组成,含有 2 个二硫键(位于 7 ~ 161 位与 29 ~ 33 位)和 1 个 C 末端精氨酸残基。EPO 中的糖基化部分约占 40%,包括 3 个 N-连接糖基(Asn24, Asn38, Asn83)和一个 O-连接糖基(位于 Ser126)。它们的主要成分是甘露糖、岩藻糖、唾液酸等低聚糖。EPO 中的 N-连接糖基是影响 EPO 体内生物学活性的关键部分;而糖基上的唾液酸在维持 EPO 的酸性、阻断细胞表面半乳糖受体结合等方面有重要作用,更是 EPO 活性的决定成分^[3]。正常人体血浆中 EPO 的水平相对比较稳定,一般为 2 ~ 21 IU/L,在缺氧及贫血时 EPO 可高达 10^4 IU/L。rhEPO 各亚型和 uEPO 具有不同的糖基化特性,主要表现为 N 端唾液酸的含量不同。另外, rhEPO 比 uEPO 含有更多的二、三、四天线低聚糖^[4]。

因在治疗贫血方面有着广泛的用途,作为红细胞生成刺激剂的 rhEPO 及其衍生产品自 1987 年起开始商品化,目前及未来几年内上市的产品可分为四代:第一代自不同真核细胞系(中国仓鼠卵细胞(CHO)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、非洲绿猴肾细胞(COS-1)等)中表达出的 rhEPO。其中 EPO- α (Epogen, Amegen 公司和 Procrit/Eprex, Johnson & Johnson 公司)及 EPO- β (NeoRecormon/Eprex, Roche 公司)的氨基酸序列和 uEPO 完全相同,但各低聚糖型及 N 端唾液酸含量较 uEPO 有所不同,而新促红细胞生成蛋白(NESP)又称为 Darbepoetin- α , Nespo)(Dompè 公司)及 Aranesp (Amgen 公司),比 EPO- α 及 EPO- β 多出 2 个 N-连接寡糖链,具有比 EPO- α 和 EPO- β 更长的半衰期。第二代为人源细胞系(人纤维肉瘤细胞系 HF)中表达的 EPO- δ (如 Dynepo(Shire 公司),其与 uEPO 的结构及理化性质更相近甚至等同);以及聚乙二醇化的 EPO(如持续促红细胞生成激活剂 CERA, 较 NESP 在血液中更稳定和长效)。第三代为重组肽类(rPeptides),如 EPO 模拟肽 Hemomer® (AplaGen 公司)、Hematide™(Affymax 公司)等。第四代为口服红细胞生成激活剂,如低氧诱导因子(HIFs)稳定剂(FibroGen 公司)等^[5]。HIF 蛋白家族属于转录因子,可以在低氧条件下自然分泌,促进编码 EPO 和糖酵解酶基因的转录,从而可提高低氧

下的运动效能^[3]。第一代 rhEPO 产品目前在市场上占绝对主导地位,本文所涉及的检测方法多针对第一代 rhEPO 产品。

国际奥委会早在 1990 年即将 rhEPO 及其衍生产品列为兴奋剂,但因体内 EPO 含量的个体差异很大,甚至个体本身 EPO 值也因缺氧、贫血及随着 pH 值、运动状态、昼夜节律的变化而变化,因此一直缺乏对其行之有效的检测方法。直至 2000 年悉尼奥运会才对运动员实施血检、尿检结合的方法对其进行检测。该方法首先通过间接生物标记物检测,判定与 rhEPO 相关的一些血液指标物质浓度变化是否异常,对可疑样品再进行尿检,通过直接检测方法最终给出所检样品阳性与否的结论^[6]。

rhEPO 滥用的间接检测方法是通过一种或多种与红细胞合成与增殖活性相关的生物标志物开展检测实现的^[7]。已研究的间接生物标志物包括红细胞比容(haematocrit, Hct)、血红蛋白含量(haemoglobin, Hb)、网织红细胞百分数(%Ret)、血清可溶转铁蛋白受体(serum soluble transferrin receptor, sTfr)含量及在 rhEPO 使用期及 rhEPO 停用后的功能性缺铁相关的标志物等^[7-14]。经综合考虑种族、性别、居住地海拔等因素,拟定与增强红细胞生成相关的 5 种标志物——网织红细胞比容(reticulocyte hematocrit, RetHct)、血清 EPO 浓度、sTfr 浓度、Hct 及巨红细胞百分数(%Macro)的参考值范围后, Parisotto 等^[7,8]将之归并为统计学模型“ON-model”(Score = 3.721Hct + 30.45RetHct + 0.1871ln(EPO) + 0.1267ln(sTfr) + 0.115ln(%Macro + 0.1))和“OFF-model”(Score = 6.149Hct - 92.87RetHct - 0.1463ln(EPO))来检测 rhEPO 的滥用。“ON-model”用于 rhEPO 使用期的检测,大于阈值 2.66(男性)/2.40(女性)时判为阳性;“OFF-model”用于 rhEPO 停用 2 ~ 4 周内的检测,大于阈值 2.29(男性)/2.10(女性)时判为阳性。2000 年悉尼奥运会上 IOC 医学委员会即以“On-model”为标准进行了血检。

上述模式的不足之处在于其易受血液储存及运输条件的影响。Gore 等^[9,10]在“On-model”和“OFF-model”基础上,使用血色素浓度(h)、EPO 浓度(e)、sTfr 浓度(s)及%Ret 等 4 个参数建立了第二代统计学模式:两种 ON-model(ON-he = Hb + 9.74ln(EPO); ON-hes = Hb + 6.62ln(EPO) + 19.4ln(sTfr))和两种 OFF-model(OFF-hr = Hb - 60(%Ret)^{1/2}; OFF-hre = Hb - 50(%Ret)^{1/2} - 7ln(EPO))。较原来的统计学模式,第二代统计学模式对 rhEPO 使用期血样的检测更灵敏,这一点对

于仅使用低维持剂量的 rhEPO 及已停用 rhEPO 时间长达 3 周的运动员的血样检测尤为重要,亦利于对有 rhEPO 使用嫌疑的运动员进行赛外检查。但对于运动员注射中低剂量 rhEPO 48 h 时的血样,“ON-model”的检出率较低(13%~63%),这可能和体内血色素浓度还未显著升高有关^[11];对在中等海拔训练的运动员,性别因素对“ON-model”和“OFF-model”中的分数值有着较大的影响^[12,13],易造成误判,其根本原因在于血色素水平的变动幅度大。而最近发展的第三代模式则直接对运动员一定时期的血色素和 OFF-hr 数据进行监测和统计^[14]。

在间接检测方法中,一般通过免疫分析法测定血清中的 EPO 浓度,其中以酶联免疫分析(ELISA)、化学发光免疫分析(CHEM)和放射免疫分析(RIA)为主。目前使用的抗 uEPO 的单克隆抗体亦可以结合通常的 rhEPO 糖基亚型。例如,实验室间对两种商品化免疫分析法进行评价,一或两次冻融后及模拟传输条件时质控样品具有良好的稳定性,CHEM 法和 ELISA 法的数值间存在对应关系,但在精密度、准确度和灵敏度方面 CHEM 法均优于 ELISA 法^[15]。使用唾液酸苷酶去唾液酸化后 NESP 的免疫活性明显增高,导致 ELISA 法的灵敏度得到进一步提高,从而可检出最后一次皮下或静脉注射后 2~14 d 的 NESP 用药情况^[16]。免疫法固有的变异性,如批与批间抗体的差异、对一些血液学指标还缺乏统一的标准化方法等,则对间接法统计数据的判断造成了一定的误差。

直接检测外源性 EPO 的难点主要有以下 4 个方面(1)rhEPO 和 uEPO 的结构、组成极为相似。两者具有完全相同的氨基酸序列,仅在 N 端唾液酸的含量上略有不同,针对外源性 EPO 的单抗无法区别两者,这也是最关键的制约因素。(2)在体内的含量很低。正常人体液中 EPO 的含量仅为 pmol 水平(血液中约为 30~170 ng/L,相当于 2.3~13 IU/L),且体液中存在高浓度的其他蛋白(血清中蛋白含量为 60~80 g/L)^[17],这需要检测方法具有极高的灵敏度。(3)其半衰期短。一般报道静脉注射 rhEPO 的半衰期为 5~6 h^[4]。若按照一般人的注射量 200 IU/L 计算,血和尿中的 EPO 浓度分别于最后一次注射 rhEPO 7 d 和 4 d 后回归正常水平^[18]。(4)血样中的 EPO 浓度与时间和温度直接相关,即使在低温下传送样品,由于机械性碰撞也易造成样品降解,因此最好能尽快分析,且最好是现场分析,以避免红细胞分析物随时间和温度降解^[19]。

目前所有的直接检测方法都是针对 3 种重组蛋白和 uEPO 的糖基化所带电荷及结构差异展开的。

对实际样品中的重组蛋白进行直接检测时,世界反兴奋剂组织采用的方法是由 Lasne 等^[20,21]于 2002 年提出的等电聚焦(IEF)结合免疫双印迹法。样品经过有效富集后,EPO- α 、EPO- β (pI 均为 4.42~5.11),NESP 与 uEPO(pI 为 3.92~4.42)由于糖基化不同而导致等电点存在差别,可以在 IEF 上区分开来(见图 1)^[22,23]。双印迹法被用于克服免疫印迹中的非特异吸附问题^[24]。EPO 与其一抗 AE7A5(R&D 公司)在聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上杂交后,又于酸性条件下进行第二次印迹,此时抗原和干扰蛋白仍然留在第一张 PVDF 膜上,而一抗自抗原上解离转移到第二张膜,再用二抗标记第二张膜,即避免了经典免疫印迹策略中高浓度的尿液与生物素标记二抗间产生强烈非特异结合的弊端。结合化学发光法检测亲和素-辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白 G(IgG),可在含高于 50 mg/L 其他蛋白的富集尿液中检测出约 10 ng/L(1 IU/L)的 EPO。该方法的误检率仅为 0.006%~0.03%。最近,针对此方法研制了特定的图像分析软件 GASEpo,可进行阈值计算、条带分割和算法分类,从而达到对 EPO 定量的目的^[25]。

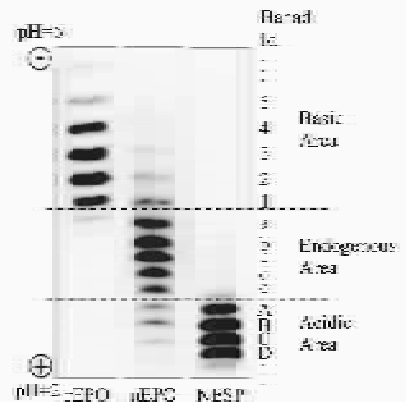


图 1 rhEPO、uEPO 和 NESP 的 IEF-化学发光免疫双印迹图像^[23]

Fig. 1 Image of rhEPO, uEPO and NESP obtained by the isoelectric focusing-double blotting method with chemiluminescent detection^[23]

此种 IEF-免疫双印迹法的缺点在于注射 EPO 后不能马上检测出来,仅在注射 EPO- α /EPO- β 后的 1~3 d、单次皮下注射 NESP 后的 1~7 d^[26]才能有效检测;微量的胰蛋白酶(5 μ g/mL)即可完全消除 EPO 的所有条带,故尿样处理时需要额外的保护步骤,例如加入蛋白酶抑制素或于运行前加热,从而保护 EPO 不被降解^[20,27,28];变性剂如尿素的存在与否对 EPO 的 pI 值影响较大^[20];基体会导致额外的复杂性因素出现,如在 EPO 区带处出现干扰蛋

白^[29,30];方法中使用的单抗 AE7A5 被认为和其他一些蛋白间易产生非特异性作用^[31];对图像进行直观观察结果判断时,较依赖于经验;其他的一些因素,如性别、竞赛中或竞赛后、尿液的稀释倍数与比重都可以对 IEF 结果产生影响^[28]。

实际应用中亦存在极少部分“不稳定尿样”,EPO 的 IEF 行为在此种尿样中不稳定,同一样品随分析时间不同,EPO 条带可能出现在不同的区域,因此 WADA 补充了在尿样中加入 rhEPO 及 NESP 孵育的步骤,以此比较尿样的稳定性^[23]。Belalcazar 等^[27]提出尿液中存在的唾液酸苷酶和硫酸酯酶可能是导致“不稳定尿样”中 EPO 行为变化的原因,提出可在尿样中加入选择性的竞争底物(如对硝基二茶酚硫酸酯或唾液酸乳糖)来消除不稳定尿样的影响。但若运动员仅使用低剂量的 rhEPO(如一般注射量 200 IU/L 的 1/10),注射 rhEPO 后将很快发生代谢和消除,仅观察图像有无碱性条带不能有效检出 rhEPO^[32]。某些长期锻炼的运动员的尿样中的 uEPO 的 pI 略偏碱性,称“非典型阴性条带”,易造成结果的误判^[17]。为解决此问题,Lasne 等^[33]将样品分析时可能出现的 16 条酸性、内源性、碱性条带进行线性判别统计分析,可有效地鉴别出非典型阴性条带及低注射剂量(6.7 ~ 10 IU/kg) rhEPO 的阳性样品。

2007 年,Lasne 等^[17]将 IEF-免疫双印迹法中加入了免疫亲和步骤,利用另一种单抗 9C21D11 (R&D 公司)进一步去除 pI > 5 的蛋白质的非特异性吸附,在人血清中实现了生理浓度水平的 EPO 的高灵敏度检测。血样中的 EPO(pI 为 4.1 ~ 4.9)与尿样中的 uEPO(pI 为 3.8 ~ 4.7)的等电性质相比,尿中的 uEPO 更系统性的偏酸性,此种酸化过程与尿中任何酶的活性无关,而是可能取决于肾脏对此激素的结构进行修饰的机制。除 EPO 抗体外,亦可利用植物凝集素具有专一和可逆地与游离的复合糖类中的单糖或寡糖结合的特性,在 IEF 后使用各种植物凝集素代替单抗特异性地捕集 EPO^[34]。

二维凝胶电泳(2-DE)通过分析物的 pI 及 M_r 的不同完成尿液中 rhEPO- α /rhEPO- β 的检测及与 uEPO 的分离。该方法包括尿液中蛋白的一步乙腈沉淀、加入内标、2-DE、一步 Western 印迹及化学发光免疫检测步骤,可实现重复及准确测定。在 2DE 方法中,尿液经沉淀、还原-烷基化后进行 IEF 和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), α -1-抗糜蛋白酶、 α -2-硫醇蛋白酶抑制剂及 α -2-巯基-糖蛋白前体等与 uEPO、rhEPO 具备交互反应活性,其 pI 点重叠,但可通过 M_r 不同而得到分

离^[35,36],但在 WADA 推荐使用的 1DE 方法中,上述蛋白并无非特异性干扰^[37]。对于人血清样本,SDS-PAGE 中的 uEPO 较 rhEPO 的 M_r 稍低,且呈现宽的条带,对应着高度糖基化带来的微观不均一性。人血清中的 EPO 的中性和带电荷的糖谱与 rhEPO 的糖谱有显著的差异,这种差异对建立直接检测 rhEPO 兴奋剂滥用方法有一定的参考意义^[38]。在 SDS-PAGE 法中使用双内标(NESP 和重组鼠 EPO),通过计算相对淌度可有效区分 uEPO 和 EPO- δ ,此法已成功用于单次注射 EPO(50 IU/L)4 d 后样品的检测^[39]。

毛细管电泳(CE)对糖蛋白微观不均一性所导致的电荷微小差异可以达成高效分辨,亦在鉴别 rhEPO 和 uEPO 方面得到了较广泛的应用。例如,基于单抗 5F12(Amgen 公司)与 EPO 的 N 端结构域为非构象依赖型结合的特性构造的单抗原结合位点的抗体片段 Alex Fluor 488-Fab,可在免疫亲和 CE 中通过抗原复合物检测出约 4 pmol/ μ L 的 uEPO^[40]。NESP 较之 rhEPO 唾液酸含量更高,在 CE 中亦表现出与 EPO- α /EPO- β 不同的糖微观不均一性^[41]。CE 虽能高效区分 uEPO 和 rhEPO 的不同亚型,但目前开发出的方法中,缓冲液组成复杂,有时毛细管需要特殊的涂层方能与不同的检测器如紫外检测器(UV)、激光诱导荧光检测器(LIF)或质谱检测器(MS)兼容^[42]。另外,制约 CE 在检测 EPO 方面应用的最主要因素是其检测灵敏度差,目前 CE-MS 对 rhEPO 的检出限仅为 0.3 mg/mL,远高于实际样品中 EPO 和 rhEPO 的浓度水平^[43,44]。

电喷雾电离质谱(ESI-MS)与基体辅助激光解吸-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)已成为鉴定 rhEPO 等糖蛋白的有力工具,尤其是在糖蛋白的结构信息(包括相对分子质量、肽图、糖蛋白的不均一性、糖基化位点、糖链分枝类型、特定位点上糖基化的修饰情况等)分析方面,亦达到了较高的检测灵敏度和准确性。使用 MALDI-TOF-MS 及 MALDI-四极杆离子阱/反射式飞行时间质谱(QIT/RTOF-MS),在糖肽水平上,根据位点特异性糖基化模式的不同,可较容易地区分 3 种 rhEPO(Erypo, NeoRecormon, Aranesp),这无疑为区分 EPO- α /EPO- β 或 NESP 的使用提供了潜在的生物标志物。但此点还需结合 EPO 在人体的代谢途径进一步考虑^[45]。此法灵敏度较高,对 3 种 rhEPO 的检出限(LOD)为 25 ~ 50 fmol^[46]。CE-ESI-MS 结合阳离子聚合物涂层毛细管,可直接鉴别出 uEPO 和 rhEPO^[44];CE-MALDI-TOF-MS 法中,CE 可在线移去非糖基化蛋

白、盐以及中性、阴性物质,可鉴别出质量浓度为 1 g/L 的 rhEPO 的 135 个糖基化(包括乙酰化)位点/类型^[47]。Kawasaki 等将 LC-MS 及石墨化碳柱结合,可对 CHO 细胞表达的 rhEPO 的各种糖基化位点、与位点特异性直接相关的糖微观不均一性、糖的结构进行分析^[48]以及鉴别出 BHK 细胞表达的 rhEPO 所特异的具有硫酸化 N-连接多糖部分^[49]。结合去除糖基化及对 Eprex 和 Aranesp 进行特异性 Glu-C 蛋白酶内切,可以显著提高 MS 的灵敏度,从而用 nano-HPLC-ESI-MS-MS 检出 fmol 水平的两种 rhEPO 所共有片段 E12-Glu-C 肽。依此途径,用 E5 或 E10 肽的存在或缺失来区分 EPO- α 和 NESP^[50]。2-DE 结合蛋白质组学方法(LC、MALDI-TOF-MS、糖苷酶酶解及肽指纹图谱分析)可达到 25 pmol/点的 LOD,且鉴别出酸性条带富含四天线唾液酸化糖苷结构,迁移至正极一端的条带则缺少唾液酸结构^[51]。但质谱仪器昂贵,对样品的前处理要求较高,目前仅针对药物样品(如标准品或市售商品化注射液等)展开对 EPO 及其重组蛋白的研究。

人体注射 rhEPO 后属于红细胞的特定基因片段的信使核糖核酸(mRNA)表达存在差异,此点可应用到 rhEPO 滥用的检测中。例如观察到了色素- β 、轻链铁蛋白及鸟氨酸脱羧抑制酶的 mRNA 水平的显著上调^[52],此种途径可成为“OFF-model”和“色素护照”的有力补充,为高通量的蛋白质组学技术等应用于检测 rhEPO 及其衍生产品的滥用奠定了良好的基础。

2 人生长激素

垂体分泌的 hGH 中 75% 为 22 kD 亚型;而切割掉第二密码子导致第 32~46 氨基酸残基丢失,产生另一个 20 kD 亚型,占垂体分泌 hGH 的 5%~10%;其他的垂体 GH 包括脱酰胺化形式、N-乙酰化形式和各种 GH 寡聚体^[53]。而 rhGH 仅以一种 22 kD 亚型存在,自 1988 年起已有数种商品上市,主要有除 N 端多一个甲硫氨酸(Met)残基外,其他氨基酸序列与 22 kD 内源性 hGH 相同的 Met-rhGH(如 Protropin(Genentech 公司))和 191 个氨基酸序列完全相同的 rhGH(如我国生产的金磊赛增(Jintropin,长春金赛公司))。

hGH 的固有特性使其被检测较 EPO 更为困难,主要体现在(1)hGH 的 22 kD 亚型和 rhGH 在结构上基本(仅相差一个 Met 残基)或完全等同。(2)rhGH 在血液中的浓度为 ng/L 水平,静脉注射后在血液中的半衰期仅约为 15~20 min,通过皮下或肌肉注射后在血液中的浓度于 1~3 h 后达到峰

值,48 h 后即于循环血液中检测不出,两种 GH 亚型的比值恢复正常。(3)尿液中的 hGH 检测仍然是难点。成年人垂体分泌 GH 的平均值为 500~875 $\mu\text{g/d}$,其中仅 0.001%~0.010% 被排泄到尿液中,致使 hGH 在尿中的浓度远低于在血中^[54];较之 EPO 在尿中的浓度还要低(为其浓度的 1%~0.1%)。(4)垂体分泌 GH 是间歇式的脉动分泌(成年男子分泌量为 0.4~1.0 mg/d),因此不可能视单个样品 GH 浓度的增加为违禁^[55]。(5)同样,体内 hGH 的浓度依人的睡眠、营养、温度、锻炼情况和体内活动如血糖浓度、情绪波动情况等不同而变化极大,不同个体间 hGH 的差异也很大。

目前针对 rhGH 的间接检测方法是基于系统地研究 GH/IGF-I 轴而筛选出的影响肌肉生长和刺激骨髓的几种血液学指标^[55]以及建立这些因子的浓度的正常范围数据库。测定血液学指标时多采用免疫方法,如 RIA 法及 ELISA 法等^[56]。

GH 通过调节 IGF-I 的活性来激发合成代谢活性,IGF-I、人胰岛素样生长因子结合蛋白-2(IGFBP-2)、酸不稳定亚单位(ALS)、IGF-II、IGFBP-3 等的半衰期较 GH 更长,在血清中较 GH 更稳定,它们的含量水平是了解 GH/IGF-I 轴变化的主要指标^[57,58]。在上述多种 GH 依赖型肽中,IGF-I 是暴露于高于生理浓度 GH 条件下的最特异、最敏感的标志物^[58]。但间接标志物如 IGF-I 或 IGFBPs 随年龄、性别、体重、生理活性、饮食及激素使用情况不同个体差异性很大,很难界定 hGH 滥用时的阈值水平;另外,血液循环中的 GH 相关标志物可被摄入的糖皮质激素或 β -阻滞剂等非正常抑制,例如口服或透皮吸入雌激素可抑制 IGF-I、IGFBP-3 及 ALS 的浓度^[59]。

GH 可改变骨胶原和骨的代谢,短期 rhGH 摄入可大量定量诱导产生骨和骨胶原的代谢^[60,61],其生化相关标志物,如 III 型原骨胶原的 N 末端肽(N-terminal peptide of type III procollagen, PIII NP)、骨胶原 I 的 C 末端端肽(collagen I C-terminal telopeptide, ICTP)、骨钙蛋白(osteocalcin)和骨胶原 I 的 C 末端原肽(collagen I C-terminal propeptide, PICP)等随 rhGH 使用剂量的增加而在血浆中的浓度上升,有较好的时间稳定性,并且骨标志物的半衰期较 rhGH 更长^[58,60]。但因 hGH/IGF-I 轴与骨折愈合相关,例如骨牵张期的 IGF-I、IGFBP-3 和 hGH 含量均显著升高^[62],需谨慎评价及给出骨标志物的正常水平及阈值;另外,对于青春期、成骨期的运动员,骨标志物的日内、日间变化区间需要特别考察^[63]。

联合应用影响肌肉生长和骨代谢的指标(如

IGF-I 和 P III NP^[58, 64, 65]; IGF-I、P III NP 和 ICTP^[66]) 评判 hGH 的摄入,可显著增加方法的灵敏度和特异性。间接检测方法的优点在于,尽管 rhGH 在体内的半衰期只有 15 ~ 20 min,但由 rhGH 导致的体内指标的变化可以维持较长时间(如最后一次用药后的 2 周内)而仍可被检测^[61]。但其无法确定体内含有超过正常范围的 hGH 是体外摄入、疾病或其他原因所致,故仍不能单独作为 hGH 的检测判据。

直接检测方法亦基于血检,即利用免疫分析,评估外源性 GH 对垂体分泌 GH 亚型的影响。rhGH 仅以一种 22 kD 亚型存在,但内源性 hGH 则为不同亚型的混合物。摄入 rhGH 将会抑制垂体分泌内源性 hGH,因此若检测到 22 kD 亚型异常升高,则有理由认为存在 rhGH 的滥用^[67]。基于人血液中的 rhGH 和 hGH 间的结构差别一直存在,不因年龄、性别、人种及运动情况变化而变化的原则,Wu 等^[68]开发了一种示差免疫分析途径,使用夹心法检测 rhGH 和垂体分泌的 hGH。Rec 分析(重组 22 kD GH 亚型分析, recombinant 22 kD GH assay)(单抗 5D7 和 8B11)识别 22 kD hGH 亚型和 rhGH, Pit 分析(所有垂体分泌 GH 亚型分析, all pituitary isoforms assay)(单抗 1B3 和 8A9)识别所有 GH 亚型,最终以 Rec/Pit 分析的 GH 浓度比判定是否存在 rhGH。此种策略已用于雅典及都灵奥运会。此直接法较为可靠,但达成有效检出的时间范围太窄($t < 36\text{ h}$)^[68],且 GH 在血液中半衰期极短,血浆中 GH 结合蛋白的存在及 GH 与同源的多肽激素间的交互反应活性给此法造成了一定干扰。这也许是导致 2004 年雅典奥运会最终宣布对 hGH 的检测结果 0 例为阳性的部分原因;另外,因 20 kD GH 的摄入可以抑制内源性 22 kD 亚型的分泌,若运动员摄入一种 22 kD 和 20 kD 亚型 rhGH 的平衡混合物,此方法将无能为力。

近年来,已有将新的分离方法、新的蛋白质组学技术等应用于检测 rhGH 滥用的报道。例如,使用 LC-MS/MS 对 GH 的标志物 IGF-I 和 IGFBP-3 进行定量,线性范围分别为 2 ~ 8 ng/L(IGF-I)和 4 ~ 10 ng/L(IGFBP-3)^[69];使用 LC-MS/MS 分离 hGH 和塞里维辛酵母菌表达的 N^α-乙酰化-Met-rhGH^[70];以 LC-MSⁿ 蛋白质组技术可于高浓度蛋白存在的血浆中以特征胰蛋白酶解后的肽段对加入的低浓度(亚 fmol 水平,约 16 μg/L)的 hGH 进行准确鉴定^[71];使用转录组(transcriptomic)或蛋白质组学技术也为检测 rhGH 滥用后的基因表达的差异提供了新的途径。

3 结论与展望

改进现有的检测方法,扩大 EPO 和 hGH 的检测窗口是所有间接和直接法发展的方向。间接法的优点在于得到真正健康状况下的指标,但因许多因素如体外注射、疾病、超负荷体育锻炼以及免疫方法本身存在较大的误差,均可能导致假阳性或假阴性,无法最终确定体内含有超过正常范围的 EPO 或 hGH 的来源,还需使用一系列方法来提高灵敏度和特异性来降低假阳性和假阴性数量。另外,多个血液学参数联检的方法仍在发展。直接法中,质谱方法发展迅速,可区分结构上的细微差异。但受限于检测灵敏度及缺乏特异的样品前处理手段,目前尚未开展人体内药物摄入后受代谢途径影响后重组蛋白的检测方法研究。将来的研究方向将集中于确证新型 EPO 的结构信息、分析运动员的 EPO 糖型分布与不同运动时期之间的关系等。

免疫测定法以抗原、抗体反应的特异性和亲和力为基础,具有快速、灵敏、简易的特点。另外,基于 SELEX(指数富集的系统配基进化, systematic evolution of ligands by exponential enrichment)体外筛选技术得到的寡核苷酸适配体(aptamer)与靶分子之间分子识别功能与抗体极为相似,但与蛋白质类抗体相比,适配体与靶分子间具有更高的亲和力和特异性,甚至可区分识别靶分子结构上的细微差异,如高选择性识别二糖的差向异构体、端基异构体和不同糖苷键的连接方式^[72]。适配体具有核酸自身稳定性强、变性复性快速可逆、易功能化修饰与标记等诸多优点,可望将来研发出能特异区分内外源 EPO 的适配体。研发能够区分内外源 EPO、rhEPO- α /rhEPO- β 和 NESP 的抗体^[73, 74]、适配体,开发如过滤、亲和提取富集^[75]等样品前处理技术,将减小样品中的蛋白干扰,提高方法的灵敏度和特异性,减少误检率。

新型方法如基因组签名(genomic signatures)、蛋白质组学和代谢组学及对化学/生物-生理因素的径向整合等亦将在未来的检测手段中占有重要的位置。

参考文献:

[1] Le Roith D. *New Engl J Med*, 1997, 336(9): 633
 [2] Tentori L, Graziani G. *Pharmacol Res*, 2007, 55: 359
 [3] Higuchi M, Oh-eda M, Kuboniwa H, et al. *J Biol Chem*, 1992, 267(11): 7 703
 [4] Choi D, Kin M, Park J. *J Chromatogr B*, 1996, 687: 189
 [5] Melnikova I. *Nature Rev Drug Discov*, 2006, 5: 627
 [6] Tsiyou M, Kioukia-Fougia N, Lyris E, et al. *Anal Chim Acta*, 2006, 555: 1

- [7] Parisotto R , Gfore C J , Emslie K R , et al. *Haematologica* , 2000 , 85(6) : 564
- [8] Parisotto R , Wu M , Ashenden M J , et al. *Haematologica* , 2001 , 86(2) : 128
- [9] Gore C J , Parisotto R , Ashenden M J , et al. *Haematologica* , 2003 , 88(3) : 333
- [10] Sharpe K , Hopkins W , Emslie K R , et al. *Haematologica* , 2002 , 87(12) : 1 248
- [11] Connes P , Caillaud C , Simar D , et al. *Haematologica* , 2004 , 89(7) : 891
- [12] Ashenden M J , Sharpe K , Schoch C , et al. *Haematologica* , 2004 , 89(8) : 1 019
- [13] Ashenden M J , Gore C J , Parisotto R , et al. *Haematologica* , 2003 , 88(9) : 1 053
- [14] Sharpe K , Ashenden M J , Schumacher Y O. *Haematologica* , 2006 , 91(3) : 356
- [15] Abellan R , Ventura R , Pichini S , et al. *J Pharmaceut Biomed Anal* , 2004 , 35(5) : 1 169
- [16] Wide L , Wikstroem B , Eriksson K. *Upsala J Med Sci* , 2003 , 108(3) : 229
- [17] Lasne F , Martin L , Martin J A , et al. *Int J Biol Macromol* , 2007 , 41 : 354
- [18] Souillard A , Audran M , Bressolle F , et al. *Br J Clin Pharmacol* , 1996 , 42 : 355
- [19] Robinson N , Mangin P , Saugy M. *Clin Lab* , 2004 , 50 : 317
- [20] Lasne F , Martin L , Crepin N , et al. *Anal Biochem* , 2002 , 311 : 119
- [21] Lasne F , de Ceaurriz J. *Nature* , 2000 , 405 : 635
- [22] Catlin D H , Breidbach A , Elliott S , et al. *Clin Chem* , 2002 , 48(11) : 2 057
- [23] Catlin D , Howe C , Lasne F , et al. WADA technical document-TD2004EPO. [2007-12-01]. http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/td2004epo_en.pdf
- [24] Lasne F. *J Immunol Methods* , 2001 , 253 : 125
- [25] Bajla I , Hollaender I , Minichmayr M , et al. *Comput Meth Prog Bio* , 2005 , 80 : 246
- [26] Lamon S , Robinson N , Mangin P , et al. *Clin Chim Acta* , 2007 , 379 : 145
- [27] Belalcazar V , Gallego R G , Llop E , et al. *Electrophoresis* , 2006 , 27 : 4 387
- [28] Lamon S , Robinson N , Sottas P E , et al. *Clin Chim Acta* , 2007 , 385 : 61
- [29] Buellens M , Delanghe J R , Bollen M. *Blood* , 2006 , 107(12) : 4 711
- [30] Catlin D , Green G , Sekera M , et al. *Blood* , 2006 , 108(5) : 1 778
- [31] Franke W W , Heid H. *Clin Chim Acta* , 2006 , 373 : 189
- [32] Ashenden M , Varlet-Marie E , Lasne F , et al. *Haematologica* , 2006 , 91(8) : 1 143
- [33] Lasne F , Thioulouse J , Martin L , et al. *Electrophoresis* , 2007 , 28 : 1 875
- [34] Nagano M , Steubiger G , Marchetti M , et al. *Electrophoresis* , 2005 , 26 : 1 633
- [35] Caldini A , Moneti G , Fanelli A , et al. *Proteomics* , 2003 , 3 : 937
- [36] Khan A , Grinyer J , Truong S T , et al. *Clin Chim Acta* , 2005 , 358 : 119
- [37] Rabin O P , Lasne F , Pascual J A , et al. *Clin Chim Acta* , 2006 , 373 : 186
- [38] Skibeli V , Nissen-Lie G , Torjesen P. *Blood* , 2001 , 98(13) : 3 626
- [39] Kohler M , Ayotte C , Desharnais P , et al. *Int J Sports Med* , 2008 , 29(1) : 1
- [40] Bornemann C , Burggraef T , Heimbuchel G , et al. *Anal Bioanal Chem* , 2003 , 376 : 1 074
- [41] Sanz-Nebot V , Benavente F , Giménez E , et al. *Electrophoresis* , 2005 , 26 : 1 451
- [42] López-Soto-Yarritu P , Díez-Masa J C , de Frutos M , et al. *J Sep Sci* , 2002 , 25 : 1 112
- [43] de Frutos M , Cifuentes A , Díez-Masa J C. *Electrophoresis* , 2003 , 24 : 678
- [44] Yu B , Cong H , Liu H , et al. *J Sep Sci* , 2005 , 28 : 2 390
- [45] Stuebiger G , Marchetti M , Nagano M , et al. *J Sep Sci* , 2005 , 28 : 1 764
- [46] Stuebiger G , Marchetti M , Nagano M , et al. *Rapid Commun Mass Spectrom* , 2005 , 19(5) : 728
- [47] Neusuess C , Demelbauer U , Pelzing M. *Electrophoresis* , 2005 , 26 : 1 442
- [48] Kawasaki N , Ohta M , Hyuga S , et al. *Anal Biochem* , 2000 , 285 : 82
- [49] Kawasaki N , Haishima Y , Ohta M , et al. *Glycobiology* , 2001 , 11(12) : 1 043
- [50] Stanley S M R , Poljak A. *J Chromatogr B* , 2003 , 785 : 205
- [51] Llop E , Gallego R G , Belalcazar V , et al. *Proteomics* , 2007 , 7 : 4 278
- [52] Varlet-Marie E , Audran M , Lejeune M , et al. *Haematologica* , 2004 , 89(8) : 991
- [53] Sonksen P H. *J Endocrinol* , 2001 , 170 : 13
- [54] Saugy M , Robinson N , Saudan C , et al. *Br J Sports Med* , 2006 , 40(Suppl 1) : i35
- [55] Healy M L , Dall R , Gibney J , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 2005 , 90(2) : 641
- [56] Abellan R , Ventura R , Pichini S , et al. *Clin Chem Lab Med* , 2005 , 43(1) : 75
- [57] Wallace J D , Cuneo R C , Baxter R , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 1999 , 84(10) : 3 591
- [58] Knies A , Ziegler E , Kratzsch J , et al. *Anal Bioanal Chem* , 2003 , 376 : 696
- [59] Kam G Y , Leung K C , Baxter R C , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 2000 , 85(5) : 1 918
- [60] Wallace J D , Cuneo R C , Lundberg P A , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 2000 , 85(1) : 124
- [61] Longobardi S , Keay N , Ehrnborg C , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 2000 , 85(4) : 1 505
- [62] Weiss S , Baumgart R , Jochum M , et al. *J Bone Miner Res* , 2002 , 17(7) : 1 280
- [63] Levine M A. *J Pediatr Endocrinol Metab* , 2003 , 16(Suppl 3) : 661
- [64] Erotokritou-Mulligan I , Bassett E E , Knies A , et al. *Growth Horm IGF Res* , 2007 , 17(5) : 416
- [65] Powrie J K , Bassett E E , Rosen T , et al. *Growth Horm IGF Res* , 2007 , 17(3) : 220
- [66] Sartorio A , Jubeau M , Agosti F , et al. *J Endocrinol Invest* , 2006 , 29(3) : 237
- [67] Wallace J D , Cuneo R C , Bidlingmaier M , et al. *J Clin Endocrinol Metab* , 2001 , 86(4) : 1 731
- [68] Wu Z D , Bidlingmaier M , Dall R , et al. *Lancet* , 1999 , 353 : 895
- [69] Kirsch S , Widart J , Louette J , et al. *J Chromatogr A* , 2007 , 1 153 : 300
- [70] Jung C , Lee Y P , Jeong Y R , et al. *J Chromatogr B* , 2005 , 814 : 53
- [71] Wu S L , Amato H , Biringer R , et al. *J Proteome Res* , 2002 , 1 : 459
- [72] Yang Q , Goldstein I J , Mei H Y , et al. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1998 , 95 : 5 462
- [73] Murray A K. US 7033774. 2006
- [74] Giménez E , de Bolós C , Belalcazar V , et al. *Anal Bioanal Chem* , 2007 , 388 : 1 531
- [75] Benavente F , Hernández E , Guzman N A , et al. *Anal Bioanal Chem* , 2007 , 387 : 2 633