

华法林耐药突变体减弱人维生素 K 环氧化物还原酶与华法林的结合能力

王雯琪^{1,2*}, 沈滢^{1,2*}, 李晓明^{1,2}, 沈国民^{1,2}

(¹ 河南科技大学基础医学与法医学院医学遗传学教研室, 洛阳 471023;

² 河南省血栓与止血国际联合实验室, 洛阳 471023)

摘要 目的 探讨人维生素 K 环氧化物还原酶(VKORC1)耐药突变体对华法林耐药的机制。方法 利用与华法林结合导致 VKORC1 电泳迁移率变化的原理进行电泳迁移实验,并通过酶联免疫吸附实验检测 VKORC1 的活性和华法林抑制 VKORC1 的半抑制浓度(IC₅₀),评价 VKORC1 耐药突变体与华法林的结合能力。结果 华法林与 VKORC1 结合后,保护其柔性跨膜螺旋 1(TM1)中的一个半胱氨酸免受 N-乙基马来酰亚胺(NEM)的修饰,从而增加 VKORC1 的电泳迁移率。增加华法林浓度可以增加具有快速迁移效应的 VKORC1。与野生型 VKORC1 相比,华法林耐药突变体的快速迁移效应减弱或消失,表明华法林与耐药突变体的结合能力减弱;且突变体快速迁移效应越弱,其对华法林的耐药性越强。结论 VKORC1 耐药突变体与华法林的结合能力减弱是华法林耐药的主要原因。

关键词 凝血;耐药;电泳迁移实验;维生素 K;维生素 K 环氧化物还原酶;华法林耐药突变体;华法林;抗凝药

中图分类号 R 596

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1629-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.018

华法林是一种临床常用的口服抗凝剂,用于治疗 and 预防血栓类疾病。华法林的最佳剂量^[1]个体差异很大,剂量不足会增加患者血栓形成的风险,而过量往往会导致大出血。华法林剂量最重要的预测因素是 VKORC1 基因^[2],它的启动子区域含有单核苷酸多态性位点,约占患者变异的 25%^[3],其通过抑制 VKORC1 活性从而阻断凝血。然而,携带 VKORC1 编码区错义突变的患者常需要相对较高剂量的华法林^[4-5],这种耐药表型使临床华法林用药更加复杂。

目前有两种方法测定 VKORC1 突变体对华法林的耐受水平,但这两种方法都具有一定的局限性。本课题组前期研究显示利用一种电泳迁移实验可以检测细胞内 VKORC1 与华法林的结合^[6]。该研究利用此方法分析了华法林与 VKORC1 耐药突变体

的结合,发现华法林对 VKORC1 耐药突变体的电泳迁移率效应减弱,且与其耐药性相关,结果表明 VKORC1 耐药突变影响其和华法林的结合。

1 材料与方法

1.1 材料 N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、2,2'-二吡啶二硫(2,2'-dithiodipyridine, DPS)、华法林、抗 Flag M2 抗体、维生素 K 和维生素 K 环氧化物(vitamin K epoxide, KO)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司。抗羧化 FIX-Gla 结构域单克隆抗体购自美国 Green Mountain Antibodies 公司。辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)偶联的羊抗人蛋白 C(protein C, PC)抗体购自加拿大 Affinity Biologicals 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 将 VKORC1 基因克隆到含有荧光素酶基因的双表达载体 pBudCE4.1 的 CMV 多克隆位点,用于 VKORC1 的细胞活性实验^[6]。将 VKORC1 基因克隆到 pCMV6-entry 多克隆位点,并在此基础上构建 VKORC1 的 C 端插入 Flag 标签的质粒,用于电泳迁移实验。

1.2.2 瞬时转染和华法林处理 用 HEK293-FIX-

2024-08-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770140、82170133);河南省科技攻关计划(编号:212102310629、212102310877)

作者简介:王雯琪,女,硕士研究生;

沈滢,女,硕士,副教授,通信作者, E-mail: yanshen72@163.com;

沈国民,男,博士,教授,博士生导师,通信作者, E-mail: shenba433@163.com

* 对本文具有同等贡献

GLA-PC/DKO 细胞^[7]进行 VKORC1 活性实验和电泳迁移实验。细胞铺至 6 孔板中,当细胞密度达到 50% ~ 70% 时,进行质粒转染。6 h 后用含有不同华法林浓度的完全培养基进行换液。继续培养 24 h 后,收集细胞进行电泳迁移实验。

1.2.3 电泳迁移实验 瞬转表达的细胞用预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗 1 次,随后加入细胞裂解液[包含 20 mmol/L NEM、50 mmol/L pH7.5 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl 7.5)、150 mmol/L 氯化钠溶液 (NaCl)、1% 曲拉通 X-100 (Triton X-100) 和蛋白酶抑制剂],在冰上静置 20 min 后,将细胞裂解液转移至新的离心管。加入 DTT (终浓度为 100 mmol/L) 终止 NEM 标记,13 000 r/min 离心 15 min,取上清液进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),随后蛋白电转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,进行免疫印迹实验。为量化华法林结合导致的 VKORC1 电泳迁移的变化,用 ImageJ 分析蛋白质印迹结果的条带强度。华法林未处理的样本仅存在不迁移带;华法林处理会产生一个具有较快电泳迁移率的条带,称为迁移带。迁移率 = 迁移带强度 / (迁移带强度 + 不迁移带强度)。

1.2.4 VKORC1 活性实验以及华法林抑制作用的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) VKORC1 活性测定如前所述^[8]。用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测细胞培养上清液中分泌的 FIX-GLA-PC 蛋白的羧化水平。用 11 种不同浓度梯度的华法林 (含 2 μmol/L KO) 处理瞬转质粒的 DKO 细胞,36 h 后测定上清液中分泌的 FIX-GLA-PC 蛋白的羧化水平,计算华法林的 IC₅₀。

1.3 统计学处理 对 3 次重复实验的结果用 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析,用 *t* 检验进行

组间数据差异分析,与野生型 VKORC1 结合华法林的电泳迁移率相比,*P* < 0.05 为差异有统计学意义,命名为弱迁移组;*P* < 0.01 为极显著性差异,命名为不迁移组。使用 Graphpad Prism 5 软件绘制抑制曲线得到 IC₅₀。

2 结果

2.1 VKORC1 与华法林结合导致的电泳迁移率变化呈剂量依赖性 本课题组最近开发了一种关于 VKORC1 的电泳迁移实验,在本研究中发现该方法可用于分析细胞中 VKORC1 与华法林的结合能力。华法林处理细胞可导致 VKORC1 蛋白表现出更快的电泳迁移率 (图 1A)。随着华法林浓度的增加, VKORC1 蛋白不迁移条带逐渐减少,而快速迁移条带逐渐增加 (图 1A)。对于野生型 VKORC1,当华法林浓度约为 21 nmol/L 时,快速迁移条带可以达总蛋白的一半 (图 1B)。基于细胞的活性实验显示,华法林抑制 VKORC1 的 IC₅₀ 约为 12 nmol/L (图 1C)。因此,电泳迁移率的变化反映了华法林对 VKORC1 活性的抑制作用。

2.2 华法林诱导的电泳迁移率在 VKORC1 华法林耐药突变体中有不同程度的减弱 利用电泳迁移实验研究从临床患者和对华法林产生耐药性的啮齿动物中发现的天然 VKORC1 华法林耐药突变体 (表 1),结果显示,华法林耐药性较弱的突变体,如 L27V、A41S 和 S56F,华法林引发的电泳迁移率变化的幅度小于野生型 VKORC1 (图 2A、表 1);在强耐药性的突变体中,如 A26P、W59R、L128R 和 Y139F,华法林引发的电泳迁移率变化基本消失 (图 2A、表 1)。

利用 ImageJ 分析条带,并通过计算来量化迁移率变化的幅度 (图 2B 和 2C),根据统计学意义的差别,将天然和华法林耐药突变体分为弱迁移组

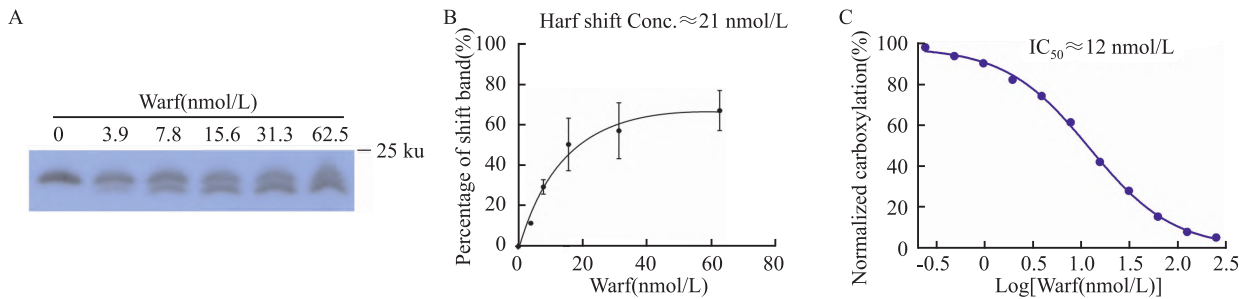


图 1 华法林结合诱导的 VKORC1 电泳迁移率的变化呈剂量依赖性变化

Fig.1 Warfarin binding to VKORC1 induced its electrophoretic-mobility change in dose-dependent manners

A: The mobility shift with increasing concentrations of warfarin (Warf); B: Quantitative analysis of gel bands in A; C: The inhibition of warfarin on VKORC1 activity was analyzed using cell activity assay.

(与野生型 VKORC1 相比 $P < 0.05$) (图 2B) 和不迁移组 ($P < 0.01$) (图 2C)。比较这两组突变体的 IC_{50} 和临床华法林剂量,发现不迁移组的 IC_{50} 显著高于弱迁移组 ($P = 0.039$) (图 2D);不迁移组的平均临床剂量也高于弱迁移组 (图 2E),临床剂量具体数值如表 1 所示,但差异无统计学意义 ($P = 0.132$)。

为进一步理解 VKORC1 突变体的华法林耐药性,本研究挑选了一些丙氨酸扫描诱变鉴定出的 VKORC1 华法林耐药突变体用电泳迁移实验进行分析。根据华法林耐药性,选取部分弱耐药性突变体 ($NR_{war} < 3$),如 Y119F、V127A 和 F131A;中度耐药性突变体 ($NR_{war} = 5 \sim 10$),如 Y25F 和 Y119A;以及强耐药性突变体 ($NR_{war} > 10$),如 Y25A、F55A、F63A、L120A 和 L124A (图 3A、表 1、表 2)。结果表明,弱耐药性突变体显示出与野生型 VKORC1 类似的电泳迁移率的变化;中度耐药性突变体显示出对

华法林浓度变化不太敏感的弱迁移;强耐药性突变体显示为不迁移 (图 3B)。比较 Y25 和 Y119 的 F 和 A 突变,Y25A 和 Y119A 比 Y25F 和 Y119F 更耐药,与此一致,Y25A 表现为不迁移而 Y25F 表现为弱迁移 (图 3B),Y119A 的电泳迁移率变化较弱,而 Y119F 的电泳迁移率变化几乎与野生型 VKORC1 相同 (图 3B)。将电泳迁移率的变化进行量化,结果表明野生型 VKORC1 与弱耐药性突变体之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而野生型 VKORC1 和中度耐药性突变体 ($P < 0.05$) 或强耐药性突变体 ($P < 0.01$) 之间差异有统计学意义 (图 3C)。综上所述,电泳迁移率变化与 VKORC1 突变体的耐药性相关。

2.3 VKORC1 电泳迁移率的变化主要与 NEM 修饰半胱氨酸 C16 相关 由于华法林阻碍 NEM 修饰 VKORC1 中的半胱氨酸是导致电泳迁移率变化的因素。为确定 VKORC1 中与电泳迁移率变化相关的

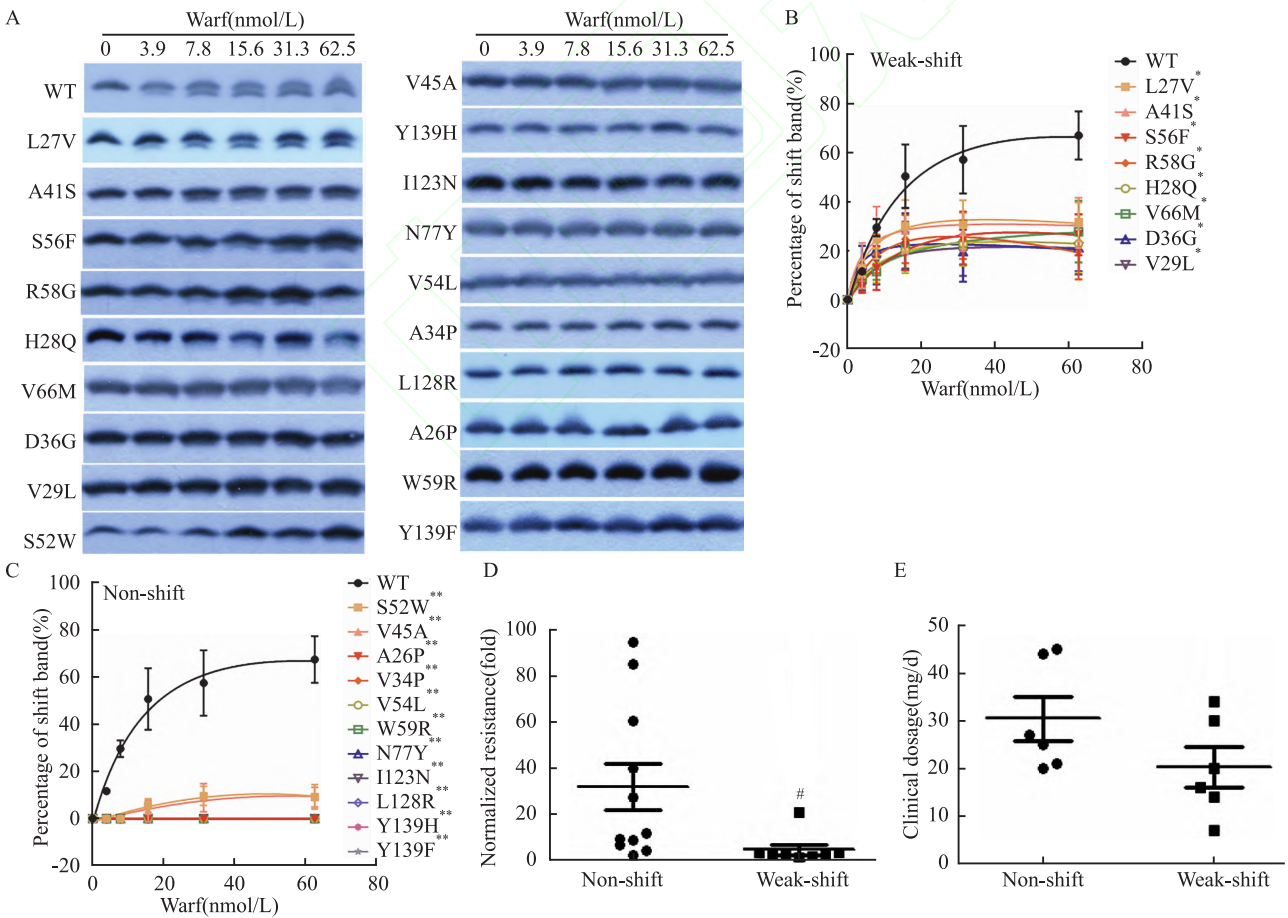


图 2 天然的华法林耐药突变体表现出与其 IC_{50} 和临床剂量相关的迁移率降低

Fig. 2 Natural warfarin-resistant mutants show impaired mobility shift in correlation with their IC_{50} and clinical dosage
A: Electrophoretic mobility of naturally-occurring warfarin-resistant mutants; B-C: Quantitative analysis of gel bands in A; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT; D: Comparison of normalized resistance levels of the non-shift and weak-shift groups of the mutants; # $P < 0.05$ vs non-shift group; E: Comparison of the reported clinical dosage of the non-shift and weak-shift groups of mutants.

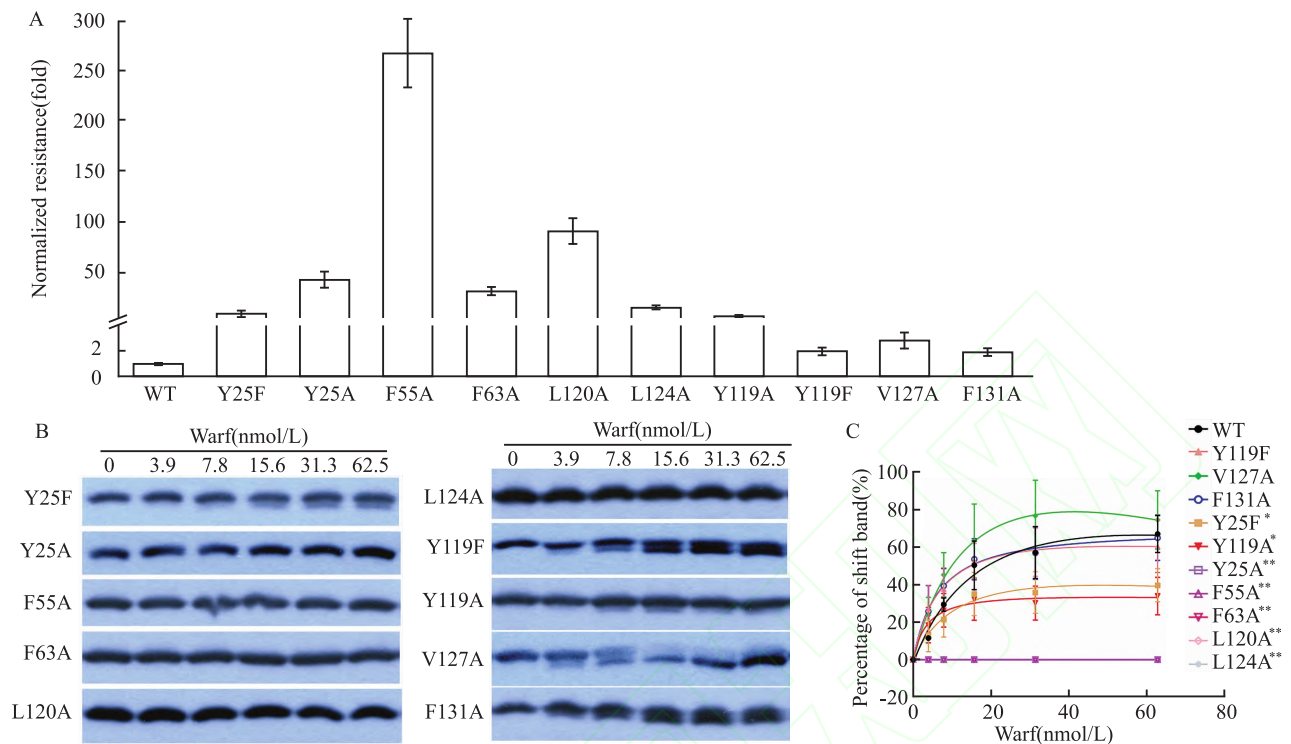


图 3 丙氨酸扫描诱变法鉴定的华法林耐药突变体的耐药水平和迁移率变化

Fig. 3 The resistance levels and mobility shift of warfarin-resistant mutants identified from alanine-scanning mutagenesis

A: Normalized resistance of the mutants; B: Electrophoretic mobility analysis of the mutants; C: Quantitative analysis of gel bands in B; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs WT.

表 1 华法林天然耐药突变体的归一化耐药性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)、临床剂量、电泳迁移率变化和结构位置

Tab.1 Electrophoretic mobility shift, normalized resistance ($n=3, \bar{x} \pm s$), clinical dosage and structural location of natural warfarin-resistant mutants				
VKORC1 Mutants (naturally occurring)	Normalized resistance	Clinical dosage (mg/d)	Mobility shift	Structural location
A26P	60.4 ± 13.2	20	non-shift	TM1
L27V	1.6 ± 0.3	7	weak	TM1
H28Q	2.5 ± 0.6	clinical data not available	weak	TM1
V29L	20.8 ± 3.3	14	weak	TM1
A34P	27.2 ± 2.6	27	non-shift	L1-2
D36G	2.5 ± 0.4	20	weak	L1-2
A41S	1.3 ± 0.3	16	weak	L1-2
V45A	2.2 ± 0.5	45	non-shift	L1-2
S52W	4.5 ± 0.9	clinical data not available	non-shift	L1-2
V54L	11.8 ± 2.2	21 ± 16	non-shift	L1-2
S56F	2.2 ± 0.5	clinical data not available	weak	L1-2
R58G	3.5 ± 0.8	34	weak	L1-2
W59R	84.9 ± 14.3	clinical data not available	non-shift	L1-2
V66M	3.3 ± 0.6	30 ± 7	weak	L1-2
N77Y	9.4 ± 1.3	25	non-shift	L1-2
I123N	9.0 ± 1.0	clinical data not available	non-shift	TM3
L128R	39.7 ± 8.4	44 ± 5	non-shift	L3-4
Y139H	6.6 ± 1.0	clinical data not available	non-shift	TM4
Y139F	94.4 ± 12.5	clinical data not available	non-shift	TM4

表 2 丙氨酸扫描诱变鉴定出的华法林耐药突变体的归一化耐药性 ($n=3, \bar{x} \pm s$)、临床剂量、电泳迁移率变化和结构位置

Tab.2 Electrophoretic mobility shift, normalized resistance ($n=3, \bar{x} \pm s$), clinical dosage and structural location of Ala scan warfarin-resistant mutants				
VKORC1 mutants (Ala scan)	Normalized resistance	Clinical dosage (mg/d)	Mobility shift	Structural location
Y25F	9.1 ± 3.1	clinical data not available	weak	TM1
Y25A	42.7 ± 7.9	clinical data not available	non-shift	TM1
F55A	268.5 ± 34.1	clinical data not available	non-shift	L1-2
F63A	31.3 ± 3.9	clinical data not available	non-shift	L1-2
Y119F	2.0 ± 0.3	clinical data not available	as wild type	TM3
Y119A	6.8 ± 0.8	clinical data not available	weak	TM3
L120A	91.2 ± 13.1	clinical data not available	non-shift	TM3
L124A	15.4 ± 1.8	clinical data not available	non-shift	TM3
V127A	2.8 ± 0.6	clinical data not available	as wild type	L3-4
F131A	1.9 ± 0.3	clinical data not available	as wild type	L3-4

Compared with wild type mobility: $P < 0.05$ in weak mobility shift group; $P < 0.01$ in non-mobility shift group.

被 NEM 修饰的半胱氨酸,构建了 VKORC1 的 7 个半胱氨酸的单突变体(图 4A)。值得注意的是,即使未进行华法林处理,C16A 突变体也显示出与野生型 VKORC1 和华法林结合后相似的、更快的电泳

迁移率(图 4A)。相比之下,未进行华法林处理时野生型 VKORC1 和所有其他半胱氨酸突变体都不会显示出更快的电泳迁移率(图 4A)。华法林处理后,C43A、C85A 和 C96A 突变体中显示出与野生型 VKORC1 类似的快速迁移条带(图 4A)。相反,C51A、C132A 和 C135A 突变体无论是否进行华法林处理,都没有观察到华法林引发的大量快速迁移条带(图 4A),原因是这些突变干扰了华法林结合 VKORC1^[6]。对于 C16A 突变体,华法林处理对其迁移率影响不大。

为了证实 NEM 修饰 C16 是导致电泳迁移率变化的关键因素,使用 DPS 处理了表达 VKORC1 半胱氨酸突变体的细胞。通过 DPS 处理,保护游离半胱氨酸不受 NEM 修饰,发现野生型 VKORC1 和所有半胱氨酸突变体都表现出加快的电泳迁移率;然而,在没有 DPS 处理的情况下,只有 C16A 突变体显示出更快的电泳迁移率(图 4B)。因此,C16 是否被 NEM 修饰是电泳迁移率变化的关键因素。

直接比较野生型 VKORC1 和其半胱氨酸突变体在有无 NEM 处理时的电泳迁移率来进一步证实 NEM 标记 C16 对电泳迁移率的影响。结果显示,未经 NEM 处理时,野生型 VKORC1 和半胱氨酸突变体都显示出加快的迁移率(图 4C);而 NEM 处理后,除 C16A 突变体外,其他的电泳迁移率都明显变慢(图 4C)。此外,C16A 突变体经 NEM 修饰后,其迁移率也有微小的差异,这说明 NEM 修饰突变体中的其他半胱氨酸对迁移率也有一定影响。综上所述,NEM 对 VKORC1 的 C16 修饰是导致其电泳迁移率

改变的关键因素。

3 讨论

目前有两种方法测定 VKORC1 突变体对华法林的耐受水平,传统的体外实验使用 DTT 还原促进 VKORC1 的催化作用,但这种方法无法检测到大多数华法林耐药突变体的耐药性^[9],可能是因为 DTT 破坏了 VKORC1 的天然氧化还原状态^[6, 10]。基于细胞的 VKORC1 活性实验可以避免此问题,且耐药水平与报道所需的临床剂量相关^[4, 11-12]。该实验通过测定凝血因子的 γ -羧化水平^[12]来进行,但由于 γ -羧化发生在维生素 K 循环的下游,因此这种检测方法只能间接测量 VKORC1 活性和华法林对其的抑制。本研究发现可通过 NEM 标记的 VKORC1,检测电泳迁移率的变化来分析生理条件下 VKORC1 与华法林的结合能力。该实验易于进行,可作为测定华法林抑制 VKORC1 活性作用的有力补充。传统 DTT 驱动的活性测定^[9]在研究华法林抑制作用时存在 DTT 会阻碍华法林结合的问题^[6, 10],而基于细胞检测凝血因子羧化水平的活性分析^[12]是对 VKORC1 活性的间接检测。相比之下,电泳迁移实验可以直接粗略分析在细胞环境中华法林与 VKORC1 的结合能力。

VKORC1 与华法林结合后显示出更快的电泳迁移率(图 1A)。为理解这种迁移率变化的本质,用华法林、DPS 和 NEM 处理野生型 VKORC1 和半胱氨酸突变体,并进行比较(图 4)。前期研究^[6, 13]显示华法林阻碍 NEM 修饰 VKORC1 中的半胱氨酸是

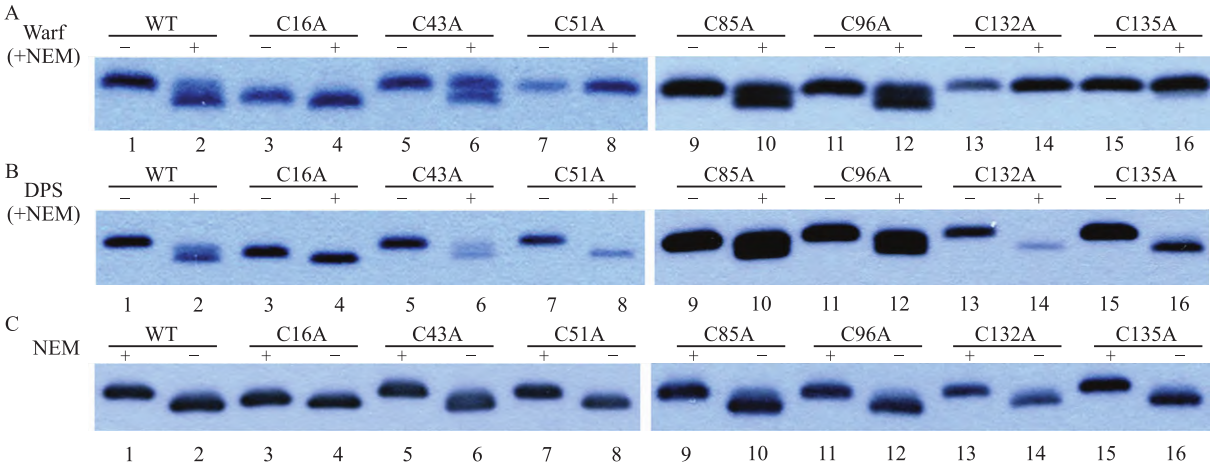


图 4 C16 上的 NEM 修饰决定了 VKORC1 的电泳迁移率变化

Fig. 4 NEM modification on C16 determined the electrophoretic-mobility change of VKORC1

A: Electrophoretic mobility of cysteine mutants with and without warfarin treatment (+ NEM; NEM labeling performed after warfarin treatment); B: Electrophoretic mobility of cysteine mutants with and without DPS treatment; C: Electrophoretic mobility of cysteine mutants with and without NEM labeling.

导致电泳迁移率变化的因素。而 DPS 可以共价修饰一个半胱氨酸或氧化一对半胱氨酸形成二硫键。在使用 NEM 标记半胱氨酸之前,用 DPS 处理细胞,则 VKORC1 中的游离半胱氨酸将被 DPS 修饰而不是被 NEM 修饰。与 NEM 标记不同,DPS 修饰或 DPS 诱导的氧化可以通过 DTT 还原而逆转。因此,DTT 终止反应后,在 VKORC1 中产生了未被 DPS 和 NEM 标记的游离半胱氨酸。半胱氨酸 C16 不被 NEM 修饰是电泳迁移变快的关键因素。理论上,电泳迁移率的增加与表观分子量的变化相对应。而 C16 被 NEM 修饰后的表观分子量变化大于预期变化(存在 124 u 的差异),且只有 C16 被 NEM 修饰才会导致这种相对较大的迁移率变化。基于该结果推测 VKORC1 蛋白的二级结构在电泳过程中部分保留在 SDS 中,特别是 C16 所在的 TM1 可能存在部分螺旋结构,所以未被修饰时电泳迁移率增加。NEM 修饰 C16 后促进了 TM1 被 SDS 的变性,使电泳迁移率的变化减弱。因此,C16 被 NEM 修饰的 VKORC1 和未经修饰的 VKORC1 在电泳迁移率上显示出相当大的差异。

利用电泳迁移实验分析了华法林与野生型 VKORC1 的结合。未经华法林处理时由于柔性 TM1,暴露 TM1 上的 C16(图 5A,左绿球)进行 NEM(图 5A,左橙球)修饰,虚线箭头表示 VKORC1 的结构柔性。结果显示 C16 容易被 NEM 修饰(图 5A,左);相比之下,华法林与 VKORC1 的结合会引起 VKORC1 的结构收紧^[6, 14],使 C16 能更稳定地埋藏在蛋白质结构内部而不受 NEM 修饰(图 5A,中),导致野生型 VKORC1 的电泳迁移率加快。

与野生型 VKORC1 相比,华法林耐药突变体与华法林结合能力变弱导致 TM1 变得灵活,使 C16 暴露出来,从而可以被 NEM 修饰(图 5A,右)。因此在 VKORC1 不同结构区[包括 TM1 和 TM2 之间(L1-2)以及 TM3 和 TM4 之间]的突变体中,华法林引起的迁移率变化均更弱或消失^[6, 14](表 1)。在 VKORC1 结构中,其耐药突变体的分布可以分为两组,一组位于华法林结合口袋,与华法林直接接触(图 5B,内圈蓝球);另一组位于维持该口袋稳定性的外围结构区域(图 5B,外圈橙球)。研究^[11]表明,这两组华法林耐药突变改变了与华法林的结合或破坏了华法林结合口袋的稳定性,从而减弱了 VKORC1 与华法林的结合能力(图 5B)。

在基于细胞的活性测定实验中,华法林和耐药突变体的结合能力减弱与华法林抑制它们的 IC₅₀相

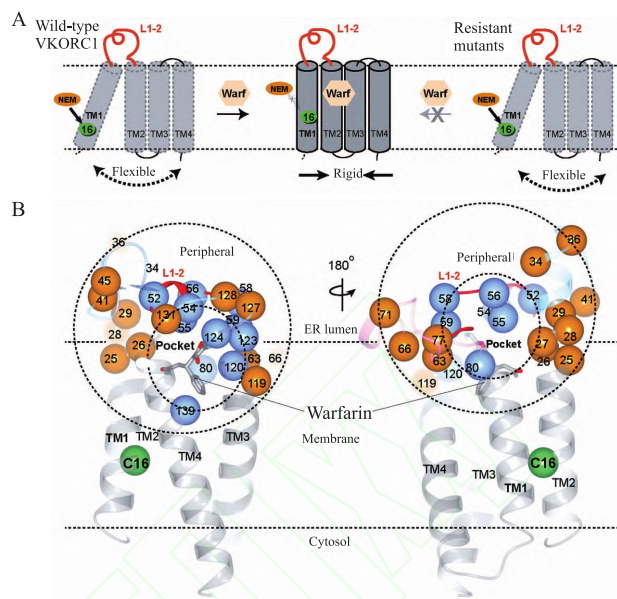


图 5 与华法林结合降低 VKORC1 的结构柔性
而华法林耐药突变增加了这种柔性

Fig. 5 Warfarin binding lowers the structural flexibility of VKORC1 and warfarin-resistant mutations increase this flexibility

A: Model explains the effect of warfarin binding on Cys16 modification; B: Distribution of warfarin-resistant mutations on the crystal structure of human VKORC1 (PDB 6WV4).

关,但与临床华法林剂量的相关性较小,可能是由于突变体的样本量有限以及其他干扰因素。进行实验的华法林耐受突变体是从临床患者^[9]和对华法林产生耐药性的啮齿动物^[15]中发现的。比如,在活性测定中,V45A 仅表现出较弱的华法林耐药性,但在临床中需要较高剂量。不过华法林处理 V45A 突变体不会引起其迁移率的改变,说明该突变体与华法林的结合较弱,这能较好地解释其临床中需要较高华法林剂量的原因。总之,本研究结果表明华法林结合能力减弱是 VKORC1 突变体对华法林耐药的基础。

参考文献

- [1] Au N, Rettie A E. Pharmacogenomics of 4-hydroxycoumarin anticoagulants [J]. *Drug Metab Rev*, 2008, 40(2): 355 - 75. doi: 10.1080/03602530801952187.
- [2] Wadelius M, Chen L Y, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose [J]. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5(4): 262 - 70. doi: 10.1038/sj.tpj.6500313.
- [3] Nakagita K, Wada K, Mukai Y, et al. Effects of vitamin K epoxide reductase complex 1 gene polymorphisms on warfarin control in Japanese patients with left ventricular assist devices (LVAD) [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2018, 74(7): 885 - 94. doi: 10.

- 1007/s00228-018-2483-8.
- [4] Chen X, Jin D Y, Stafford D W, et al. Evaluation of oral anticoagulants with vitamin K epoxide reductase in its native milieu [J]. *Blood*, 2018, 132(18): 1974-84. doi:10.1182/blood-2018-05-846592.
 - [5] Li S, Liu S, Yang Y, et al. Characterization of warfarin inhibition kinetics requires stabilization of intramembrane vitamin K epoxide reductases [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(18): 5197-208. doi:10.1016/j.jmb.2020.05.009.
 - [6] Shen G, Cui W, Zhang H, et al. Warfarin traps human vitamin K epoxide reductase in an intermediate state during electron transfer [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, 24(1): 69-76. doi:10.1038/nmsb.3333.
 - [7] Tie J K, Stafford D W. Functional study of the vitamin K cycle enzymes in live cells [J]. *Methods Enzymol*, 2017, 584: 349-94. doi:10.1016/bs.mie.2016.10.015.
 - [8] Tie J K, Jin D Y, Tie K, et al. Evaluation of warfarin resistance using transcription activator-like effector nucleases-mediated vitamin K epoxide reductase knockout HEK293 cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(8): 1556-64. doi:10.1111/jth.12306.
 - [9] Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, et al. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(12): 2535-43. doi:10.1111/jth.12019.
 - [10] Shen G, Cui W, Cao Q, et al. The catalytic mechanism of vitamin K epoxide reduction in a cellular environment [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100145. doi:10.1074/jbc.RA120.015401.
 - [11] Shen G, Li S, Cui W, et al. Stabilization of warfarin-binding pocket of VKORC1 and VKORL1 by a peripheral region determines their different sensitivity to warfarin inhibition [J]. *J Thromb Haemost*, 2018, 16(6): 1164-75. doi:10.1111/jth.14127.
 - [12] Tie J K, Jin D Y, Straight D L, et al. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells [J]. *Blood*, 2011, 117(10): 2967-74. doi:10.1182/blood-2010-08-304303.
 - [13] Shen G, Li S, Cui W, et al. Membrane protein structure in live cells: Methodology for studying drug interaction by mass spectrometry-based footprinting [J]. *Biochemistry*, 2018, 57(3): 286-94. doi:10.1021/acs.biochem.7b00874.
 - [14] Liu S, Li S, Shen G, et al. Structural basis of antagonizing the vitamin K catalytic cycle for anticoagulation [J]. *Science*, 2021, 371(6524): eabc5667. doi:10.1126/science.abc5667.
 - [15] Boitet M, Hammed A, Chatron N, et al. Elevated difenacoum metabolism is involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkorc1*) gene [J]. *Pest Manag Sci*, 2018, 74(6): 1328-34. doi:10.1002/ps.4797.

Warfarin-resistant mutations weaken the binding of human vitamin K epoxide reductase to warfarin

Wang Wenqi^{1,2}, Shen Yan^{1,2}, Li Xiaoming^{1,2}, Shen Guomin^{1,2}

(¹College of Basic Medicine and Forensic Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023;

²Henan Province International Joint Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Luoyang 471023)

Abstract *Objective* To understand how warfarin inhibition is hindered by the vitamin K epoxide reductase (VKORC1) resistant mutations. *Methods* An electrophoretic mobility assay was conducted based on the principle that binding with warfarin resulted in changes in VKORC1 electrophoretic mobility. The activity of VKORC1 and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of warfarin inhibiting VKORC1 were detected by ELISA. These experiments evaluated the binding ability of VKORC1 resistant mutants to warfarin. *Results* With warfarin bound, VKORC1 was protected from N-ethylmaleimide (NEM) modification and showed increased electrophoretic mobility, which was dependent on an unmodified cysteine on the flexible transmembrane helix 1 (TM1) of VKORC1. Increasing the warfarin concentration could shift more VKORC1 towards the species with the fast mobility. Compared to the wildtype VKORC1, the fast mobility fraction became less or disappeared in warfarin-resistant mutants, indicating weakened binding of warfarin. In addition, VKORC1 mutants with the weaker electrophoretic mobility shift indicated the stronger warfarin resistant. *Conclusion* Weakened warfarin binding is the primary cause of warfarin resistance.

Key words blood coagulation; drug resistance; electrophoretic mobility assay; vitamin K; vitamin K epoxide reductase; warfarin-resistant mutants; warfarin; anticoagulant

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81770140, 82170133); Scientific and Technological Project of Henan Province (No. 212102310629, 212102310877)

Corresponding authors Shen Yan, E-mail: yanshen72@163.com; Shen Guomin, E-mail: shenba433@163.com