

入方法使用福莫特罗 (formoterol)、沙丁胺醇 (salbutamol)、沙美特罗 (salmeterol) 和特布他林 (terbutaline)。②运动员在赛内非系统性使用糖皮质激素(如关节内、关节周围、腱周围、硬膜、皮下注射及吸入)。

奥运会期间,在为运动员提供医疗服务时,医药工作者要严格区分禁用物质和非禁用物质,明确禁用清单包括哪些物质和方法,明确在何种特殊情况下,可以允许运动员使用兴奋剂及其申报程序,为运动员安全有效用药、公平参加比赛提供切实的保障。

【参考文献】

- [1] 申萍,江红军. 各类兴奋剂的作用及对运动员的危害. 沈阳大学学报, 2004, 16 (4): 106-107
- [2] 北京 2008 奥运会网站. <http://www.beijing2008.cn>
- [3] 李建生. 兴奋剂与反兴奋剂的对立统一. 长春师范学院学报, 2007, 26 (5): 99-102
- [4] World Anti-doping Agency. 2008 年禁用清单 (国际标准)
- [5] World Anti-doping Agency. 2007 年禁用清单 (国际标准)
- [6] 中国奥委会反兴奋剂委员会. 关于印发世界反兴奋剂机构《2008 年禁用清单》的通知
- [7] Fitch KD. Androgenic-anabolic steroids and the Olympic Games. Asian J Androl. 2008 May; 10 (3): 384-390

文章编号: 1672-3384 (2008) -03-0008-05

反兴奋剂检测的新挑战—基因兴奋剂

【作者】 刘双虎 胡扬

北京体育大学科学研究中心 (北京 100084)

【中图分类号】 R872.5

【文献标识码】 B

20 世纪末伴随生物科技不断发展而出现的“基因治疗”(genetic therapy) 技术, 因其所具备的特异性强、副作用小、能够有效治疗或防止疾病的特点, 而被寄希望于能够解决严重威胁人类生命健康的一些遗传性或传染性疾病。但随着该项技术的不断发展与完善, 基因治疗技术将有可能被误用于研制一种新型的兴奋剂, 即“基因兴奋剂”(gene doping), 从而泛滥使用于竞技体育之中。这种潜在的趋势已经引起了国际奥委会 (IOC) 及世界反兴奋剂机构 (WADA) 的密切关注与担忧。

1 基因治疗

随着细胞学、遗传学、分子生物学等相关生命科学知识的不断积累, 生物工程技术与方法的不完善, 有针对性地使用病毒载体将遗传物质 DNA、RNA 或使用基因工程技术改造过的细胞转

入人体细胞或组织, 以达到治疗或预防疾病的目的即所谓的“基因治疗”已成为一种可能, 并在一些疾病的治疗中取得了显著成效^[1]。这种技术基于不同种族以及不同个体在基因水平上存在的差异, 能够“量体裁衣”式地为不同患者进行特异性的治疗, 避免了传统治疗手段缺乏个体化的缺陷, 降低了药物的副作用, 从而达到最优的治疗效果。正因为该项技术的这种潜在优势, 所以, 自基因治疗技术设想的提出到现在投入试验, 都受到了国际社会的广泛关注。其中也包括一些图谋使用该技术另作他用的个人或组织。尽管基因治疗技术尚处在试验阶段, 还不是一种成熟的技术, 仍需不断地改进与完善^[2]。但是, 经验提示我们: 即使还处在试验阶段的某些药物, 只要表现出能够提高运动机能的优势, 就会迅速地流入到

竞技体育领域中^[3]。

2 基因兴奋剂

2.1 基因兴奋剂的定义

“基因兴奋剂”最先被提出是在 2001 年 7 月。当时,国际奥委会医学委员会 (IOC Medical commission) 邀请“基因治疗”研究小组的成员召开了以“基因治疗及今后对竞技体育的影响”为主题的会议。在此次会议上,奥委会官员对于基因治疗有可能被作为一种兴奋剂手段而使用于竞技体育当中表现出了担忧,并呼吁相关学者能够尽早研究相应的检测方法,以防止基因兴奋剂的泛滥^[4]。

随后,国际奥委会于 2003 年 1 月 1 日将基因兴奋剂列入违禁药物或方法的黑名单,并由世界反兴奋剂机构给出了基因兴奋剂的定义:“非治疗目的的使用能够提高运动能力的细胞、基因、遗传元素或调控基因的表达”。^[5]

2.2 基因兴奋剂的种类

根据不同的基因序列编码出不同的氨基酸,进而影响到蛋白质结构和功能的改变,最终造成个体之间表型的差异这一原理,国内外学者针对同一基因的不同基因型是否与机体体质状况或运动能力存在关联进行着不断地探索与研究。研究表明,控制人体血液动力学、血管新生、血压调节以及参与能量物质代谢等相关基因的确与特定的运动能力存在关联。到目前为止,科学家已经发现了至少一百多种与身体机能和运动能力有关的基因^[6]。这就为提前预测运动能力及尽早选择合适的训练方法提供了依据。但同时,也为试图利用基因技术提高运动能力的运动员或教练员描绘出了“蓝图”。他们可以根据已知基因的功能并结合自己运动能力的需要进行基因表达的调控或注射相关基因制剂,从而达到提高运动能力的目的。

尽管目前发现的与运动能力相关的基因至少有一百多种,但当前临床研究较多,并根据现有的生物技术,有可能最先被利用转化为基因兴奋剂的有以下几种。

2.2.1 调控红细胞生成 促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 是调节红细胞生成的主要调节因子。胎儿时期由肝脏分泌,出生后就转由肾脏调节生成^[7]。其主要作用是促进晚期红系祖细胞增殖并向形态可识别的前体细胞分化,加速前体细胞的增殖、分化,促进骨髓释放网织红细胞^[8]。由于其在调节红细胞生成方面的重要作用,而一定程度上,红细胞数量的多少与机体携氧能力有关。所以,EPO 就成为与有氧耐力运动有关的重要基因之一。

科学家对于 EPO 已有二十多年的研究历史,目前已经能够合成人工重组 EPO,并被广泛应用于临床治疗各种疾病引发的贫血症^[9]。现已明确知道,注射人工重组 EPO (rhEPO) 能够有效提高机体的携氧能力,增强有氧耐力^[10]。为防止运动员使用 rhEPO 提高运动成绩,1990 年,国际奥委会就将其列入违禁药物名单。现随着 EPO 检测手段的提高,对于服用该种兴奋剂的运动员查处力度加大,以后服用者很有可能会转向使用能够编码出 EPO 的基因制剂。这是因为后者的使用更为隐秘,目前不易查处,并且也有很好的效果。Svensson 等人报道,将能够编码 EPO 的腺病毒注射入肌肉内,可以使大鼠的红细胞容积从 49% 提高到 81%,并且能够维持 1 年^[11]。而将单纯的 EPO 基因注射入肌肉,也能起到同样的效果^[12]。一些基因治疗专家和赛事组织者担心 EPO 基因兴奋剂很有可能出现在本届奥运会中^[13],但是否会真的发生,还需时间的验证。

2.2.2 提高肌肉质量 胰岛素样生长因子 1 (Insulin like factor-1, IGF-1) 是由肝脏和肌肉组织分泌的一种促合成激素,能够促进蛋白质的合成。其在血液中的浓度与生长激素成正相关。在基因治疗方面,将主要用于治疗肌肉的退行性改变,例如像肌肉萎缩症等,增加患者肌肉质量,增强肌力^[3]。与 EPO 基因治疗不同之处在于前者有可能渗透到全身各个组织或器官,而 IGF-1 基因治疗则可以局限在某一特异靶组织上。给大鼠注射 IGF-1 基因后,

在没有任何训练干预的情况下,其肌肉体积明显增加^[14]。Lee 等人发现,抗阻训练与 IGF-1 的结合使用,可使肌肉过度肥大,其程度远大于单纯使用 IGF-1 基因注射^[15]。由此可见,IGF-1 基因在促进肌纤维合成方面具有重要作用,有可能直接被用于有目的地增强运动员某一运动环节上的薄弱肌肉力量,也有可能与其他生长因子或力量训练计划结合使用,最终使肌肉体积产生更明显的增大。尽管这种基因治疗手段能够定位于特定肌肉组织上,但是否就显得相对安全,还需要更深入的研究。

筒箭毒碱(Myostatin)在心肌和骨骼肌细胞中合成,通过自分泌或旁分泌的方式发挥作用。与 IGF-1 在提高肌肉质量方面的机制正好相反,筒箭毒碱是一种肌肉生长的负向调节因子。当肌肉中该种基因表达减少或受阻滞时,反而会使肌纤维数量增加。其具体的作用机制还不清楚。所以,基因兴奋剂不仅仅局限于促合成基因,还应包括降低抑制类基因的表达。研究发现,通过注射筒箭毒碱抑制剂,如卵泡抑素或筒箭毒碱前体物质,可引起肌纤维肥大和数量增加,同时脂肪、结缔组织含量下降,最终造成骨骼肌体积和比例的显著性增大^[16]。另据报道,有一德国小孩,由于其家族的体质优势,出生时就具有发育良好的肌肉组织,在其4岁时,就能够举起3公斤的物体。通过基因分析发现,该儿童筒箭毒碱基因发生突变,造成基因所表达蛋白的缺失^[17]。可以看出,筒箭毒碱对于肌肉发育的确存在某种抑制作用。所以,通过抑制筒箭毒碱基因的表达,可以作为一种基因治疗手段治疗杜兴型和贝克型肌营养不良症所造成的肌肉萎缩。但筒箭毒碱抑制基因同样也可被用于基因兴奋剂,用于提高运动员肌肉质量,增加肌肉力量。由于通过抑制途径影响基因的表达显得更易操作,所以,筒箭毒碱抑制剂被认为最有可能成为基因兴奋剂的“先驱”之一^[18]。

2.2.3 促进血管新生 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)在机体的多种组织

都有表达,其主要作用是促进血管新生。作为一种基因治疗手段可有效治疗心绞痛或外周动脉血管疾病,减少患者痛苦。这已在临床试验中进行应用。如果运动员使用这种方法来提高血管的生成速度,就可能供应更多的氧气和营养物质到运动器官或组织,同时将代谢产物快速排出体外,从而延缓心脏、肌肉或身体其他部位的疲劳,延长运动时间^[3]。这种基因兴奋剂有可能更多地被用于有氧耐力运动中。

2.2.4 减轻运动疼痛 内啡肽(Endorphins)在运动过程中,疼痛的出现是由于能量过度消耗,产物堆积,为防止能量进一步耗尽,机体发出的一种不可忽视的警告信号。很多时候大部分运动员还是选用违反身体意愿的减痛药来延长运动时间。一些肽类物质如内啡肽和脑啡肽可能成为化学类止痛剂的替代物。而编码这种肽类物质的基因被注射人体内就有可能同样起到减轻疼痛的作用。动物试验表明,编码这种肽类物质的基因对于减轻炎症性疼痛感觉有一定的作用^[19]。尽管止痛性基因治疗具有很好的应用前景,但是用于临床实践还有一段很长的路要走。但如果就其可能作为一种基因兴奋剂而言,就没有很严格的时间界限了。

随着序列与功能能够被确定的基因数量的不断递增,今后,有可能被用于基因兴奋剂的候选基因会不断增多,涉及的生理机能范围也会不断拓宽,而不仅仅局限于以上几种。

2.3 基因兴奋剂的危害

2.3.1 身体危害 当传统用药明显出现副作用时,可通过停药或增加清除率来减轻、消除副作用对身体的危害。但由于基因治疗或基因兴奋剂将都是在基因水平上施加影响或改变,在目的基因表达蛋白水平及时间长短无法控制的情况下,会引起相当严重的后果。比如:EPO的不可控持续表达会造成血红蛋白的不断增高,引起血液粘稠度增加,最终可能导致血栓、高血压、心衰等症状,危及生命。

利用基因兴奋剂在短时间内增加肌肉体积,增

大肌力,在骨骼或肌腱不能达到新肌力所要求的水平时,就会引起骨折、肌腱断裂等情况的发生。而使用 IGF-1、VEGF 等促生长型基因兴奋剂,有可能引起正常组织的过度增生,诱发肿瘤的形成^[320]。

2.3.2 环境与社会危害 基因治疗过程中,对于患者所使用的转运目的基因进入体内的病毒载体将进行严密监控,直到患者血液、唾液、尿液、粪便等体液和排除物中不能检测出病毒载体时,才能离开医院,以防止感染的发生。而基因兴奋剂使用中,如果没有这种严密监测措施,就不能排除病毒载体引起疾病的可能。这对于接近使用者的人来说,无疑是一种潜在的危险。

其次,使用基因兴奋剂提高运动成绩一方面违背了“公平竞争”的竞技体育精神,另一方面,利用不正当手段赢得冠军、骗取荣誉的伎俩频频出现,会引起信任缺失、诚信缺乏以及价值观扭曲等严重社会问题。

基因兴奋剂所产生的以上对于身体、环境、社会的危害,只是现在可以预见的方面,而最严重和可怕的应是源于目前基因治疗技术不成熟,对其无法完全掌握所带来的未知方面的危害。

2.4 基因兴奋剂的检测

与传统的蛋白或类固醇兴奋剂不同的是,基因兴奋剂所采用的是人类自身基因,所以其表达产物与服用者本人的内在蛋白不会有很大的差别。这就为检测带来很大的难度。现在,国际社会尤其是反兴奋剂机构最为关心的问题就是:检测基因兴奋剂的难度到底有多大,或者是不是根本没有检测的可能性。

不过根据基因兴奋剂的使用手法^①,还是能够提出一些检测或监控的可能方法或发展方向。以下按照直接和间接两种方法来介绍:

2.4.1 直接方法 ①“药理学方法”:尽管基因兴奋剂所表达的产物与服用者的内在蛋白差异性不大,但是通过研究发现,不同类型的细胞中 EPO 具有不同的糖基化模式。根据这种理化特征还是有可能区分出转基因异位表达蛋白与内在蛋白。借鉴这种

方法也可以同样去研究适用于其他类型基因兴奋剂的检测手段^[3]。②“分子生物法”:基因治疗或使用基因兴奋剂时,需要去功能化的病毒载体将目的基因转入人体细胞或组织。所以,对于注射位点仅限于局部组织而不可能通过尿液或血液检测的提高肌肉体积的基因兴奋剂,就可通过检测其载体来发现。但这种方法的缺点在于,需要肌肉组织取样,所以,很有可能不会得到运动员的同意。另一种方法就是将一种长度大约为 20 碱基的特异 DNA 片段即“基因条形码”插入到转基因序列,然后通过检测“基因条形码”来发现目的基因,这也是一种可选择的发展方向,但需要科学家、运动员、伦理学家、医生、体育权威机关等方面的通力协作才能完成^[9]。

2.4.2 间接方法 ①“血液护照法”:比如像 EPO 这种与血液动力学有关的基因兴奋剂,“服用”时不必局限于身体的某一固定组织,而是在机体的几乎任何部位都可以实施注射,然后在局部表达成功后就可以随血液输送至全身。对于这种类型的基因兴奋剂,可以采用“血液护照”的方法去检测。这种方法就是对每一名运动员的红细胞压积和血红蛋白进行连续性检测,然后确定个体化的变动范围。正常状况下,红细胞压积和血红蛋白指标会在 5% 范围波动,如果有个体超出 10% 就可能被怀疑使用了基因兴奋剂^[9]。但这种方法的局限性在于,一方面并没有排除使用合理的训练方法比如高原训练而大幅提高红细胞或血红蛋白的可能^[21],另一方面没有考虑通过服用某些可控制目的基因表达的药物,使蛋白表达控制在正常范围内的作法^[22]。②“基因芯片法”:可以根据每一种基因都有若干上调或下调靶基因,所以,在得知这些基因信息的基础上,使用 DNA 芯片的方法同时对成百上千的目的基因靶基因进行分析,从而间接反映目的基因的情况^[9]。

尽管可研究、发展的基因兴奋剂检测方法很多,但是探寻基因兴奋剂检测手段必须考虑到以下几点:①运动员同意接受,取样方便,比如像以往

的尿检或血检;②敏感性好,准确率高;③简便易行,易于大规模使用;④耗时短,费用小。

3 小结

在基因治疗基础上将出现的基因兴奋剂,对于提高与运动能力有关的生理机能将具有显著作用。又因其检测难度大或不可检测的特点,无疑将会受到一些运动员的“青睐”。对于基因兴奋剂的预防,除通过尽早研究出相应的检测手段,加大查处力度外,还应开展广泛深入的宣传教育活动,使运动员及教练员清楚认识到基因兴奋剂的危害,从而达到有效防止基因兴奋剂的目的。

【参考文献】

- [1] Hacein-Bey-Abina S, LeDF, et al. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002, 346: 1185-1193
- [2] WADA. Leading Scientific Research in Anti-Doping. Gene doping (An Overview and Update) . Play true - issue 2 - 2007
- [3] H.J. Haismal, O. de Hon. Gene doping. *Int J Sports Med* 2006, 27: 257-266
- [4] Cummiskey J. Report on the IOC MC gene therapy medicine and sport. 2002
- [5] WADA. The world anti-doping code. The 2006 prohibited list. International standard. Keynote address WADA health medical and research committee. 2005. Montreal: WADA, 2005
- [6] Tuomo Rankinen, Molly S. BRAY, et al. The Human Gene Map for Performance and Health-Related Fitness Phenotypes: The 2005 Update. *Med Sci Sports Exerc*, 2006, special report: 1863-1888
- [7] Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003, 228 (1): 1-14
- [8] 姚秦. 生理学. 北京: 人民卫生出版社. 2002, 54
- [9] Evanthia DK, Panagiotis A. K, et al. Erythropoietin abuse and erythropoietin gene doping. *Sports Med* 2005, 35 (10): 831-840
- [10] Gaudard A, Varlet-Marie E, et al. Drugs for increasing oxygen and their potential use in doping: a review. *Sports Med*, 2003, 33 (3): 187-212
- [11] Svensson EC, Black HB, et al. Long-term erythropoietin expression in rodents and non-human primates following intramuscular injection of a replication-defective adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 1997, 8 (15): 1797-1806
- [12] Danko I, Williams P, et al. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum Mol Genet*, 1997, 6 (9): 1435-1443
- [13] Adam D. Gene therapy may be up to speed for cheats at 2008 Olympics. *Nature*, 2001 Dec 6, 414 (6864): 569-570
- [14] Barton-Davis ER, Shoturma DI, et al. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15603-15607
- [15] Lee S, Barton ER, et al. Viral expression of insulin like growth factor -I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol*, 2004, 96: 1097-1104
- [16] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 9306-9311
- [17] Schuelke M, Lee SJ, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*, 2004, 350: 2682-2688
- [18] Fedoruk MN, Rupert JL, et al. Myostatin inhibition: A potential performance enhancement strategy. *Scand J Med Sci Sports*, 2008, 18: 123-131
- [19] Lin CR, Yang LC, et al. Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats. *Gene Ther* 2002, 9: 1247-1253
- [20] H. Lee Sweeney. Gene therapy for restoring muscle lost to age or disease is poised to enter the clinic, but elite athletes are eyeing it to enhance performance. *Scientific American*, 2004, 63-69
- [21] Wehrin JP, Marti B. Live high-train low associated with haemoglobin mass as preparation for the 2003 World Championships in two native European world class runners. *J Sports Med*, 2006, 40 (2): Short report
- [22] Ye X, Rivera VM, et al. Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Sci* 1999, 283: 88-91