基因兴奋剂检测方法及检测技术应用述评

刘风君[1]，卢红梅[2]，熊正英[1]
（1.陕西师范大学 体育学院，陕西 西安 710062；2.安阳师范学院 体育学院，河南 安阳 455002）

摘 要：随着基因治疗技术的成功应用和不断完善，基因兴奋剂将成为体育界和世界反兴奋剂机构(WADA)面临的新威胁。因此，开发切实可行的基因兴奋剂检测方法是各国科学家所共同努力的目标。在总结前人成果的基础上，从基因、蛋白质、载体和免疫反应方面对基因兴奋剂的检测进行综述，并展望新技术在检测中的应用。

关 键 词：运动医学；基因兴奋剂；基因治疗；运动能力；综述
中图分类号：G804.5 文献标识码：A 文章编号：1006-7116(2010)06-0102-05

Review of the application of gene stimulant test methods and technologies

LIU Feng-jun[1]，LU Hong-mei[2]，XIONG Zheng-ying[1]
（1.School of Physical Education，Shaanxi Normal University，Xi’an 710062，China；
2.School of Physical Education Anyang Normal Institute，Anyang 455002，China）

Abstract: With the successful application and constant perfection of gene therapy technologies, gene stimulants will become new threats to the sports community and the World Anti-Doping Agency (WADA). Therefore, developing practically feasible gene stimulant test methods is the goal to be achieved jointly by scientists in countries all over the world. On the basis of summarizing achievements made by predecessors, the authors gave an overview of the testing of gene stimulants in terms of genes, proteins, carriers and immune reactions, and expected the application of new technologies in the testing.

Key words: sports medicine；gene stimulant；gene therapy；sports capacity；overview

在 2008 年最新的兴奋剂禁用清单中把基因兴奋剂定义为：非治疗目的的使用细胞、基因、遗传物质或调节基因的表达来提高运动员运动能力[1]。虽然真正应用的基因兴奋剂还没有出现，但是目前发现了很多可提高运动能力的“运动基因”，并对“运动基因”进行了很深入的研究[2]。从提高运动能力的机制划分，可将“运动基因”分为 3 类：①与骨骼肌能力相关基因，如增加肌肉体积的 Myostatin 基因；影响肌肉代谢及再生的 HGH、IGF、MGF 和转录因子 Pax7 基因；增加Ⅰ型肌纤维比例的受体蛋白 PPAR-delta 基因。②与氧气供应相关基因，如增加红细胞数量的 EPO 基因；增加组织中血管数量的 VEGF 基因。③与能量供应相关基因，如增加肌肉对脂肪酸摄取的脂肪酸转运蛋白 FATP1，CD36 基因；增加肝脏中葡萄糖释放和提高肌肉对葡萄糖摄取的葡萄糖运输蛋白 GLUTs 和胰岛素受体基因[3]。随着基因治疗技术(特别是基因导入系统)的不断完善，基因兴奋剂不再遥远，研究基因兴奋剂检测技术是急需解决的课题。

1 基因兴奋剂的检测

1.1 基因水平的检测

因为 cDNA 中没有内含子，所以有可能把编码转基因蛋白的 mRNA 反转录得到的 cDNA 从自身的 DNA 序列中区分出来。转基因序列构建的任何非人类起源序列或异常序列在理论上都可以由 PCR 检测到，事实上由于自身多种多样的调整基因序列和其它序列可能被并入转基因中，此时检测到的转基因不一定是由基因兴奋剂引起的，所以这一检测结果并不准确。为了进一步区分转基因，需要设计和实施大量的分子测试，这将耗费大量的人力、物力和财力。如果有一个条码

收稿日期：2009-10-20
作者简介：刘风君（1983-），男，硕士研究生，研究方向：运动生化与营养。

系统(bar-cording systerm)，类似于跟踪基因改造的农产品，将会很容易识别转基因序列[4]。探寻转基因还可以使用以 DNA 为基础的生物传感器，能够从内源性 DNA 序列中选择性分辨转基因的 cDNA 序列，这需要开发合适的探针。例如，针对转基因 cDNA 序列和内源性外显子结合序列的特异性单链 DNA 探针，将其固定在传感器表面，这样只有样品中存在与固定探针相结合的目的 cDNA 时，杂交反应才能发生。带有 cDNA 的样品与探针发生积极的反应就能够确定转基因的存在[5]。通过将不同的探针固定于传感器的表面，可以实现对多个基因序列的同时检测，从而使生物传感器技术在检测基因兴奋剂中发挥更重要的作用。

1.2　转基因蛋白的检测

在基因治疗中，监视基因转移和随后的表达通常是通过检测转基因产物或载体组件来完成的。基因治疗通常是取代有缺陷的基因，因此几乎没有内源性蛋白表达升高。在基因兴奋剂中，转基因不会取代缺陷基因，因此转基因蛋白的检测可依靠转基因翻译后修饰的细微变化或者蛋白质表达水平的变化。下面以 EPO 和 GH 为例。

在基因兴奋剂中，转基因蛋白是运动员自身细胞通过导入外源基因产生的，它与内源性蛋白几乎相同。然而，内源性蛋白和转基因蛋白在结构上有细微的差别。Lasne 和同事[6]发现：在强力霉素调节启动的控制下，在猕猴肌肉内注射含有 EPO cDNA 的 AAV（腺相关病毒）载体，注射前和注射后检测到的 EPO 亚型在等电聚焦下不同，即它们的电荷是不同的。肌肉组织中转基因蛋白的异位表达会引起内源性 EPO 翻译后修饰的不同，这可能是等电性能不同的一个因素。这可以作为转基因蛋白检测突破口。

目前检测 hGH 有两种方法：一种方法是使用免疫分析法检测内源性 hGH 的不同亚型。rhGH 只有一种亚型，分子质量为 22 ku，而内源性 hGH 存在多个亚型，分子质量也不相同。由于负反馈的调节，注射 rhGH(22 ku)后垂体分泌 hGH 将会受到抑制。因此，用免疫分析法分析血清，如果显示 22 ku 的 hGH 蛋白水平异常升高，这就表明非法使用了 rhGH[7]。另一种方法避免了检测 hGH 蛋白本身，而是着重于 hGH 作用引起的药效学指标，即受 hGH 调节的参数的变化。hGH 通过产生胰岛素样生长因子(IGF-1)发挥主要功能。有实验表明给运动员(15 例)服用 hGH 0.06 IU/(kg ·d) 14 d，服用 3 d 后 IGF-1 浓度开始快速地升高[8]。

1.3　载体检测

1)非病毒载体检测。

在循环系统中测量 pDNA(质粒 DNA)的机率很小，因为 pDNA 在血浆中的半衰期很短，被血浆核酸快速降解，由肝细胞清除，然而在毛细血管床内保持良好。在小鼠静脉中注射 pDNA 30 min 以后，在血浆中只有 0.3%到 13%的 pDNA 被检测到(这取决于 pDNA 的表达)[9]。Parker 等[10]发现在静脉内注射 pDNA 2 d 后，血液中的含量非常低，然而 4 周后就检测不到了。在肌肉注射后，pDNA 限制在注射位点长期持续存在。在一项对肌肉萎缩的临床研究中，肌肉注射载体 3 周后用肌肉活检在注射部位检测到质粒骨架(plasmid backbone)[11]。

2)病毒载体检测。

(1)腺相关病毒载体(AAV vector)：虽然许多 AAV 的血清型在人体内普遍存在，但在健康人的血液中 AAV DNA 通常检测不到。在一项对血友病 B 患者的临床试验中，在肌肉注射后 7 d，载体 DNA 在血清中能被检测到；尿和唾液在注射后 1~2 d 内呈阳性，之后就呈阴性了[12]。沿静脉向狗的骨骼肌注射，在此后的 5 d 内血清中 AAV 载体呈阳性，8 周后仅存在注射的肌肉内[13]。由以上信息可知，载体 DNA 能够长期持续存在(数月之久)，但是大部分局限于存在注射的肌肉内。

(2)腺病毒载体(Ad vector)：Ad DNA 通常在血液中是检测不到的。肝癌患者中，在肿瘤内注射 24 h 及更长时间通过酶联免疫吸附试验(ELISA)，在血浆、尿液和粪便内没有检测到 Ad 载体；qPCR 显示血液中的载体会迅速清除，至 24 h 就检测不到了[14]。在黑瘤患者中，注射后 48 h 通过 ELISA 和感染分析法发现血清、尿液和粪便样品中的 Ad 载体都呈阴性[15]。可见 Ad 载体在血液中的清除很迅速，在尿液和粪便中检测困难。

(3)反转录病毒载体(Retrovirus vectors)：反转录载体通常用于离体基因治疗，在这种情况下，转移进受试者体内后载体的分布局限于离体工程细胞。在体内应用后，有关 RV 载体分配和脱落的有价值的数据非常的有限。在对血友病 A 患者的临床试验中发现：携带凝血因子Ⅷ cDNA 的 RV 载体在静脉注射后能够长期(一年)持续存在，在 75%的测试样品的 PBMC 中都发现了载体 DNA[16]。在大鼠肌肉内注射慢性病毒(LV)载体后 14 个月，注射肌肉部位能检测到转基因表达[17]。

(4)单纯孢疹病毒载体(Herpes simplx virus vector)：在皮下或肌肉内注射单纯孢疹病毒(HSV)载体后，载体的分布情况目前还不清楚。在大脑肿瘤大鼠模型中，当 HSV 载体注射入这个模型的肿瘤内 24 h 后，大部分的载体仍停留在肿瘤内，在血液中检测不到载体[15]。在非灵长类动物的前列腺内注射 HSV 载体后，在血液和尿液中任何时间点(注射后 7~56 d)都没有检测到载

体[18]。因此HSV载体主要集中于注射位点、肝脏和脾脏，在体液中很难检测到。

通过检测载体的存在来判断是否使用了基因兴奋剂应该是一个理想的方法，但因为目前有关基因治疗载体在人体内分布状况的报道很少，对基因治疗后载体的具体分布还不是很清楚，甚至有些基因治疗不需要载体。有些载体由于自身的特点不适合作为检测目标：化学载体能够迅速分解并且注射位点难以确定，若使用“易分解的”病毒载体作为基因治疗载体，不久就迅速降解，病毒蛋白很少甚至并不表达。随着基因治疗技术的发展，对载体不断的优化和更新，通过载体来检测基因兴奋剂似乎变得更加困难。

1.4 载体的免疫反应的检测

1)病毒载体。

Ad载体进入人体数小时内就诱导产生非特异性免疫应答。机体对Ad载体的先天性免疫取决于载体剂量和操作的方法，不同个体间的差别有可能阻止转基因的有效的表达。腺病毒载体对先天性免疫相对时间较短，通常只持续几天。

AAV载体诱发的先天性免疫反应的范围比Ad载体小,对AAV载体的适应性细胞介导的反应也大大弱于Ad载体，这归因于它不能有效的感染APC(抗原呈递细胞)。AAV载体介导的基因转移后细胞免疫反应水平低在一些试验中已经被证实了[19]。

单纯孢疹病毒(HSV)载体也会引起体内免疫反应，炎性反应的持续时间和强度依赖于载体制剂。用糖蛋白HSV-2疫苗进行肌肉内免疫会导致HSV-2糖蛋白血清抗体和HSV-2中和抗体在血清HSV阴性或阳性的受试者内长期增加[20-21]。这表明，尽管由于天然获得性感染50%~80%的人拥有针对HSV的循环抗体，但是存在发生基因转移后rHSV抗体增加的可能。

反转录病毒(RV)载体主要用于离体治疗,因此RV载体引起的免疫主要是针对转基因蛋白或载体中的独立蛋白。与Ad载体和AAV载体相比，RV载体引发的炎症和先天性免疫反应非常低。在小鼠静脉内注射LV载体不会引发细胞介导的抗病毒的炎症反应[22]。

2)非病毒载体。

源于细菌的质粒DNA能够激活先天性免疫,是因为与真核细胞DNA相比，它的DNA双链中含有丰富的非甲基化的CpG序列。脂质体包埋的siRNA(短链干扰RNA)在特定的序列方式下也可以引发先天性免疫反应。质粒DNA几乎不能引起体液免疫反应，在小鼠肌肉内注射不同类型的质粒载体不能引起抗双链DNA抗体水平的升高[23]；在兔子的肌肉或静脉内注射质粒载体后，没有检测到抗体；在肌萎缩症患者肌肉内注射抗肌萎缩蛋白质粒后，检测不到双链DNA抗体[10]。

由以上信息可知：由于载体引起的免疫反应通常是短暂和温和的，Ad载体除外，针对基因转移的先天性免疫反应在基因兴奋剂的检测中用途是有限的。Molnar-Kimber等[24]的研究结果表明：即使使用Ad载体，分析细胞介导的免疫反应也不能足够地确定基因转移。先天性和细胞介导的自适应性免疫反应对其它检测指标可能具有补充作用，然而区分基因转移引起的特定免疫反应和自然接触到的病毒、细菌和其它无关刺激引起的免疫反应是至关重要的。pDNA和转基因蛋白引起的免疫反应作为基因兴奋剂的检测目标不可能有太大的利用价值。

2 新技术在基因兴奋剂检测中的应用

2.1 基因表达谱

基因表达谱是通过核酸微阵列技术在成千上万的基因中测定mRNA的浓度实现的。基因表达谱常被称为是某一生理(病理)现象的“分子图像”。这类复杂的“分子图像”,可用于同时检测成千上万个基因的表达水平，再经专门的计算机软件解读出来。研究人员通过比较源于不同条件下的“分子图像”的结果，可以识别出基因兴奋剂的标志物。用表达谱芯片对大量的基因进行分析研究是不现实的，剔除无用的基因减少被研究的基因的数目是研究人员所希望的，功能分类基因芯片很好地解决了这一难题。功能分类基因芯片上通常只有几百个或更少的基因，这些基因包括了那些与研究对象有确定关系的基因，或至少是与研究对象的关系有待考证的基因。但是这是一项新技术还有很多不完善的地方，特别是在数据分析方面、不同系统和平台之间的标准化和可比较性。因此首先应在体外细胞培养系统和动物模型进行研究。

2.2 蛋白质谱

蛋白质组学可以定量分析个体蛋白也可以定性分析来鉴别个体蛋白的亚型和PTM；它能从数量上和质量上研究蛋白质组的相关变化[25]。蛋白质组学的一个重要部分是利用双向凝胶电泳、毛细管电泳或一维或二维液相色谱分离蛋白质或多肽中的复杂混合物。分离后，使用各种质谱对多肽进行鉴别和定量，如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱、电喷雾电离串联质谱或傅立叶变换离子回旋共振质谱。质谱后的结果是收集和查找数据，然后通过多肽序列分析软件来确定混合物中的蛋白质。

事实证明全基因组范围的蛋白质分析在技术上更加困难，因为人体内蛋白质的庞大数量和多样性以及广阔的动态范围。对特异蛋白亚类进行有针对性的分

析来取代全身蛋白质组分析，这在基因兴奋剂的检测中更实用。这种特异蛋白亚类可以从与细胞蛋白质相互作用、信号转导通路、生物化学和基因表达数据研究的基础上筛选出。一旦确定，这些蛋白质生物标志物可用特异抗体的 Western Blot 和 EILSA 方法来验证。表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(SELDI)蛋白质芯片技术，是目前应用于蛋白质表达分析和生物标志物发现的一项新技术，这项技术用于发现运动员体内 rhGH 的生物标志物已经被证实了[26]。与核酸微阵列一样，通过筛选全身或目的蛋白的变化来确定可能的标志物需要在各类人群中进行广泛的测试，以建立参考范围。

2.3　代谢谱

生物标志物发现的另一种方法是代谢物分析，其目的是对一个生物样品进行监测，如体液，由全身生化途径产生的所有非蛋白低相对分子质量代谢物。和蛋白质组一样，代谢组的组成也是多种多样的，其浓度有一个很大的动态范围(超过 7~9 个数量级)。分析代谢组的一个优势是：代谢组是基因表达的下游产物，这样更能恰当地反映细胞、组织或生物体的功能水平[27]。代谢组的变化是相关的转录组或蛋白质组放大的结果。代谢组学采用的技术有气相色谱–质谱、核磁共振、液相色谱–电喷雾电离质谱和傅里叶变换红外光谱(FTIR)。代谢组学已成功应用于药物代谢分析、治疗和毒性反应的研究、疾病生物标志物的鉴定等方面。用 FTIR 对运动员血浆的代谢谱进行分析已经开始被使用了，这种方法可用于兴奋剂的控制和监测过度训练。目前，对全身的代谢物进行分析仍是一个挑战，进行快速、高通量鉴定代谢物的技术仍处于萌芽状态。人类代谢组学领域的快速发展，包括处理、分析和确认大型数据集合的方法，新的分析方法如以芯片为基础的纳电喷雾质谱法和最近产生的人类代谢组数据库草图，这些都有力说明了代谢物分析作为寻找兴奋剂标志物的一种方法的未来可能性。

2.4　活体内非入侵性成像

在基因治疗研究中，活体成像是监测基因表达的另一种方法。无论是以光学、磁共振还是核素显像为基础的活体内成像技术都已经被开发并成功应用于动物模型中。然而只有几种方法可应用于临床，原因如方法的复杂性、可能具有免疫反应、缺乏敏感性和可使用的放射性示踪剂。正电子发射断层成像(PET)和单光子发射型计算机断层扫描(SPECT)两种放射性核素显像技术是最敏感和最适合基因转移研究。PET 的体内成像技术可用于人类基因治疗，这在脑胶质瘤的基因治疗中被证实了[28]。检测基因兴奋剂更可行的方法是在转录物或蛋白质水平上检测转基因的异位表达。用以抗体或配体为基础的探针并适合 PET 或 SPECT 放射性核素成像，与转基因蛋白在异位位置进行特异性绑定或相互作用。目前正在研究一种成像检测 EPO 在肌肉组织表达的方法。这种方法是使用以肽核酸为基础的反义寡核苷酸探针标记，它能与 EPO 的 mRNA 杂交，然后使用 PET 或 SPECT 进行分析。

非入侵性成像也可用于评估转基因表达的间接结果，包括代谢物质的变化、形态学的变化、生理学的变化、炎症和免疫力的激活以及转基因下游途径的调节的变化。磁共振波普学已被应用于检测运动休息期间或恢复后代谢物的变化，使用类似的方法也可以检测基因兴奋剂后代谢物的变化。基因兴奋剂可能与炎症有关联，基因转移引起的细胞介导的免疫反应期间，体内成像可被用于追踪淋巴细胞的募集。此外，转基因下游途径的激活会导致特异酶或受体表达增强，可以针对这些设计成像方式。

新型的技术将用于基因兴奋剂的检测，例如分子成像技术、生物传感器技术以及更加先进的分析软件等。若成功实现这些新技术在基因兴奋剂检测中的应用，将为发展检测方法提供更广泛的途径。

参考文献：

[1] World Anti-Doping Agency.THE 2008 PROHIBITED LIST[EB/OL].(2007-9-22) [2008-10-5]. http://www.wada-Ama.org/rtecontent/document/2008_List_En.pdf.

[2] 李志朋，徐波，全明辉，等. 基因兴奋剂的研究进展[J]. 体育学刊，2006，13(6)：56-59.

[3] Büro für Technikfolgen-Abschätzungbeim Deutschen Bundestag. Documentation of principal findings[EB/OL]. (2008-2-15)[2008-10-5]http://www.tab.fzk.de/en/gendoku_en.pdf.

[4] Hassan M E A，Mai M H Mansour，Robert H C. Doping in the recombinant era: Strategies and counter-strategies[J]. Clinical Biochemistry，2005，38：959-965.

[5] Maria Minunni，Simona Scarano，Marco Mascini. Affinity-based biosensors as promising tools for gene doping detection[J]. Trends in Biotechnology，2008，26(5)：236-243.

[6] Lasne F，Martin L，de Ceaurriz J，et al. ‘‘Genetic Doping’’ with erythropoietin cDNA in prima-te muscle is detectable[J]. Mol Ther，2004，10：409-410.

[7] Bidlingmaier M，Wu Z，Strasburger C J. Problems with GH doping in sports[J]. Endocrinol In- vest，2003，

26：924-931.
[8] Kniess A，Ziegler E，Kratzsch J，et al. Potential parameters for the detection of hGH doping[J]. Anal Bio-anal Chem，2003，376：696-700.
[9] Oh Y K，Kim J P，Yoon H，et al. Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administ-ered in polyethylenimine complexes[J]. Gene Ther，2001，8：1587-1592.
[10] Parker S E，Borellini F，Wenk M L，et al. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits[J]. Hum Gene Ther，1999，10：741-758.
[11] Romero N B，Braun S，Benveniste O，et al. PhaseIstudy of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy[J]. Hum Gene Ther，2004，15：1065-1076.
[12] Manno C S，Chew A J，Hutchison S，et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B[J]. Blood，2003，101：2963-2972.
[13] Arruda V R，Stedman H H，Nichols T C，et al. Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model[J]. Blood，2005，105：3458-3464.
[14] Palmer D H，Mautner V，Mirza D，et al. Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer[J]. Clin Oncol，2004，22：1546-1552.
[15] Dummer R，Bergh J，Karlsson Y，et al. Biological activity and safety of adenoviral vector- expressed wild-type p53 after intratumoral injection in melanoma and breast cancer patients with p53-overexpressing tumors[J]. Cancer Gene Ther，2000，7：1069–1076.
[16] Powell J S，Ragni M V，White G C，et al. Phase1trialof FVIII gene transfer for severe hemophilia A using a retroviral construct administered by peripheral intravenous infusion [J]. Blood，2003，102：2038-2045.
[17] Seppen J，Barry S C，Harder B，et al. Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin[J]. Blood，2001，98：594-596.
[18] Varghese S，Newsome J T，Rabkin S D，et al. Preclinical safety evaluation of G207，a replication-competent herpes simplex virus type 1，inoculated intraprostatically in mice and nonhuman primates[J]. Hum Gene Ther，2001，12：999-1010.
[19] Manno C S，Arruda V R，Pierce G F，et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response[J]. Nat Med，2006，12：342-347.
[20] Langenberg A G，Burke R L，Adair S F，et al. A recombinant glycoprotein vaccine for herpes simplex virus type 2:safety and immunogenicity [corrected][J]. Ann Intern Med，1995，122(12)：889-898.
[21] Straus S E，Wald A，Kost R G，et al. Immunotherapy of recurrent genital herpes with recom-binant herpes simplex virus type 2 glycoproteins D and B: results of a placebo-controlled vaccine trial[J]. The Journal of Infectious Diseases，1997，176：1129-1134.
[22] Follenzi A，Battaglia M，Lombardo A，et al. Targeting lentiviral vector expression to hepat-ocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice[J]. Blood，2004，103：3700-3709.
[23] MacCollG，Bunn C，Goldspink G，et al. Intramuscular plasmid DNA injection can accelerate autoimmune responses[J]. Gene Ther，2001，8：1354-1356.
[24] Molnar-Kimber K L，Sterman D H，Chang M，et al. Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma[J]. Hum Gene Ther，1998，9：2121-2133.
[25] 张海英，唐海桦，梁钢，等. 口腔鳞癌亲本细胞株与耐药细胞株蛋白谱差异[J]. 中国公共卫生，2009，25(9)：
[26] Chung L，Clifford D，Buckley M，et al. Novel biomarkers of human growth hormone action from serum proteomic profiling using protein chip mass spectrometry[J]. Clin Endocrinol Metab，2006，91：671-677.
[27] 黄青，陆益红，王广基，等. 基于 GC/TOFMS 测定技术的 Wistar 大鼠血浆代谢谱增龄性变化研究[J]. 药学学报，2009，44(10)：1095-1101.
[28] Bogdanov A Jr. In vivo imaging in the development of gene therapy vectors[J]. Curr Opin Mol Ther，2003，5(6)：594-602.