

# 基因兴奋剂的研究进展

李志朋, 徐 波, 全明辉, 薛帅如

(华东师范大学 体育与健康学院, 上海 200062)

**摘 要** :运用文献综述基因兴奋剂的研究进展,探讨基因兴奋剂的分子机制、基因治疗的基本理论,从基因治疗到基因兴奋剂,基因兴奋剂的操作方法,与有氧耐力相关的基因兴奋剂,如促红细胞生成素基因兴奋剂、血管紧张素转换酶基因兴奋剂;与身体力量相关的基因兴奋剂,如胰岛素样生长因子-1基因兴奋剂、机械生长因子基因兴奋剂;基因兴奋剂的危害、对策,以加深人们对基因兴奋剂的认识,提高人们对基因兴奋剂的警惕。

**关 键 词** :基因兴奋剂;基因治疗;EPO基因;ACE基因

中图分类号 :G804.7 文献标识码 :A 文章编号 :1006-7116(2006)06-0056-04

## The progress in the study of gene doping

LI Zhi-peng, XU Bo, QUAN Ming-hui, XUE Shuai-ru

(College of Physical Education and Health, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

**Abstract** :By employing literature approach, the authors reviewed the progress in the study of gene doping, and probed into the following issues in order to intensify people's knowledge about gene doping and to sharpen people's vigilance to gene doping: The molecular mechanism of gene doping, basic theories of gene therapy, from gene therapy to gene doping, methods for operating gene doping, aerobic endurance related gene doping such as erythropoietin gene doping and gene doping with angiotensin converting enzyme, physical strength related gene doping such as gene doping with insulin like growth factor-1 and gene doping with organism growth factor, as well as the hazards of gene doping and corresponding countermeasures.

**Key words** :gene doping; gene therapy; EPO gene; ACE gene

基因兴奋剂就是通过基因治疗的方式导入运动员靶细胞内,可以提高运动员成绩的优势基因或DNA<sup>[1-2]</sup>。分子遗传学、生物工程是和基因治疗技术密切相关的领域,它们的飞速发展共同促进了基因兴奋剂技术的产生<sup>[3-4]</sup>。人们预测2008年北京奥运会可能第一次出现经过基因技术改造的运动员<sup>[5]</sup>。目前国内关于基因兴奋剂的文献资料很少,而国外关于这方面的报道日见增多。许多国外体育科研人员已经介入基因兴奋剂的研究。基因兴奋剂的分子机制是什么?有哪些种类的基因兴奋剂?基因兴奋剂的危害有哪些以及如何应对?本文结合国外关于基因兴奋剂的研究进展,对基因兴奋剂的有关问题进行综述。

## 1 基因兴奋剂的分子机制

公认的第一次基因治疗在1990年,此次治疗的是患有腺苷脱氨基酶缺乏性重症联合免疫缺陷综合征(ADA-SCID)的两个婴儿<sup>[6-7]</sup>。但是治疗效果并不理想,还不如传统的酶代替疗法。而第一次成功的基因治疗在2000年,此

次是对X染色体连锁性重症联合免疫缺陷综合征(SCID-X1)进行治疗<sup>[8]</sup>。基因治疗技术十多年来快速发展,以至于这种疗法已经发展到可对癌症和艾滋病进行治疗<sup>[9-10]</sup>,然而这种疗法的发展也带来了其副产物——基因兴奋剂。或者更为准确的说,是基因疗法的不断完善给基因兴奋剂的使用带来了可能<sup>[11]</sup>。

### 1.1 基因治疗的基本理论

基因治疗是指将人的正常基因或者有治疗作用的基因导入人体靶细胞以纠正基因的缺陷,杀灭病变细胞或抑制外源性病原体遗传物质的复制,是一种基因工程新疗法。基因治疗有3个组成要素<sup>[12]</sup>:目的基因,人的正常基因或者有治疗作用的基因,载体,携带基因进入细胞内表达的介质,其中包括病毒载体和非病毒载体,作为载体的病毒的毒性已经去除<sup>[10]</sup>,靶细胞,治疗基因通过基因转移技术插入的病人的受体细胞。

基因治疗有两种途径 in vivo(体内)和 ex vivo(体外)<sup>[9,13]</sup> in vivo 是将外源基因装配于特定的真核细胞表达载体,直接导入体内,这种载体可以是病毒型或非病毒型,甚

至是裸 DNA, *ex vivo* 是指将含外源基因的载体在体外导入细胞, 经过外细胞扩增后, 输回人体。

## 1.2 从基因治疗到基因兴奋剂

随着基因治疗技术的不断完善, 基因兴奋剂的使用已经有了可能<sup>[11]</sup>。与基因治疗所不同的是, 基因兴奋剂服务的对象已经由患者转为健康的运动员。临床试验表明: 被用作基因兴奋剂的基因可能存活数年, 并产生大量的正常的建造肌肉的化学物质。1997 年 Leiden 等<sup>[14]</sup>用基因治疗技术将 EPO 基因转移到大鼠和猴子体内, 处理后大鼠红细胞数由 49% 增加到 81%, 这个表达水平保持一年, 猴子红细胞数目由 40% 增加到 70%, 这个表达水平保持 12 周。这就使人很容易联想到如果用同样的方法将 EPO 基因转入运动员体内, 很可能会长期增强运动员的运动能力。

## 1.3 基因兴奋剂的操作方法

以胰岛素样生长因子-1 (hIGF-1) 基因为例, 简要说明基因兴奋剂操作: 应用 EcoR I 对 pGEM-T/hIGF-1 进行初步酶切, 将酶切后所得到的 hIGF-1cDNA 正向克隆于 EcoR I 酶消化后的 pcDNA3.1(-) 之中构建 hIGF-1 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)/hIGF-1, 应用阳性脂质体介导的基因转染技术, 将真核表达质粒 pcDNA3.1(-)/hIGF-1 瞬时转染人体肌细胞中。这种操作已经在动物实验中获得成功, 被转染成肌细胞后, 小鼠 hIGF-1mRNA 及蛋白表达水平明显提高。

## 2 与有氧耐力相关的基因兴奋剂

现阶段研究的主要是与有氧耐力和身体力量相关的基因, 与速度相关的基因很少涉及。所以本文主要介绍与有氧耐力和身体力量相关的基因兴奋剂。

### 2.1 促红细胞生成素(EPO)基因兴奋剂

EPO 作用于红骨髓造血干细胞, 促使干细胞分裂、分化, 生成红细胞的过程称为“促红细胞生成”, 这是机体产生新生红细胞的唯一途径<sup>[13]</sup>。EPO 对人体生理作用是这样的重要, 以至于 20 年前就把它作为第一个造血因子来克隆用于临床治疗。

重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 已为人们所熟知。也就是把人体红细胞生成素基因转移到动物细胞中, 增加了其体内的血红细胞数量和促红细胞生成素浓度。rhEPO 能通过增加人的最大摄氧量而增加人的有氧耐力, 可见是医学技术促进了把 rhEPO 作为兴奋剂用于有氧耐力型项目<sup>[14]</sup>。早在 19 世纪 90 年代 rhEPO 就被滥用在了耐力性运动中<sup>[15]</sup>。但是这样得到的红细胞生成素与人体内源性红细胞生成素有差别。可靠的检测技术介入关于 rhEPO 兴奋剂的检测, 这就使运动员更倾向于选择基因兴奋剂<sup>[16]</sup>。

可以大大增加人体血红细胞的变异基因现在已经找到, 因此基因促红细胞生成素有可能成为最先被运动员使用的基因兴奋剂。基因促红细胞生成素兴奋剂与重组促红细胞生成素不同, 它是把人体促红细胞生成素基因转移到人体细胞中, 再由人体分泌所得。进入人体的 EPO 基因表达受 HIF-1 $\alpha$  调控, 所谓 HIF-1 $\alpha$  是一个新发现的, 组织缺氧诱导因

子-1 (HIF-1) 所特有的, 受低氧调控的亚基。低氧可以使 HIF-1 $\alpha$  聚集并转移到细胞核激活红细胞生成素基因的表达, 促使红细胞生成素分泌<sup>[15]</sup>。基因促红细胞生成素与内源性红细胞生成素极为相似, 很难被检测<sup>[13]</sup>。这种红细胞生成素, 已成为一个备受竞技体育关注的问题。在因斯布鲁克冬奥会上, Mantyranta 赢得滑雪项目的两枚金牌, 夺冠的秘密是此人的红血球比正常人高 25% ~ 50%, 这就有利于他持久地进行持续的剧烈的速滑运动<sup>[17]</sup>。不难想象, 几年后, 有可能通过基因治疗技术将 Mantyranta 的促红细胞生成素基因直接注入其他运动员体内, 产生更多的内源性血红细胞生成素和血红细胞, 从而增强运动员的运动能力。

### 2.2 血管紧张素转换酶基因(ACE 基因)兴奋剂

十多年前, 人们就明白这个道理——运动员遗传的显著差异会导致他们运动能力的显著差异<sup>[18]</sup>。随着人类基因组计划的完成, 人类基因组研究的重心逐渐向基因的功能及基因的多态性倾斜<sup>[19]</sup>。研究中发现 ACE 基因是决定耐力素质的关键<sup>[20]</sup>。所以现在和耐力相关基因多态性研究中, ACE 成为最大的焦点<sup>[21]</sup>。和促红细胞生成素基因类似, ACE 基因同样可以作为基因兴奋剂, 增强运动员的有氧耐力。ACE 基因位于 17q23, 全长 21 kb, 含有 26 个外显子和 25 个内含子。受其调控的而生成的 ACE 是肾素-血管紧张素系统的关键酶, 具有促进无活性的血管紧张素 I 转化为高活性的血管紧张素 II 的生物学功效<sup>[22]</sup>, 从而刺激血管收缩导致血压升高, 增强心肌收缩性、增加心率、削弱舒张期的松弛, 对哺乳动物的心肌细胞产生正性变力和变时效应, 并调节体液和电介质平衡。研究表明, ACE 基因的这一多态性可能与杰出耐力相关。在 ACE 基因的第 16 号内含子以是否含有一段 287bp 的 Alu 重复序列为标记构成 ACE 基因的 I/D 多态。I 型人群血清和组织中 ACE 活性较低, D 型则相反。Montgomery<sup>[23]</sup>报道 33 名全英优秀登山运动员的 ACE 基因多为 II 纯合子, 少见 DD 纯合子, 且 II 型纯合子频率显著高于 906 名健康对照。而且曾登上海拔 8 000 m 高度的运动员中无一例 DD 纯合子。Myerson<sup>[24]</sup>对英国奥林匹克运动员的研究发现径赛运动员的运动专项距离与 ACEII 型等位基因高度相关。专项距离  $\leq 200$  m 的项目的运动员, I 型等位基因出现的频率最低, 5 000 m 以上的运动员 I 型等位基因出现的频率最高。Tsiano<sup>[25]</sup>对苏格兰优秀的运动员所做的研究也证实了上述观点。Halil Tanriverdi<sup>[26]</sup>通过实验证明, 规律的耐力训练有利于内皮依赖型的血管舒张, 特别是基因型为 ACEII 的运动员。David R. Woods<sup>[27]</sup>实验证明了 ACE 基因的基因型和血氧饱和度相关, 同海拔条件下, ACEII 的运动员血氧饱和度较高。Lucia A<sup>[21]</sup>实验通过具有奥运水平的 27 位西班牙跑步运动员和 119 名西班牙人的久坐对照组对比分析证明 ACEII 在运动员中占 40.7%, 与对照组有显著差异性。综上所述可知 ACE 基因和耐力相关, ACEII 更有利于有氧耐力运动项目的运动能力。关注于运动能力相关的 ACEII 基因进展, 防止运动员使用该基因作为基因兴奋剂, 对于将来应对该基因兴奋剂更有利于采取主动预防和检测措施。

## 3 与身体力量相关的基因兴奋剂

2004年6月23日,New England Journal of Medicine介绍了一名出生不久就发生基因突变的“巨人婴儿”,这名婴儿在4岁的时候就能用一只手轻轻举起3 kg重的哑铃。这是人类第一次发现与身体力量相关的基因突变。随着人类基因图谱的不断完善,新的突变基因序列很快就被识别。如果将此婴儿的突变基因经过识别测序,然后使用基因治疗手段转入运动员相应的靶细胞。这样基因技术通过改变身体力量相关的基因,可以很快地增加肌肉的力量<sup>[28]</sup>。

### 3.1 胰岛素样生长因子-I(IGF-I)基因兴奋剂

IGF-I产生于肝脏和肌肉组织,具有合成代谢的功能<sup>[17]</sup>,能通过加快蛋白质的合成和卫星细胞的生长增加健康人的体积。Sweeney等<sup>[29]</sup>实验证明,用线相关病毒(AAV)作为载体,对其进行筛选,使其含有IGF-I基因,然后用AAV-IGF-I侵染正常大鼠骨骼肌细胞,并在其中表达。大鼠肌肉整体数量和增长率增加15%。

### 3.2 机械生长因子(MGF)基因兴奋剂

Geoffrey Goldsprink是被WADA基金资助的为数不多的几个研究员之一,他正在研究基因兴奋剂的一种检测方法,他证明了大鼠转移了MGF基因三周后肌肉量增加了30%。这个研究对临床治疗肌肉萎缩有很大的应用前景<sup>[5]</sup>。MGF产生于血液组织,不参与血液循环中,是运动后可以自然产生的激素,刺激肌肉生长<sup>[17]</sup>,随着年龄的增长,MGF越来越少。与IGF-I相似,MGF的基因疗法在临床医学上具有符合道德的应用,MGF被证实对肌肉、韧带、骨骼、半月板等组织的发展有帮助作用,此外,它能加快损伤的恢复。但是我们必须注意到,它也被用于基因兴奋剂,提高专项肌群的体积和力量。

## 4 基因兴奋剂的危害

由于基因治疗技术现在很不完善<sup>[5,21]</sup>,目前存在的最大问题是基因转移技术<sup>[30]</sup>,这就给基因兴奋剂的使用带来很多隐患。如用病毒载体治疗时,这种载体易于制作,携带目的基因的量,风险小等优点,但是这种载体转移有效性相对较低,且转移后的基因在体内表达时间较短。使用病毒载体时转移的有效性相对较高,转移基因表达时间较长<sup>[28]</sup>,靶细胞识别较准确,但是这种载体制作过程很复杂,携带目的基因的量很有限,且增加了治疗的风险<sup>[9]</sup>。在使用病毒为媒介的所有基因兴奋剂中,总存在免疫原的危害。基因导入后如果处于无调控状态,会造成严重的效果<sup>[31]</sup>。现在使用促红细胞生成素基因兴奋剂最大的危害是无法有效控制血红蛋白数量,易引起多血质病及高血红素血症,因此使用很有可能出现心血管方面的疾病,例如外周微血栓甚至深静脉血栓,其后果对心脏和脑有严重的影响。IGF-I和肌抑制素抑制基因过度表达,会造成肌肉体积的过度增长,由于骨骼、关节和其他连结性组织没有相应发展,结缔组织损伤的可能性会增大<sup>[28]</sup>。滥用基因兴奋剂可能导致白血病或者其他类型的癌症,而且基因兴奋剂不像传统的兴奋剂导致的疾病那样容易治疗,这种麻烦病症可能要持续很长一段时间,也有遗传给下一代的风险<sup>[10]</sup>。

## 5 基因兴奋剂的对策展望

目前还没有有效的方法检测基因兴奋剂,血检和尿检均不能有效检出,原因就是它是从细胞水平发挥作用,且产物和内源性的分子几乎没有区别<sup>[3]</sup>。现行的唯一的方法就是肌肉活组织切片检查。基因兴奋剂会扼杀公平、合理的体育精神。基因治疗技术一旦应用于竞技体育,那将给体育界,尤其是现行的体育法规和体育道德规范带来致命的打击。国际反兴奋剂机构(WADA)Richard W Pound提议在基因兴奋剂到来之前应该着手应对来自它的威胁。其实早在2002年3月,WADA就举行会议第一次对此观点进行了研讨<sup>[5,17]</sup>,会议认为可以通过立法、教育等手段来阻止基因兴奋剂的到来。基因兴奋剂的威胁如此之大,以至于WADA及时规定禁止使用基因兴奋剂的条件,2003年,ICOC(国际奥林匹克委员会)和WADA一起把基因兴奋剂列入反兴奋剂条例<sup>[13]</sup>。新的条例取代了2001年9月1号的兴奋剂条例并于2003年1月1日生效<sup>[17]</sup>。科学研究在反兴奋剂方面不断取得进展,2004年9月Lasne和Chenuand发表了关于检测红细胞生成素基因兴奋剂的研究。

对于基因兴奋剂的预防措施和检测方法,现在的研究还远远不够。为此,我国体育科研人员,不但要时刻关注国外基因兴奋剂相关各领域的研究进展情况,关注那些可以作为基因兴奋剂的优势基因及其可能的基因转移的基因操作方法和人体内的表达机制,这些基因的表达和内源性基因表达的细微差别,还应该积极开展相应的实验,以及时应对基因兴奋剂对竞技体育的威胁。

### 参考文献:

- [1] Gaudard A, Varlet - Marie E, Bressolle F, et al. Drugs for increasing oxygen and their potential use in doping[J]. Sports Med, 2003, 33(3):187-212.
- [2] Unal M, Ozer U D. Gene doping in sports[J]. Sports Med, 2004, 34(6):357-362.
- [3] Giuseppe L, Giancesare G. New scenarios in antidoping research[J]. Clinical Chemistry 2003, 49:2106-2107.
- [4] Ian R. Genetically modified athletes: Biomedical ethics, gene doping and sport[J]. Sociology of Sport Journal, 2005, 22:239-241.
- [5] Stephen P. Feature gene doping[J]. Medicine and Sport, 2005, 366:S18-S19.
- [6] Blaese R M, Culver K W, Miller A D, et al. T lymphocyte - directed gene therapy for ADA - SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270:475-480.
- [7] Gene therapy clinical trials worldwide[E].(www.wiley.co.uk/genmed/clinical).
- [8] Cavazzana - Calvo M. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID) - X1 disease[J]. Science, 2000, 288:669-672.
- [9] Trent R J A, Alexander I E. Gene therapy: applications and progress towards the clinic[J]. Internal Medicine Journal, 2004, 34

- (11) 621 - 625.
- [ 10 ] Trent R J A , Alexander I E. Gene therapy in sport[ J ]. British Journal of Sports Medicine 2006 ,40 ( 4 ) : 4 - 5.
- [ 11 ] McCrory P. Gene doping[ J ]. Br J Sports Med 2004 ,38 :11.
- [ 12 ] 顾健人 ,曹雪涛. 基因治疗[ M ]. 北京 :科学出版社 ,2001.
- [ 13 ] Diamanti - Kandarakis. Erythropoietin abuse and Erythropoietin gene doping[ J ]. Sports Med 2005 ,35 ( 10 ) :831 - 840.
- [ 14 ] Svensson E ,Black H ,Dugger D. Long term erythropoietin expression in rodents and non - human primates following intramuscular injection of a replication - defective adenoviral vector[ J ]. Hum Gene Ther 1997 ,8 :1797 - 1806.
- [ 15 ] Lippi G ,Guidi G C. Gene manipulation and improvement of athletic performances : new strategies in blood doping[ J ]. Br J Sports Med 2004 ,38 :641.
- [ 16 ] Leigh - Smith S. Blood boosting[ J ]. Br J Sports Med 2004 ,38 :99 - 101.
- [ 17 ] McCrory P. Super athletes or gene cheats[ J ]. Br J Sports Med 2003 ,37 :192 - 193.
- [ 18 ] Nazarov I , Woods D , Montgomery H. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes[ J ]. Eur J Hum Genetics 2001 ,9 :797 - 801.
- [ 19 ] Cheung V G ,Morley M ,Aguilar Fetal. Making and reading microarrays[ J ]. Nature Genetics 1999 ,21 :15.
- [ 20 ] George G ,Brett H. Elite endurance athlete and ACE I allele : the role of genes in athletic performance[ J ]. Hum Genet 1998 ,103 :48 - 50.
- [ 21 ] Lucia A. Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and Cycling performance status 3 - week races[ J ]. Int J Sports Med 2004 ,25 :442 - 447.
- [ 22 ] Melek Bor - Kucukatay. The Tohoku journal of experimental [ J ]. Medicine 2006 ,208 ( 2 ) :147 - 155.
- [ 23 ] Montgomery H E ,Marshall R ,Hemingway H ,et al. Human gene for physical performance[ J ]. Nature 1998 ,393 :221 - 222.
- [ 24 ] Myerson S ,Hemingway H ,Budget R ,et al. Human angiotensin I - converting enzyme gene and endurance performance[ J ]. J Appl Physiol 1999 ,87 :1313 - 1316.
- [ 25 ] Tsianos G ,Sanders J ,Dhamrait S ,et al. The ACE gene insertion/deletion polymorphism and elite endurance swimming[ J ]. Eur J Appl Physiol 2004.
- [ 26 ] Halil T. Improved endothelium dependent vasodilation in endurance athletes and Its relation with ACE I/D polymorphism[ J ]. Circulation Journal 2005 ,69 ( 9 ) :1105 - 1110.
- [ 27 ] David R. Woods . Humphries and Hugh E. Montgomery. Insertion/Deletion polymorphism of the angiotensin I - Converting enzyme gene and arterial oxygen saturation at high altitude[ J ]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2002 ,166 :362 - 366.
- [ 28 ] Scott R. Are we dopes to ignore gene doping[ J ]. National Strength and Conditioning Association Journal 2005 ,27 ( 1 ) :36 - 37.
- [ 29 ] Elisabeth R Barton - Davis ,Daria I Shoturma ,H Lee Sweeney et al. Viral mediated expression of insulin - like growth factor I blocks the aging - related loss of skeletal muscle function[ J ]. The National Academy of Sciences 1998 ,95 ( 26 ) :15603 - 15607.
- [ 30 ] Verma I M ,Somia N. Gene therapy - promises ,problems and prospect[ J ]. Nature 1997 ,389 :239 - 242.
- [ 31 ] 卢圣栋. 生物技术与疾病诊断——兼论人类基因治疗[ M ]. 北京 :化学工业出版社 2002.

[ 编辑 :郑植友 ]