

● 研究报道 Short Communication

血检和促红细胞生成素

佟卫群,赵明华,刘晓琳

摘要:近些年来,血液检验在兴奋剂检测上逐渐受到重视,尤其对特殊的兴奋剂方法和兴奋剂种类,血检具有尿检不可替代的好处。通过对兴奋剂促红细胞生成素(EPO)检测方法发展的论述,阐明了血液检测的独特地位,证明了尿检和血检联合检测在未来兴奋剂检测中的可取性。

关键词:促红细胞生成素(EPO);重组EPO;兴奋剂;血检;尿检;红细胞压积

中图分类号:G804.7 文献标识码:A 文章编号:1005-0000(2003)03-0061-02

Blood Detection And Erythropoietin

TONG Wei-qun, ZHAO Ming-hua, LIU Xiao-lin

(Capital Institute of Physical Education, Beijing 100088, China)

Abstract: Blood detection has been attached importance on doping detection in recent years. Especially to special doping methods and types, blood detection has un-substitutable advantage than urine detection. The special status of blood doping was elucidated through reviewing the development of EPO detecting methods. The possibility of combination of blood and urine detection was testified in the future.

Keywords: Erythropoietin; rHuEPO; doping; blood detection; urine detection; hematocrit

1967年国际奥委会医学委员会(IOC-MC)成立,自此开始了全世界范围内反对使用兴奋剂的斗争,现在兴奋剂检测已成为体育运动不可缺少的组成部分。但是随着科学技术的发展,兴奋剂的使用手段日益高明,种类逐渐增多,为检测工作带来更多障碍。只要竞技体育给运动员带来巨额收入,兴奋剂和反兴奋剂的斗争在很长一段时间内都将继续存在。因此,对应各种违禁药物,在检测方法上获得突破是兴奋剂检测的目标。

1 尿检和血检

对运动员进行兴奋剂检测,主要是通过科学的方法和设备来测定其体内某种被禁用的药物及其代谢产物是否存在和存在的浓度是多少,或者测定其体内的正常生理性物质以及相关物质的比例是否超出了允许标准,以判断其是否采用了非药物性的兴奋剂手段来增加体能。按取样的途径划分,目前检测主要有尿检和血检两种方法。

药物通过消化道吸收,或经皮下注射、肌肉注射以及静脉注射等途径进入人体后,其原形及其代谢产物就必然出现在血液循环中,再随血液循环到达肾脏,在肾脏以尿液形式排出体外。兴奋剂检测一直以来都采用尿检,而不采用血检,主要是由于:一是从运动员的健康考虑,抽血化验在生理和心理上是不合适的;二是为了避免抽血过程中可能导致的各种传染病的感染。但是检查尿中是否含有禁药的难度是很大的,原因之一,百余种禁药经过体内转化,尿中出现的代谢产物可达四百多种,要从这些代谢产物推知服用的药物原形,需要对百余种禁药在体内的转化机制进行透彻的研究;原因之二,尿中物质的含量

极低,一般都在纳克水平,并且其活性大大降低,这给检测带来很大困难。相反,血检有它的好处。首先,血液中的物质形式往往为活性形式,更为重要的是,增加携氧能力方法类的药物必需的检测方式为血检^[1]。

增加血液的携氧能力是耐力运动员提高运动能力极其有效的一种手段。相应的方法和药物大致有三种,分别是血液兴奋剂、高原训练法和促红细胞生成素注射法。血液兴奋剂指的是异体血和自体血的回输法,是从同型血的别人或自己体内抽取一定量的新鲜血液,在赛前较近的一段时间内再输入运动员体内,以达到增加总血容量、红细胞数量和血红蛋白含量的目的。异体同型输血存在着发生肝炎、细菌感染、血液亚型和其他血型不相配等潜在危险,自体血回输法又面临保存血液困难的难题,因此,这种方法在20世纪80年代后已少为人用。高原训练法的实质是利用缺氧的环境促进促红细胞生成素的产生,从而达到增加红细胞生成的作用,但高原训练法十分麻烦和艰苦。促红细胞生成素法只需少量直接注射,简便易行。所以,这三种方法中,最为方便也最易为运动员所采用的是促红细胞生成素注射法^[2,3]。近些年来,血液检测越来越受到重视,最为主要的原因是EPO的检测方法要用到血检。

2 促红细胞生成素(EPO)的检测方法

2.1 EPO的化学性质和功能

促红细胞生成素(EPO)主要由肾小管旁间质细胞产生,分子量为34000D,是主链蛋白质由166个氨基酸构成的一种糖蛋白。机体缺氧是肾脏产生EPO的始动因素。缺氧促进肾组织

收稿日期:2002-12-31;修回日期:2003-04-08;录用日期:2003-06-18

作者简介:佟卫群(1973-),女,辽宁省鞍山人,首都体育学院讲师。

作者单位:首都体育学院,北京 100088。 E-mail: weiqunt@peoplemail.com.cn。

前列腺素的合成和释放,前列腺素激活腺苷酸环化酶,后者又增加 cAMP 的合成,cAMP 浓度的升高使 EPO 基因得以表达,从而促进 EPO 产生。EPO 作用于骨髓多能干细胞上,刺激其向红细胞系转化,即促进了红系祖细胞(BFU-E, CFU-E)的增殖,从而缩短了红细胞的成熟时间,最终导致红细胞在血液中浓度的增加。红细胞增多的直接效果就是携氧能力增强。正常人血清中 EPO 含量为 15 U/L 左右,在 10~30 U/L 内变动,半衰期约为 10 h。一般只有贫血患者的 EPO 含量低于正常值。

1985 年通过生物工程的方法,人的 EPO 基因在大肠杆菌细胞中成功克隆和表达,重组 EPO(rHuEPO)诞生。到目前为止,rHuEPO 已成为通过基因工程生产的药物中产量最大的一种。它的出现在医学上起到了巨大作用,目前临床上主要用于治疗慢性肾功能衰竭、肾移植、艾滋病、肿瘤及类风湿等病人的贫血。运动员所使用的 EPO 都是这种 rHuEPO,它和人体内自身产生的 EPO 结构极其相似,功能完全相同。

在比赛中,运动员使用 EPO 的目的是通过增加机体中红细胞的数目,提高携氧能力,以保证运动时氧的供应,从而提高耐力,加快训练和比赛后的恢复,使运动员主观上不易感到疲倦。有研究表明,服用 EPO 后,运动员的最大摄氧量($VO_2 \max$)普遍提高。因此,滥用 EPO 主要集中在耐力运动项目中。服用 EPO 后的效果类似于血液兴奋剂,但它更为简便和迅速,因而备受运动员的青睐。

正常人滥用 EPO 却对健康构成严重危害。它会以线性方式增加红细胞压积(Hct),同时增加血液粘滞性,它可使 Hct 增加至 55%~60%,伴随着运动中的出汗现象,Hct 可升至 70%。Hct 超过 55%后,就易发生血液栓塞,因此,其造成的后果是:冠状动脉和大脑动脉阻塞,并发症包括高血压、充血性心脏病、中风及大脑损伤等等。鉴于 EPO 对人体造成如此严重的危害,IOC 在 1989 年把 EPO 列为违禁药物,禁止运动员在比赛中使用^[45]。

2.2 EPO 的检测历程

IOC 虽然在 1989 年就把 EPO 作为禁药禁止运动员使用,但实际上在 2000 年前的绝大多数比赛中都未对其检测,原因在于检测的困难性。首先,EPO 的浓度个体间有差异,而 EPO 的半衰期很短,只有 4~13 h,rHuEPO 与人体内源性 EPO 的结构又极其相像;另一方面,高原训练也会造成其上升,这样很难以血液中 EPO 的浓度作为检测标准。20 世纪 90 年代中期,国际自联和国际滑雪联,使用 Hct 来检测 EPO,Hct 超过 50%就要禁赛^[6]。但有的运动员天生 Hct 就大于 50%,同样,高原训练也使 Hct 增加,这样就引起很多运动员的不满,所以这些检测方法的探索都以失败而告终。

正因为长期找不到合适的检测方法,滥用 EPO 的运动员几乎遍及世界上所有的国家,目前已有 30 多名运动员的死亡与 EPO 有关。为了制止这一愈演愈烈的趋势,1999 年澳大利亚体育学院(AIS)成立了“EPO2000”科研攻关组,并协同澳大利亚体育运动兴奋剂检测实验室(ASDTL)联合进行一项注射 EPO 的课题,它就是后来被命名为“EPO2000”的研究计划,这项研究课题随后又有许多国家和地区的专家共同参与攻关。

“EPO2000”研究被分成“采集样本”和“应用试验”两部分。“采集样本”是从 13 个国家和地区招募大约 1200 名训练有素的男女运动员志愿者,以每个运动员每两周抽取三份血液样本为一个周期,以此来获取参照系数和运动员体内的正常变

化情况。“应用试验”是将志愿者运动员分成各种不同的对照组,然后给志愿者注射 EPO,监测他们血液参数的变化。

网状细胞浓度、红细胞压积(Hct)、可溶性铁传递蛋白受体(sTfr)和铁结合蛋白等这些指标在注射 EPO 后的 1 到 14 天都会超出正常值。sTfr 的数量正比于红细胞生成是因为它的浓度依赖于细胞转铁蛋白受体(Tfr)或细胞质量^[7]。在 rHuEPO 注射后,这些指标都比正常值高的现象为 EPO 的检测创造了有利条件。

随后,科学家们又通过不同的实验来验证这些指标。Parisotto Wu 等用模拟方程来检测 rHuEPO 滥用的可能性。对应不同的 EPO 服用时间,模拟方程选用的指标不同。比赛当天服用 EPO 的要联合使用网状细胞浓度、EPO 浓度、Hct、可溶性铁传递蛋白受体和大红细胞百分比这几项指标。检测最近(最后一次注射在两星期之前)服用的指标是:网状细胞浓度、EPO 浓度和 Hct。这两个模拟方程具有高敏感性和高度专一性。

对红细胞生长素的另一项重要研究是抗体识别法,目前已经能够在血液中将摄入体内的红细胞生长素与人体内源性红细胞生长素这两种不同成分的细胞清晰地区别开来。

经过这些细致的实验研究,终于获得了理想的结果,筛选出一些指标与注射 EPO 有关。为了保证数据的准确性,这次国际科研合作从 15 个国家的不同民族、人种以及生活在不同海拔高度的人群中采集了大量血样,从近百种指标中筛选出 5 个指标,根据这 5 个指标升高的幅度,可将高原训练所造成的 EPO 含量增高与用违禁药物导致的血液综合指标超过标准区分开来。为了保证结果的准确性,最好早晨在没有摄入任何饮料之前采血,同时要防止运动员通过注射生理盐水来稀释血液。

同时,法国科学家 Françoise Lasne 和 Jacques de Ceaurriz 通过分析 rHuEPO 与人体自身分泌 EPO 电荷上的微小差别,开发了新的尿检方法来有效地检测 EPO,该方法可检测出当事人在 3 天内是否接受过 EPO 的注射。他们的检测方法是等电聚焦法。两位科学家发现 rHuEPO 的 a 和 b 两种亚型在等电点上非常接近,均在 4.42~5.11 范围内。尽管 rHuEPO 有一条额外的碱性下的条带,但还是明显区别于自然状态下存在于尿液中提纯的 EPO,其等电点为 3.92~4.42,即更为酸性一些。原因是 rHuEPO 来自大肠杆菌的合成。原核生物和真核生物在 DNA 翻译成蛋白质的过程中,对蛋白质的修饰不同,很可能是转录后翻译的糖基化不同,从而导致人体分泌的 EPO 和 rHuEPO 在等电点上的差异。糖基化具有种属和组织类型的依赖性这一特点,可以用于在尿中检测运动员是否服用了 rHuEPO^[8]。等电聚焦法作为生物技术中比较成熟的方法已为人所常用,但把它用于检测领域是两位科学家的首创,因此被发表在英国的《Nature》杂志上。

于是,包括国际奥委会医学委员在内的 15 人专家小组在瑞士洛桑开会,并批准在悉尼奥运会上实施 EPO 检测计划,即“E-PO2000”血检法和法国科学家开发的尿检法共同实施,以保证检测的准确性。

3 兴奋剂检测的未来趋势

无疑,血检将成为兴奋剂检测的国际潮流。对于比 EPO 更难检测的生长激素,血检也找到了相应的办法。有一项研究生长激素检测方法的计划,已找到三种体内 (下转第 68 页)

表3 中外优秀女子蹦床选手的技术比较分析

	难 度				完 成 质 量				成 绩			成套时间	
	世界	中国	差值	贡献率/%	世界	中国	差值	贡献率/%	世界	中国	差值	世界	中国
1998	11.21	6.78	4.43	46.5	25.61	20.57	5.04	53.5	36.82	27.35	9.47	34.9	27.4
1999	11.20	8.10	3.10	50.5	26.20	23.16	3.04	49.5	37.40	31.26	6.14	34.0	29.5
2000	11.17	9.86	1.31	29.8	25.98	22.90	3.08	70.25	37.15	32.76	4.39	35.0	32.6
平均	11.19	8.35	2.84	43.3	25.94	22.24	3.72	56.7	37.13	30.59	6.56	34.6	30.5
增幅	-0.04	3.08	/	/	0.33	2.73	2.40	/	0.30	5.61	/	/	/

注:运动员的技术资料,中国运动员来源于历年冠军赛,世界2000年为奥运会,其他为当年的世锦赛。

科学化训练,相信中国的女子蹦床选手在不久的将来也会站在世界领奖台上。

3 结 论

(1)世界女子蹦床运动在欧洲广泛开展和提高,并处在世界领先地位,尤其是以前苏联国家为主,她们的训练经验和理论值得我们借鉴和学习。

(2)影响女子蹦床运动员比赛成绩的技术因素中,不同层次运动员之间以难度为主,而世界优秀运动员间则主要体现在完成质量上。

(3)我国运动员与世界优秀运动员在难度、完成质量上都存在较大差距。但从动态发展的角度分析,我国运动员的难度发展较快,而完成质量的提高速度较慢,在加强难度动作发展

的同时,应把提高完成质量贯穿于训练过程的始终。

参考文献:

- [1] 李东建.奥运周期世界蹦床运动发展趋势分析[J].北京体育大学学报,2001,24(4):550-551.
- [2] 李艳玲.中国竞技蹦床运动现状及水平分析[J].中国体育科技,2000,36(7):32-34.
- [3] 黄强.我国竞技蹦床单人网上竞技水平与世界先进水平的调研[J].中国体育科技,2002,38(2):52-54.
- [4] 刘兴.我国优秀男女蹦床运动员竞技水平与成绩变化特征的研究[J].体育科学,2000,(5):33-35.
- [5] 刘兴.2000年悉尼奥运会蹦床比赛成绩[J].蹦床与技巧,2000,(1):3-8.

(上接第62页)

物质作为服用生长激素后的标靶物。这三种物质在体内的含量有其特定的变化曲线,如出现异常就说明有体外摄取。这些成果增强了反兴奋剂工作者的信心,也使血检为越来越多的运动员和体育工作者所接受。同时,为了最大程度地降低抽血带来的危害,国际奥委会决定,缩小目标,重点检查最有可能从EPO中得利的运动员,可以在特殊的项目中进行血检,比如检测EPO,只查自行车、长跑、竞走等耐力项目即可。

尿检法经过多年的发展,已比较成熟,能用尿检检测的就没有必要用血检,毕竟尿检是无创的检测方法。比较难检测的物质可以在尿检的基础上尝试血检,它们可以互相取长补短。像EPO的检测方法,尿检法的准确度很高,只要尿中含有就可以检测出来,但由于代谢快,只对三天内服用的EPO敏感,而血检虽然敏感度不如尿检,但适用于长时间以前注射的EPO的检出。因此,血检和尿检的联合使用在未来的兴奋剂检测中必将起到加强检测效果的作用。

值得一提的是,反兴奋剂是一个永恒的主题,就像EPO的检测,如果一些药品制造商为利益驱使,用真核生物来表达EPO基因,那么上面的尿检法将失去功效,因为合成和人体分泌的EPO在结构上将没有差别。人们要依据形势调整策略,才能在检测上不至于处于被动的地位。事实上,最近已经有人研制了EPO的类似药物,同样具有增加红细胞浓度的作用。真是道高一尺,魔高一丈!对科学工作者,这是极大的挑战。因此我

们要倾注全力去研究,坚信终将获得胜利!

参考文献:

- [1] 卢昌亚.运动兴奋剂概论[M].上海:上海科学技术文献出版社,1999.207-221.
- [2] Birkeland K I, Rostad F G. Blood sample in doping control[J]. Int.J.Sport Med, 1997, 18:8-12.
- [3] Brian Corrigan.Doping in sports[J].Sport Coach,1998,4:11-17.
- [4] Schumaker YO, Grathwohl D, Barturen JM, et al. Haemoglobin, haematocrit and red blood cell indices in elite cyclists.Are the control values for blood testing valid?[J].International Journal of Sports Medicine,2000, 21: 380-385.
- [5] Sawka MN, Joyner MJ, Miles DS, et al. The use of blood doping as an ergogenic aid[J].Medicine and Science in Sports and Exercise, 1996, 28(6): 1-8.
- [6] Senden JMG, Brouns F.What is a normal red-blood cell mass for professional cyclists? [J]. Lancet,1998, 352:1758.
- [7] Birkeland KI, Stray-Gundersen J, Hemmersbach P, et al. Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance [J].Medicine and Science in Sports and Exercise,2000, 32:1238-1243.
- [8] Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine [J]. Nature,2000, 405:635.