



评述

中国知名大学及研究院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

鼠类对抗凝血类灭鼠剂抗药性的遗传机制

宋英, 李宁, 王大伟, 刘晓辉

中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害国家重点实验室, 杂草鼠害重点实验室, 北京 100193

E-mail: ysong@ippcaas.cn

收稿日期: 2015-12-10; 接受日期: 2016-03-04; 网络版发表日期: 2016-05-25

国家自然科学基金(批准号: 31401761)和中国农业科学院基本科研业务费预算增量项目(批准号: 2015ZL038)资助

摘要 抗凝血类灭鼠剂是鼠类化学防治过程中最常用的, 然而鼠类对抗凝血类灭鼠剂的抗药性极大地降低了灭鼠的效率。鼠类可以通过多种分子途径产生抗药性, 维生素 K 环氧化物还原酶复合体, 亚单位 1 基因是抗凝血类灭鼠剂的靶基因, 该基因上的氨基酸变异是鼠类产生抗性的主要途径, 此外, 细胞色素氧化酶 P450 基因、*Calumin* 基因等也参与介导鼠类的抗药性。本文简单总结了全世界鼠类抗药性的现状, 重点介绍了鼠类产生抗药性的分子机制及最新研究进展。

关键词 鼠, 抗凝血类灭鼠剂, 抗药性, *Vkorc1*, 遗传机制

鼠类广泛分布于世界各地, 不仅危害农林牧业, 也传播多种自然疫源性疾病, 如鼠疫、钩端螺旋体病、流行性出血热、恙虫病等^[1], 因此必须采取安全有效的措施控制鼠害, 以保障人类的生产、生活和生命健康。相较于磷化锌、毒鼠磷、氟乙酰胺等急性灭鼠剂, 抗凝血类灭鼠剂相对比较安全、适口性好、灭鼠效率高, 是 20 世纪 50 年代以来鼠害化学防治过程中最常用的一类慢性灭鼠剂。目前广泛使用的抗凝血类灭鼠剂均为 4-羟基香豆素和 1,3-茚满二酮类的衍生物。以杀鼠灵(warfarin)等为代表的第一代抗凝血类灭鼠剂于 20 世纪 50 年代左右开始在欧美被广泛用于控鼠和灭鼠, 然而不到 10 年的时间就出现了抗性鼠^[2]。首例抗性鼠于 1958 年在苏格兰的褐家鼠(*Rattus norvegicus*)中发现的^[2], 随后在许多西方国家

包括丹麦、芬兰、法国、德国、意大利、美国、加拿大等都发现了抗性鼠群^[3,4]。从 80 年代开始毒性更强的溴敌隆(bromadiolone)、大隆(brodifacoum)、鼠得克(difenacoum)等第二代抗凝血类灭鼠剂开始被广泛使用, 然而使用不久就发现鼠类对第二代抗凝血类灭鼠剂也产生了抗药性^[5,6]。

我国从 80 年代开始大规模推广使用抗凝血类灭鼠剂, 在此之前主要以磷化锌、毒鼠磷、氟乙酰胺、毒鼠硅等急性灭鼠剂为主^[7]。自 1985 年开始, 我国鼠类抗药性监测协作组采用无选择致死期食毒法(lethal feeding period, LFP)对我国鼠类的抗性状况进行监测, 经过 10 多年的调查发现, 连续使用抗凝血类灭鼠剂超过 6 年的地区, 家栖鼠类对杀鼠灵等灭鼠剂存在不同程度的抗药性和交互抗性, 而在使用不足 6 年的地

引用格式: 宋英, 李宁, 王大伟, 等. 鼠类对抗凝血类灭鼠剂抗药性的遗传机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 619–626
Song Y, Li N, Wang D W, et al. Genetic mechanism of resistance to anticoagulant rodent poison in rodents. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 619–626, doi: 10.1360/N052016-00161

区没有发现抗性^[7]。目前我国很多地区的鼠类,尤其是家栖鼠类,都出现了第一代抗凝血类灭鼠剂的抗性种群,例如,黄胸鼠(*Rattus tanezum*)对杀鼠灵的抗性率1999年在湛江地区达17.7%^[8],2000年在长沙市为72.72%^[9],2003年在广州市区达45.2%^[10];小家鼠(*Mus musculus*)对杀鼠灵的抗性率2003~2004年在广东省不同市区的抗性率为27.8%~50.0%^[10,11];黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)2005年北京市顺义地区对杀鼠灵抗性率达36.4%^[12],这些抗性鼠群的产生导致第一代抗凝血类灭鼠剂的防治效果大幅下降。而且,我国湖南、贵州、吉林等部分地区的害鼠对第二代灭鼠剂也已经产生抗性^[13-15]。抗药性的产生降低了抗凝血类灭鼠剂的使用效率,给灭鼠工作带来很大的挑战。

无论是第一代还是第二代抗凝血类灭鼠剂的灭鼠效率降低主要是因为鼠类对灭鼠剂产生了行为抗性或生理抗性。前者表现为鼠类拒食毒饵^[7];后者主要是指鼠类的抗药靶基因或相关基因的表达量或蛋白结构的改变,导致鼠类对抗凝血类灭鼠剂不敏感,还有的鼠种天生对抗凝血类灭鼠剂就有较强的耐受性,例如,地中海小家鼠(*Mus spretus*)、非洲刺毛鼠(*Acomys cahirinus*)、小亚细亚沙鼠(*Meriones shawi*)、金仓鼠(*Mesocricetus auratus*)等对抗凝血类灭鼠剂有较高的耐受性^[16,17]。我国常见的家栖鼠类对杀鼠灵的耐受程度也是不一致的,小家鼠的耐受性(杀鼠灵存活剂量338 mg/kg)最强,其次是黄胸鼠(杀鼠灵存活剂量143 mg/kg),褐家鼠的耐受性最低(杀鼠灵存活剂量12 mg/kg)^[18]。随着对鼠类抗药性机制的深入研究,越来越多的研究表明,鼠类所表现的抗药性或

耐药性都是由其特定的遗传和生理基础决定的。

1 抗药靶基因 *Vkorc1* 介导的抗性机制

抗凝血类灭鼠剂的杀鼠作用主要是通过阻止鼠类的维生素K的循环,导致凝血功能障碍,中毒鼠表现为口、鼻、肛、爪或尿道等外出血体征,剖检可见肝脏、皮下、消化道等内出血病变^[19]。在维生素K循环中,维生素K环氧化物还原酶(vitamin K epoxide reductase, VKOR)可以将氧化型的维生素K还原为维生素K,并将自身生成和食物中获得的维生素K继续还原为还原型维生素K^[20]。很多凝血因子(凝血因子II, VII, IX等)和抗凝血因子蛋白C、蛋白S、蛋白Z等在活化的过程中需要将谷氨酸残基通过 γ -羧化过程变为 γ -羧基谷氨酸,还原型维生素K是凝血因子 γ -羧化过程的关键性辅助因子,在此过程中还原型维生素K就变为氧化型的维生素K(图1)^[20]。杀鼠灵等抗凝血类灭鼠剂与维生素K的基本化学结构类似,可以与维生素K循环中的VKOR相结合,阻止还原型维生素K的生成,从而阻止凝血因子的活化导致凝血功能障碍(图1)^[20]。Ren等人^[21]发现,杀鼠灵钠盐、杀鼠迷、敌鼠等9种抗凝血类灭鼠剂都可以抑制VKOR的活性,这些抗凝血类灭鼠剂相似的作用机制决定了鼠类对第一代和第二代不同的抗凝血类灭鼠剂可以产生交互抗性。直到2004年,编码VKOR的基因——维生素K环氧化物还原酶复合体亚单位1(vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1, *Vkorc1*)发现后^[22,23],鼠类产生抗药性的分子遗传机制才逐渐被阐明。

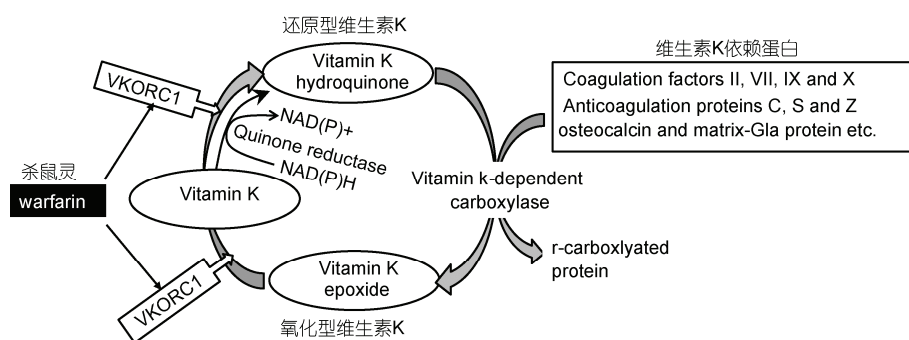


图1 杀鼠灵的抗凝血机制

杀鼠灵与维生素K循环中的维生素K环氧化物还原酶复合体,亚单位1(VKORC1)相结合,阻止维生素K的循环,从而进一步阻止凝血因子的 γ -羧化过程,导致凝血功能障碍^[20]

1.1 通过种群内 *Vkorc1* 基因的单核苷酸变异获得抗药性

在小家鼠、褐家鼠和屋顶鼠(*Rattus rattus*)中, *Vkorc1* 基因全长约 2.5 kb, 编码 161 个氨基酸. *Vkorc1* 基因上的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP), 尤其是引起氨基酸改变的 SNP, 可以导致鼠类对抗凝血类灭鼠剂的抗性^[3,24,25]. 目前关于鼠类 *Vkorc1* 基因多态性的研究主要集中于小家鼠、褐家鼠和屋顶鼠中^[3,24-31], 在其他鼠类包括黄胸鼠和黄毛鼠(*Rattus losea*)中也有少量报道^[32,33]. 至今已在褐家鼠、小家鼠和屋顶鼠的 *Vkorc1* 基因中分别发现了 15, 11 和 12 种不同的氨基酸变异(表 1)^[3,24-31,34], 其中至少 10, 5 和 6 种氨基酸变异被体内或体外实验证明可以导致这 3 种鼠类对抗凝血类灭鼠剂的抗性(表 1)^[3,24,25,31,35]. Pelz 等人^[3]和 Rost 等人^[24]通过体外实验比较了褐家鼠不同氨基酸变异(Tyr139Cys/Phe/Ser, Leu128Gln, Ala26Thr, Arg33Pro, Arg35Pro, Tyr39Asn, Trp59Arg, Phe63Cys, Glu67Lys 等)对 VKOR 活性的影响, 发现经杀鼠灵处理后携带 Tyr139 位点变异的 VKOR 的活性最高, 其次是 Leu128 位点的变异, 另外携带第 33, 35, 59, 120 位氨基酸变异的 VKOR 在经杀鼠灵处理后也保持相对较高的活性, 这些氨基酸变异主要影响蛋白的催化活性、与底物结合的能力等, 例如, VKORC1 第 139 位的氨基酸(Tyr139)与第 138 位的 Thr 和第 140 位的 Ala 被认为是杀鼠灵等抗凝血类灭鼠剂的结合位点, Tyr139 位点的变异可以导致小家鼠和褐家鼠对抗凝血类灭鼠剂的抗药性. 目前关于我国鼠类的 *Vkorc1* 基因多态性的研究仅在黄毛鼠和黄胸鼠中报道^[32,33], 本实验室曾研究了我国湛江市黄胸鼠 *Vkorc1* 基因多态性与黄胸鼠抗药性的关系, 在筛选的 4 只抗性黄胸鼠中, 只有 1 只黄胸鼠的 *Vkorc1* 基因携带 Tyr139Cys 突变, 说明除了 *Vkorc1* 基因上的变异外, 还可能存在其他机制导致黄胸鼠产生抗药性^[32].

Vkorc1 基因多态性是鼠类对抗凝血类灭鼠剂产生抗药性的重要机制之一, *Vkorc1* 的抗性变异在抗药性较低的种群中可能以较低或极低的频率存在, 然而经过抗凝血类灭鼠剂的选择作用后, 携带抗性变异的个体存活下来并大量繁殖, 从而产生抗性种群. 表 1 总结了目前小家鼠、褐家鼠和屋顶鼠中发现的 *Vkorc1* 基因的氨基酸变异以及地理分布, 其中与抗

性相关氨基酸变异的频率和分布可以用来监测鼠类种群的抗性分布和抗性水平.

1.2 通过遗传渗入其他物种的 *Vkorc1* 基因获得抗药性

本研究组最近的研究发现, 西部欧洲小家鼠(*Mus musculus domesticus*) *Vkorc1* 基因的 4 个氨基酸变异(Arg12Trp, Ala26Thr, Ala48Thr 和 Arg61Leu)不是来自欧洲小家鼠种群内部的变异, 而是通过遗传渗入从地中海小家鼠中获得的, 并且携带这 4 个氨基酸变异的欧洲小家鼠对抗凝血类灭鼠剂具有抗药性^[25]. 西部欧洲小家鼠和地中海小家鼠大约在 1.5~3 百万年前就分化为不同的种^[36], 它们同域分布于非洲北部、西班牙以及法国南部, 而在欧洲其他国家如德国、意大利等只有欧洲小家鼠的分布^[25]. 实验室杂交实验表明, 这两种小家鼠杂交后有约 1/4 的后代是可育的, 即只有雄性地中海小家鼠与雌性欧洲小家鼠杂交的 F₁ 代是完全正常可育的^[36]. 研究发现, 德国和西班牙的部分欧洲小家鼠第 7 染色体上携带了 >10 Mb 的地中海小家鼠染色体片段, 其中包含完整的地中海小家鼠 *Vkorc1* 基因^[25]. 采用致死期毒法对携带整个地中海小家鼠 *Vkorc1* 基因的欧洲小家鼠进行生理抗性检测, 发现这些小家鼠对杀鼠迷和溴敌隆都具有抗性^[25]. Baeumler 和 Asran^[16]发现, 地中海小家鼠自身对溴敌隆、大隆、杀鼠迷、氯敌鼠多种抗凝血类灭鼠剂具有抗药性, 本研究组分析了地中海小家鼠与欧洲小家鼠的 *Vkorc1* 基因的非同义氨基酸变异频率与同义氨基酸变异频率的比率(Ka/Ks), 发现地中海小家鼠的 *Vkorc1* 基因在进化过程中受到正向选择的压力, 认为地中海小家鼠很多生活在非洲的沙漠或者半干旱地区, 那里缺乏富含维生素 K 的食物, 地中海小家鼠的 *Vkorc1* 基因的快速进化是对维生素 K 缺乏环境的一种长期适应, 与抗凝血类灭鼠剂的选择作用无关^[25]. 除了地中海小家鼠, 非洲刺毛鼠、小亚细亚沙鼠、金仓鼠等很多生活在干旱地区的草食性鼠类都对抗凝血类灭鼠剂表现出较高的天然耐受性^[17], 这些鼠类的耐药性较高可能也是对维生素 K 缺乏环境长期适应的结果, 也可能对富含香豆素类植物的一种适应性进化^[37], 但具体的机制仍需进一步研究.

德国虽然没有地中海小家鼠的分布, 然而本研究组发现, 在西班牙和德国的欧洲小家鼠种群中, 分

表 1 褐家鼠、欧洲小家鼠和屋顶鼠维生素 K 环氧化物还原酶复合体, 亚单位 1(VKORC1)的氨基酸变异及变异的地理分布^{a)}

褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)																								
位置	Arg12	Ala21	Tyr25	Ala26	His28	Arg33	Arg35	Glu37	Tyr39	Arg40	Ala41	Ala48	Ser56	Arg58	Trp59	Arg61	Phe63	Glu67	Leu76	Gln120	Leu124	Leu128	Tyr139	Glu155
突变	-	Thr	-	Thr	-	Pro*	Pro*	-	Asn	-	-	-	Pro*	-	-	-	Cys*	Lys	-	Leu*	-	Ser*/Gln*	Cys*/Ser*/Phe*	Lys
英国	-	-	-	Rn	-	Rn	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	Rn	-	Rn	Rn	-
匈牙利	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	Rn	-
丹麦	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	Rn	-
德国	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	Rn	-
法国	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	-	Rn	Rn	-
比利时	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	Rn	-
美国	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
韩国	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-
日本	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rn	-	-	-	-	-	-

欧洲小家鼠(*Mus musculus*)																								
突变	Trp*	-	-	Thr*	-	-	-	Gly	-	-	-	Thr*	-	Gly	Leu/Ser	Leu*	-	-	-	Gln	Ser*	Cys*	-	-
英国	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mm	Mm	-	-
德国	Mm	-	-	Mm	-	-	-	Mm	-	-	-	Mm	-	Mm	Mm	Mm	-	-	-	Mm	Mm	Mm	-	-
亚速尔群岛	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Mm	Mm	-	-
瑞士	Mm	-	-	Mm	-	-	-	-	-	-	-	Mm	-	-	-	Mm	-	-	-	-	Mm	Mm	-	-
西班牙	Mm	-	-	Mm	-	-	-	-	-	-	-	Mm	-	-	-	Mm	-	-	-	-	Mm	Mm	-	-
屋顶鼠(*Rattus rattus*)																								
-	Thr	Phe	Thr	Gly	-	Pro	Gly	-	Gly	-	Thr*/Val*	-	-	Trp*	-	Trp*	Pro*	-	-	-	-	Phe*	-	-
日本	-	Rr	Rr	Rr	-	-	Rr	Rr	-	-	Rr	Rr	-	-	Rr	-	Rr	-	-	-	-	Rr	-	-

a) 第一行位置为野生型氨基酸在对应 VKORC1 上的位置, 突变下方的黑色方形表示某个突变在某个国家被报道过, *: 经体内或体外实验证实可以导致褐家鼠(Rn)、欧洲小家鼠(Mm)和屋顶鼠(Rr)产生抗性的变异

别约 90% 和 43% 的小家鼠携带全部或部分的地中海小家鼠 *Vkorc1* 基因^[25], Pelz 等人^[27]后来发现, 瑞士的欧洲小家鼠也携带地中海小家鼠的 *Vkorc1* 基因, 说明地中海小家鼠的 *Vkorc1* 在抗凝血类灭鼠剂的选择作用下已经从两种鼠类的共同分布区向其他地区的欧洲小家鼠种群中扩散. 该研究不仅揭示了欧洲小家鼠产生抗药性的一个新途径, 同时也揭示了适应性遗传渗入在动物进化过程中的意义. 适应性遗传渗入在动物中的例子比较少, Hedrick^[38]总结分析了目前在动物中发现的十几例适应性遗传渗入的例子, 然而能找到决定渗入性状的基因, 并证明(接受者)种群中遗传渗入的(捐献者)基因不是偶然杂交的结果而是杂交后受到自然或人为的选择压力结果的研究非常少, 而欧洲小家鼠通过杂交获得抗药性的研究就是其中一例.

为了研究欧洲小家鼠基因组上是否还存在其他的遗传渗入片段, 以及这些遗传渗入片段在欧洲小家鼠基因组中的分布和频率, Liu 等人^[39]在该研究的基础上继续分析了来自德国、西班牙、意大利及非洲北部 3 个国家的共 20 只欧洲小家鼠的全基因组 DNA 芯片, 发现欧洲小家鼠基因组中携带了 0.02%~0.8% 的地中海小家鼠染色体片段, 其中最长的遗传渗入片段就是本研究组之前发现的 *Vkorc1* 基因所在的遗传渗入片段^[25], 并且通过对遗传渗入片段的长度、频率、自然选择信号等因素的综合分析, 推论欧洲小家鼠与地中海小家鼠历史上至少发生 3 次适应性遗传事件, 其中最古老的一次适应性遗传渗入可能发生在大约 2000 年前欧洲小家鼠入侵欧洲时, 最近的一次适应性遗传渗入与抗凝血类灭鼠剂的选择作用相关.

2 细胞色素氧化酶 P450 基因参与介导的抗性机制

细胞色素氧化酶 P450 基因参与抗凝血类灭鼠剂在鼠类体内的代谢, 该基因的多态性或表达量变化与鼠类对抗凝血类灭鼠剂的抗性相关. 以杀鼠灵为例, 杀鼠灵的主要成分华法林(warfarin)是临床最常用的治疗血栓栓塞等心血管疾病的处方药, 但在使用时必须严格针对每个人的情况来决定服用的剂量, 因为剂量过多会导致内出血, 剂量过少又起不到防止血栓栓

塞的作用. 华法林为 *S* 型和 *R* 型异构体等比例组成的消旋混合物, *S* 型和 *R* 型的华法林都可以与 VKOR 相结合, *S* 型异构体主要受细胞色素氧化酶 CYP2C9 的催化作用进行代谢, 而 *R* 型异构体主要由 CYP3A4, CYP1A2 和 CYP2C19 等酶催化和代谢^[40]. 决定华法林临床剂量的因素包括非遗传因素, 如性别、年龄、体重、种族、食物等, 遗传因素如抗药靶基因 *VKORC1* 和细胞色素氧化酶 P450 基因的多态性^[41~43]. 对瑞典的人群进行全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 发现, *VKORC1* 基因、*CYP2C9* 和 *CYP4F2* 上的多态性与临床使用的华法林剂量密切相关, 分别能解释临床~30%, ~15% 和 ~1% 的华法林剂量变化^[44]. 在鼠类中杀鼠灵的代谢被认为与 P450 基因家族中的 CYP2C, CYP2B, CYP1A 和 CYP3A 亚家族中的某些基因相关^[45]. Ishizuka 等人^[46]发现, 日本的抗性屋顶鼠 *Vkorc1* 基因没有携带 Y139C 抗性变异, 但 *CYP3A2* 的蛋白表达量明显高于敏感鼠, 其次是 *CYP2C11*, 而其他酶 *CYP1A1*, *CYP2B2*, *CYP2C6* 的蛋白表达没有明显增高, 认为日本屋顶鼠的抗药性主要通过增强 P450 基因对杀鼠灵的代谢, 该文章只对 *Vkorc1* 基因的 139 位点进行分析, 然而屋顶鼠是否携带其他的 *Vkorc1* 变异不清楚. 另外, Markussen 等人^[47]比较了对溴敌隆抗性和敏感的褐家鼠 P450 基因的表达量, 发现 *Cyp2e1*, *Cyp3a2* 和 *Cyp3a3* 基因的表达量在抗性褐家鼠中增高, 认为 P450 基因表达量增高是鼠类对抗凝血类灭鼠剂产生抗性的主要机制之一. 人 *CYP2C9* 基因上的多态性主要是由遗传漂变(genetic drift)决定的, 在临床应用上 *CYP2C9* 基因上的多态性可以解释~15% 的华法林剂量变异, 而在鼠类中与抗性相关基因的频率可能更多取决于抗凝血类灭鼠剂的选择压力, 目前鼠类 P450 基因多态性与抗药性之间的相关性还缺乏研究.

3 其他基因参与介导的抗性机制

除了 *Vkorc1* 和 P450 基因的表达量或基因多态性与鼠类的抗药性相关外, 也有少数研究表明 NAD(P)H:醌氧化还原酶 1(NAD(P)H:quinoneoxido-reductase, *NQO1*), *Calumenin* (*Calu*) 基因的表达与褐家鼠对抗凝血类灭鼠剂的抗性相关. *CALU* 是一种拮抗

信号肽, 它可以与 *VKOR* 相结合从而阻止杀鼠灵与 *VKOR* 的结合, Wajih 等人^[48]发现, 美国褐家鼠对杀鼠灵的抗性似乎与 *VKORC1* 上的氨基酸突变无关, 而与 *Calu* 基因的高表达相关. 然而, Markussen 等人^[49]比较了对溴敌隆敏感和抗性的褐家鼠, 发现 *Calu* 基因的表达在抗性和敏感的褐家鼠中表达量类似, 但经过溴敌隆处理后, *Calu* 基因在抗性褐家鼠中的表达量比在敏感鼠中低 2 倍以上, 表明至少丹麦的褐家鼠对溴敌隆的抗性与 *Calu* 基因的表达无关, 该作者同时发现 *NQO1* 基因在抗性褐家鼠中表达量降低, 说明 *NQO1* 基因的表达可能与褐家鼠对溴敌隆的抗性相关.

4 展望

抗凝血类灭鼠剂在西方欧美国家已有 60 多年的使用历史, 在我国也有 30 多年的大规模使用历史, 而且至今仍是鼠害化学防治中最常用的灭鼠剂. 然而, 抗药性的产生极大地降低了抗凝血类灭鼠剂的使用效率, 因此监测鼠类的抗性水平对于科学合理使用灭鼠剂尤为重要. 通过抗性监测可以了解种群抗药性的程度及发展趋势, 对于未产生抗性种群的地方, 可以继续科学合理地使用抗凝血类灭鼠剂, 而在抗性水平比较高的种群中, 要采用改变药物种类、诱捕措施等综合治理措施, 减轻抗凝血类灭鼠剂的选择强度, 来降低种群的抗药性, 确保抗凝血类灭鼠剂的使用效率和生命力. 最近的研究表明, 杀鼠醚(coumatetralyl)中添加维生素 D3 可以增加杀鼠醚对抗性鼠(携带 Tyr139Cys 突变)的杀灭效率, 但鼠类对此

似乎容易产生行为抗性^[50].

在编码 *VKOR* 的基因被发现之前, Kohn 等人^[51,52]发现, 微卫星标记 *DIRat219* 与鼠类的抗药靶基因可以作为检测鼠类种群抗性的分子标记. *Vkorc1* 基因的发现极大地促进了鼠类抗性分子检测技术的发展. 我国目前对鼠类抗药性的监测主要依靠传统的致死期食毒法和血液凝集检测法(blood clotting response, BCR), 这两种生理检测法都需要一定的实验周期, 大量的饲喂器具及人员投入, 费时费力检测范围有限, 例如, 致死期食毒法需要 20~30 天的饲喂时间, 血液凝集法也要至少 10 天的饲喂时间^[53]. 基于 *Vkorc1* 抗性位基因的抗性基因检测技术只需鼠类的少量组织或 DNA, 检测成本和周期都远低于生理检测法, 尤其适合对鼠类种群进行长期大范围的监测, 但该方法在使用时需要开展大量前期基础研究工作. 欧美一些国家如德国、英国、荷兰等国家已经在小家鼠和褐家鼠中开展大量前期基础研究工作^[3,4,30], 对 *Vkorc1* 基因变异的位点和地理分布信息都比较了解, 抗性基因检测法可以在这些国家顺利推行. 我国由于对鼠类的 *Vkorc1* 抗性位基因缺乏了解, 该方法还没能在实践中大量应用, 但已有学者开展鼠类抗性遗传基础的研究, 例如, 目前已在我国广东的黄毛鼠和黄胸鼠中的 *Vkorc1* 基因上发现抗性突变^[32,33], 这些抗性变异将来可以发展成当地黄毛鼠和黄胸鼠抗性监测的有效分子标记. 然而, 要利用分子检测技术在全国大范围开展常见鼠类抗性的检测, 仍然需要对我国不同地区、不同鼠类的抗药靶基因开展大量基础研究.

参考文献

- 1 Himsworth C G, Parsons K L, Jardine C, et al. Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013, 13: 349–359
- 2 Boyle C M. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to anticoagulant poisons. *Nature*, 1960, 188: 517
- 3 Pelz H J, Rost S, Hunerberg M, et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*, 2005, 170: 1839–1847
- 4 Buckle A. Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Manag Sci*, 2013, 69: 334–341
- 5 Buckle A P, Klemann N, Prescott C V. Brodifacoum is effective against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance in Westphalia, Germany. *Pest Manag Sci*, 2012, 68: 1579–1585
- 6 Greaves J H, Shepherd D S, Quy R. Field trials of second generation anticoagulants against difenacoum-resistant Norway rat populations. *J Hyg (Lond)*, 1982, 89: 295–301
- 7 董天义. 抗凝血灭鼠剂应用研究(第一版). 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 1–215
- 8 欧汉标, 余向明, 麦海, 等. 湛江地区家鼠抗药性的动态及其治理对策. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2004, 15: 365–367

- 9 王军建, 陈立奇, 周纯良, 等. 黄胸鼠对杀鼠灵和溴敌隆抗药性调查报告. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002, 13: 7–9
- 10 易建荣, 林立丰, 伍任初, 等. 广州市家栖鼠对第一代抗凝血灭鼠剂抗药性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004, 16: 274–276
- 11 易建荣, 黄亿初, 吴军, 等. 清远市家栖鼠对第一代抗凝血灭鼠剂抗药性研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16: 274–276
- 12 高志祥, 施大钊, 郭永旺, 等. 北京地区黑线姬鼠对杀鼠灵抗药性的测定. 中国媒介生物学及控制杂志, 2008, 19: 90–92
- 13 王军建. 黄胸鼠对杀鼠灵和溴敌隆抗药性调查报告. 中国媒介生物学及控制杂志, 2002, 13: 7–9
- 14 刘泳廷, 郑越平, 林孟华, 等. 贵阳市黄胸鼠对溴敌隆的抗性及其对杀鼠灵抗性效果观察. 医学动物防制, 2012, 12: 1341–1343
- 15 段天一, 孙启廷, 张芳, 等. 达尔黄鼠对溴敌隆灭鼠剂抗药性的研究. 中国地方病防治杂志, 2012, 4: 279–280
- 16 Bäumler W, Asran A A. Susceptibility of house mice (*Mus musculus*) of different origins to anticoagulants. Pests Plants, 1987, 60: 1–6
- 17 MacNicol A E. Anticoagulant rodenticides-tolerance and resistance. Phytoparasitica, 1993, 21: 185–189
- 18 孙毅, 郭天宇, 董天义. 家栖鼠抗药性研究进展. 中华卫生杀虫药械, 2004, 3: 164–167
- 19 董天义, 阎丙申. 抗凝血灭鼠剂研究进展. 医学动物防制, 1998, 14: 61–67
- 20 Sadler J E. Medicine: K is for koagulation. Nature, 2004, 427: 493–494
- 21 Ren P, Stark P Y, Johnson R L, et al. Mechanism of action of anticoagulants: correlation between the inhibition of prothrombin synthesis and the regeneration of vitamin K1 from vitamin K1 epoxide. J Pharmacol Exp Ther, 1977, 201: 541–546
- 22 Li T, Chang C Y, Jin D Y, et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nature, 2004, 427: 541–544
- 23 Rost S, Fregin A, Ivaskievicius V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature, 2004, 427: 537–541
- 24 Rost S, Pelz H J, Menzel S, et al. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice—a response to 50 years of selection pressure by warfarin? BMC Genet, 2009, 10: 4
- 25 Song Y, Endepols S, Klemann N, et al. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. Curr Biol, 2011, 21: 1296–1301
- 26 Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, et al. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. Pest Manag Sci, 2009, 66: 270–276
- 27 Pelz H J, Rost S, Muller E, et al. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. Pest Manag Sci, 2012, 68: 254–259
- 28 Tanaka K D, Kawai Y K, Ikenaka Y, et al. The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. Pestic Biochem Physiol, 2012, 103: 144–151
- 29 Tanaka K D, Kawai Y K, Ikenaka Y, et al. A novel mutation in VKORC1 and its effect on enzymatic activity in Japanese warfarin-resistant rats. J Vet Med Sci, 2013, 75: 135–139
- 30 Meerburg B G, van Gent-Pelzer M P, Schoelitz B, et al. Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to *Vkorc1* mutations. Pest Manag Sci, 2014, 70: 1761–1766
- 31 Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, et al. Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus*: identification and characterisation of a novel Y25F mutation in the *Vkorc1* gene. Pest Manag Sci, 2016, 72: 544–550
- 32 Huang B, Feng Z, Yue L, et al. Warfarin resistance test and polymorphism screening in the *VKORC1* gene in *Rattus flavipectus*. J Pest Sci, 2010, 84: 87–92
- 33 Wang J, Feng Z, Yao D, et al. Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong Province, China Pestic Biochem Physiol, 2008, 91: 90–95
- 34 Diaz J C, Song Y, Moore A, et al. Analysis of *vkorc1* polymorphisms in Norway rats using the roof rat as outgroup. BMC Genet, 2010, 11: 43
- 35 Muller E, Keller A, Fregin A, et al. Confirmation of warfarin resistance of naturally occurring VKORC1 variants by coexpression with coagulation factor IX and *in silico* protein modelling. BMC Genet, 2014, 15: 17
- 36 DeJager L, Libert C, Montagutelli X. Thirty years of *Mus spretus*: a promising future. Trends Genet, 2009, 25: 234–241
- 37 Louvet M S, Gault G, Lefebvre S, et al. Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the “poisonous chemotype” of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity. Phytochemistry, 2015, 118: 124–130
- 38 Hedrick P W. Adaptive introgression in animals: examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. Mol Ecol, 2013, 22: 4606–4618
- 39 Liu K J, Steinberg E, Yozzo A, et al. Interspecific introgressive origin of genomic diversity in the house mouse. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 196–201
- 40 Kaminsky L S, Zhang Z Y. Human P450 metabolism of warfarin. Pharmacol Ther, 1997, 73: 67–74

- 41 Piatkov I, Rochester C, Jones T, et al. Warfarin toxicity and individual variability—clinical case. *Toxins*, 2010, 2: 2584–2592
- 42 Johnson J A, Gong L, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90: 625–629
- 43 Yu Z, Ding Y L, Lu F, et al. Warfarin dosage adjustment strategy in Chinese population. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8: 9904–9910
- 44 Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, et al. A genome-wide association study confirms *VKORC1*, *CYP2C9*, and *CYP4F2* as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet*, 2009, 5: e1000433
- 45 Guengerich F P, Dannan G A, Wright S T, et al. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. *Biochemistry*, 1982, 21: 6019–6030
- 46 Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, et al. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 62–66
- 47 Markussen M D K, Heiberg A-C, Fredholm M, et al. Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance. *Pest Manag Sci*, 2008, 64: 239–248
- 48 Wajih N, Sane D C, Hutson S M, et al. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chem*, 2004, 279: 25276–25283
- 49 Markussen M D, Heiberg A C, Fredholm M, et al. Characterization of bromadiolone resistance in a danish strain of Norway rats, *rattus norvegicus*, by hepatic gene expression profiling of genes involved in vitamin k-dependent γ -carboxylation. *J Biochem Mol Toxic*, 2007, 21: 373–381
- 50 Endepols S, Klemann N, Richter D, et al. The potential of coumatetralyl enhanced by cholecalciferol in the control of anticoagulant resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Pest Manag Sci*, 2016, doi: 10.1002/ps.4235
- 51 Kohn M H, Pelz H J, Wayne R K. Natural selection mapping of the warfarin-resistance gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7911–7915
- 52 Kohn M H, Pelz H J, Wayne R K. Locus-specific genetic differentiation at *Rw* among warfarin-resistant rat (*Rattus norvegicus*) populations. *Genetics*, 2003, 164: 1055–1070
- 53 孙毅, 郭天宇, 董天义, 等. 应用凝血反应检测杀鼠灵抗药性褐家鼠的可行性研究. *兽类学报*, 2006, 26: 176–182

Genetic Mechanism of Resistance to Anticoagulant Rodent Poison in Rodents

SONG Ying, LI Ning, WANG DaWei & LIU XiaoHui

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Key Laboratory of Weed and Rodent Biology and Management, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Anticoagulant rodent poison is the most widely used rodenticide during the rodent control and management in the world. However, resistance to the anticoagulants has greatly decreased the efficiency of the rodent poison. Rodents can obtain anticoagulant resistance via different molecular pathways. The vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1 (*Vkorc1*) gene is the target of anticoagulant rodenticides, and amino acid changes in *Vkorc1* often cause anticoagulant resistance in rats and mice. In addition, the cytochrome P450 genes, *Calumin* and other genes are also found to be associated with the anticoagulant resistance in rats and mice. This article gives a brief review about the current state of anticoagulant resistance in rats and mice, the genetic mechanism of resistance and the recent progress on the study of resistance mechanism in rats and mice.

rodent, anticoagulant rodent poison, resistance, *Vkorc1*, genetic mechanism

doi: 10.1360/N052016-00161