

抗凝血殺鼠劑之抗藥性機制回顧與展望

林振文^{1*}、廖秀英¹、王建彬²、許如君³、馮海東¹

¹ 農委會農業藥物毒物試驗所農藥化學組

² 農委會農業藥物毒物試驗所應用毒理組

41358 臺中市霧峰區舊正里光明路 11 號

³ 國立臺灣大學昆蟲系 10617 臺北市羅斯福路四段一號

摘 要

家鼠及野鼠危害環境衛生及農作物生產，一般常採用殺鼠劑來進行防除。由於抗凝血殺鼠劑的作用較為緩慢，誤食時則有較長的搶救時間，並且其對於環境的衝擊較小，因此被廣為使用。自 1950 年代開始廣泛使用殺鼠靈來控制鼠類數量，造成的結果就如同殺蟲劑的濫用產生抗藥性一樣，最早從 1958 年蘇格蘭開始，全世界很多地區都陸續報導殺鼠靈的抗藥性。在歐洲所做的抗藥性研究中，很多研究發現抗藥性可能與維他命 K 環氧還原酶 C1 的 Y139 突變有關。另外，為防治殺鼠靈抗藥性鼠類所發展的第二代的抗凝血殺鼠劑，如撲滅鼠也已經發生抗藥性問題。目前鼠類對殺鼠劑的抗藥性機制主要有二部分，一為藥物目標機制變異的影響，如維他命 K 環氧還原酶的突變，另一為藥物代謝機制如氧化酶量的改變所造成的抗性，本文回顧近年來的野鼠抗凝血劑抗藥性研究及說明常見的監測方法。

關鍵詞：抗凝血殺鼠劑、殺鼠靈、撲滅鼠、維他命 K 環氧還原酶、細胞色素 P450

鼠類的危害與殺鼠靈的使用

* 通訊作者: E-mail: jenwen@tactri.gov.tw

臺灣地區氣候溫和，作物種類多樣。對野鼠來說，由於氣候環境適宜且糧食充足，加上天敵日趨減少，鼠類可以快速繁殖，因此對於農作物及環境衛生造成極大的危害。在臺灣農地，危害農作物的野鼠主要有田鼯鼠 (*Mus formosanus*)、赤背條鼠 (*Apodemus agrarius*)、小黃腹鼠 (*Rattus losea*)、鬼鼠 (*Bandicota indica*)、溝鼠 (*Rattus norvegicus*)、及緬甸小鼠 (*Rattus exulans*)。而在倉庫及住宅出沒的主要是溝鼠、屋頂鼠 (*Rattus rattus*) 及家鼯鼠 (*Mus musculus*) 等三種為主。農地野鼠啃食田間的花生、甘藷、甘蔗等造成農作物減產。在穀倉及住宅出沒的鼠類最主要是造成衛生環境不良導致穀物易腐敗，並可能傳播疾病如鼠疫、鉤端螺旋體性黃疸等。

臺灣在農作物鼠害防治工作上已經建立良好的組織體系，包括防除工作的籌劃、防除方法的研發、防除藥劑的選用、防治時機的選擇。除了良好的農田管理，殺鼠劑仍是鼠害防治工作上有效的方法，殺鼠劑如磷化鋅 (zinc phosphide, 使用方法已於 1996 年刪除)、安特靈 (endrin, 已於 1972 年禁用) 等對人畜亦有毒害，須特別小心使用。抗凝血殺鼠劑 (anticoagulant rodenticides) 的毒殺作用較為緩慢，若為人誤食有較長的時間進行解毒搶救，並且由於對環境衝擊較小，故較為廣泛使用。最早自 1950 年代開始，殺鼠靈 (warfarin) 這種第一代的抗凝血殺鼠劑就非常廣泛的使用，當時只知道殺鼠靈作用於凝血過程，並且可以利用維他命 K 作為解毒劑。後來發現殺鼠靈會抑制凝血因子的羧化反應。

凝血因子的羧化反應與殺鼠靈的作用

凝血需要血小板以及蛋白質組成物的參與，肝臟裏很多參與凝血反應的蛋白質組成物都需要經過 γ -穀胺酸基羧化反應才能活化，這些蛋白質包括凝血酶原 (prothrombin)、凝血因子 VII、IX 以及 X (Furie and Furie, 1988)。 γ -穀胺酸基羧化反應系統存在於肝臟細胞的內質網膜， γ -穀胺酸基羧化酶 (γ -glutamyl-carboxylase, GGCX) 負責將凝血酶原及凝血因子 VII、IX、及 X 的穀胺酸基側鏈羧化，形成 γ -羧基穀胺酸。Esmon and Suttie (1976) 發現此羧化反應所需的能量來自於還原態維他命 K (vitamin K hydroquinone) 的氧化反應，其產生的氧化態維他命 K (vitamin K

2',3'-epoxide) 主要是藉由維他命 K 環氧還原酶 (vitamin-K-epoxide reductase, VKOR) 再轉變回還原態。Wallin 氏提出兩種還原反應途徑，途徑一是透過可被殺鼠靈抑制的 VKOR，途徑二則是透過不可被殺鼠靈抑制的去氫酶系統；抗凝血劑解毒時投與大量的維他命 K，體內可能利用去氫酶系統來還原維他命 K (Wallin, 1986; Wallin and Martin, 1987)。

研究發現殺鼠靈作用在 VKOR，藉此抑制 vitamin K 2',3'-epoxide 的還原反應 (Fasco *et al.*, 1983; MacNicol 1985; Thijssen *et al.*, 1986)。雖然 VKOR 活性早在 1974 年就被發現 (Zimmermann and Matschiner, 1974)，但是其後將近 30 年，VKOR 這個膜蛋白一直無法成功被純化鑑定。到了 2000 年時，Kohn and Pelz (2000) 進行人類與鼠類的比較性序列分析 (Comparative ortholog mapping)，尋找 VKOR 在人類染色體上的位置。而 Li *et al.* (2004) 參考 Kohn and Pelz 的分析結果，利用 RNA 干擾技術測試人類 16 號染色體上 13 個疑似 VKOR 的基因，終於找到了具有 VKOR 活性的單一基因。由於這個基因非常小，可能只是 VKOR 的一個重要組分，故暫稱它為 complex 1 或 VKORC1。Li 等人在缺乏 VKOR 活性的 Sf9 昆蟲細胞表現人類 VKORC1，並且偵測到這個外源基因的 VKOR 活性，發現殺鼠靈能夠抑制其 VKOR 活性。無疑的，這是找到 VKOR 基因的里程碑。

在 VKORC1 這個蛋白質結構的研究上，Goodstadt and Ponting (2004) 分析 VKORC1 基因序列發現一個 18 kDa 蛋白質的編碼區，由序列預測可能具有四個 α -螺旋穿膜區，然而 2005 年 Tie 等人運用蛋白質酶 K 水解法進行 VKORC1 的拓樸圖圖析，結果顯示 Goodstadt and Ponting 預測的其中一個穿膜區 (胺基酸 75~97) 可能被鄰近序列影響而未穿膜，事實上僅有三個穿膜區 (胺基酸 10~29、101~123、127~149) (Tie *et al.*, 2005)。

抗藥性的檢測與抗藥性的分子機制

1950 年代開始使用殺鼠靈後，最早在 1958 年的蘇格蘭發生第一起抗藥性 (Boyle, 1960)，隨後全世界很多地區都陸續報導殺鼠靈的抗藥性。抗藥性發生的檢測有三個常用的方法，監測圖法 (monitoring graph)

是 Drummond and Rennison (1973) 開始使用於田間的方法，其原理是利用田間的含毒餌料之取食會因為毒效的發生而逐漸減少來製作監測圖，藉由監測圖來評估抗藥性發生的可能；但因為鼠群的遷移或食物中維他命 K 的可能干擾，此法最後仍需捕捉該鼠群，並在實驗室裡可控制的條件下進行毒性測試。另外是兩個實驗室的方法，Drummond and Wilson (1968) 所採用的原理是在一個區分劑量下，餵飼一定時間含毒餌料毒殺鼠群，若特定時間後仍能存活者為抗藥性鼠隻。此法之劑量是由餵毒期，亦即時間來進行控制，故此種方法稱為致死餵食期法 (lethal feeding period, LFP)，缺點是有些第二代抗凝血殺鼠劑的劑量反應曲線太陡，因而難以決定適合的區分劑量。另外一個實驗室的方法是血凝反應試驗法 (blood clotting response test, BCR test)，此法不看死亡率而是檢視藥物對試驗動物凝血反應的影響 (Martin *et al.*, 1979; Gill *et al.*, 1993)。好處是敏感度高，可監測個體的抗藥性，此外由於投藥劑量低，試驗完成後可施與維他命 K 解毒不需要犧牲試鼠，試鼠可供其他藥劑的試驗，或進行繁衍子代，以利抗藥性的遺傳性研究。要注意的是在不同鼠類、不同藥劑、甚至不同性別的 BCR 試驗參數不同 (Buckle *et al.*, 1994)。

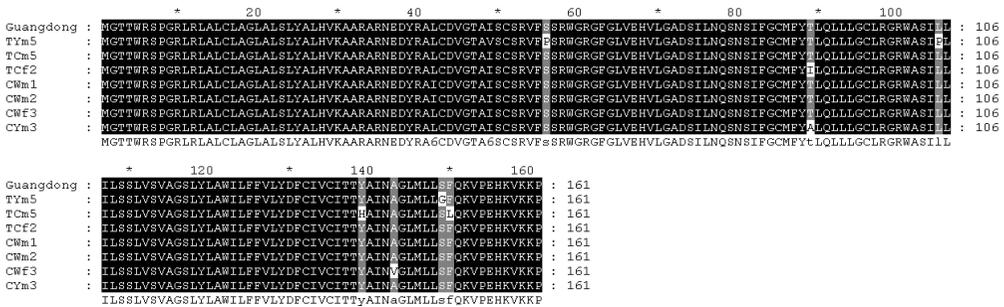
早在 1989 年 Thijssen 等人就發現，殺鼠靈抗藥性大鼠的 VKOR 活性較感性鼠低，其肝臟 VKOR 活性亦不像感性鼠般容易受到殺鼠靈的抑制，因此提出可能是 VKOR 的基因突變與伴隨的結構改變造成了較低的 VKOR 活性及殺鼠靈的抗藥性 (Thijssen *et al.*, 1989)。直到 Rost *et al.* (2004) 提出的證據顯示，在 HEK293 細胞內表現的 VKORC1 Y139C 突變蛋白雖然其 VKOR 活性約僅有野生型 VKORC1 的一半，但其活性顯然較不受殺鼠靈所抑制。歐洲的鼠類抗藥性研究中，多數認為抗凝血劑抗藥性與 VKORC1 的突變有關 (Ishizuka *et al.*, 2008)，雖然很多地方的抗藥性鼠類都發現 VKORC1 的突變，不過並不是每一個位置的突變都與抗藥性有關 (Rost *et al.*, 2009)。Lasseur *et al.* (2005) 發現 VKORC1 Y139F 存在於具有殺鼠靈抗藥性的溝鼠，其肝臟 VKOR 活性的 V_{max}/K_m 比值高於野生型，推測這是 Y139F 突變鼠不會缺乏維他命 K 的原因之一。一些研究也發現其他的抗性機制，例如在美國的殺鼠靈抗藥性研究發現，抗藥性大鼠肝臟中的 calumenin 比感性鼠的表現量多 (Wallin *et*

al., 2001)。Calumenin 是維他命 K 依賴性羧化系統中兩個重要酵素 (GGCX 及 VKOR) 的折疊蛋白，可能是因為 calumenin 與 VKOR 的結合，遮蔽了 VKOR 上的殺鼠靈結合位置而造成抗藥性 (Wajih *et al.*, 2004; Wallin and Hutson, 2004)。

在藥物代謝研究上，Daly and Aithal (2003) 提出人類代謝殺鼠靈的細胞色素 P450 主要是 CYP2C9、CYP1A2 與 CYP3A4，其中 CYP2C9 負責 S-殺鼠靈的 7-羥基化。在日本的研究發現，具殺鼠靈抗藥性的屋頂鼠表現較多的 Cyp3a2，這個 P450 不但與人類的 CYP3A4 是同源蛋白，而且使用細胞色素 P450 抑制劑 proadifen 會增加殺鼠靈毒性，顯示當地的抗藥性可能與 Cyp3a2 有關 (Ishizuka *et al.*, 2007)。由於這些屋頂鼠沒有歐洲抗藥性鼠常見的 VKORC1 Y139 突變，故推測日本東京屋頂鼠的抗藥性是由於較高的殺鼠靈清除效率。第二代抗凝血殺鼠劑毒性作用比殺鼠靈更強且不易被代謝排除。第二代抗凝血殺鼠劑依主結構可分成四羥基香豆素 (4-hydroxycoumarins) 及二氫茛二酮衍生物 (indandione) 兩類。四羥基香豆素類包括可滅鼠 (brodifacoum)、撲滅鼠 (bromadiolone)、雙滅鼠 (difenacoum) 等。二氫茛二酮衍生物包括得伐鼠 (diphacinone)、可伐鼠 (chlorophacinone) 等。雖然第二代抗凝血殺鼠劑對鼠類毒性強且半衰期長，但其對非目標生物的毒性高，造成野生動物取食毒餌或間接捕食中毒鼠類而中毒 (Petterino and Paolo, 2001; Valchev *et al.*, 2008)。此外，由於野鼠的藥物目標基因的多態型或是代謝毒物的基因變異，加上長期用藥的選汰效應而產生超級抗藥老鼠。第二代抗凝血劑的抗藥性機制較殺鼠靈複雜，很可能同時涉及多個基因 (Greaves and Cullen-Ayres, 1988)。目前發現的 VKORC1、calumenin，以及細胞色素 P450 等抗藥機制間並不互抵觸，例如 2007 年 Markussen 等人發現具撲滅鼠抗藥性的溝鼠利用 VKORC1 Y139C 突變及其他的抗藥機制 (Markussen *et al.*, 2007)。次年，他們的資料顯示 Cyp2e1、Cyp3a2，以及 Cyp3a3 可能與撲滅鼠的抗藥性有關 (Markussen *et al.*, 2008)，並且認為不同性別鼠類的抗藥性差異是由於一些細胞色素 P450 的表現量不同所造成，提出雌鼠的抗藥性與 Cyp2c13 的增加有關，而雄鼠的抗藥性則與 Cyp2a1 的增加有關。

臺灣小黃腹鼠VKORC1的基因檢測

由於 VKORC1 是抗凝血劑的目標蛋白，我們調查田間小黃腹鼠 VKORC1 的多態型。為獲得完整的 VKORC1 編碼區，PCR 引子必須往外設計在非轉譯區，然而資料庫中小黃腹鼠的 mRNA (gi|116794880) 缺少 3'端非轉譯區。由於小黃腹鼠與溝鼠的 VKORC1 mRNA 的相同性非常高，因此我們從溝鼠 VKORC1 (gi|45827740) 的 3'端非轉譯區設計引子，利用小黃腹鼠肝臟中的 RNA 進行 RT-PCR，DNA 產物經解序後發現含有一個 483bp 的編碼區，將轉譯出的 161 個胺基酸做 BLASTp 的序列比對，發現 100%相同於小黃腹鼠 VKORC1。分析的 26 隻小黃腹鼠中，共發現 7 隻具有 VKORC1 的多態型 (圖一)。其中桃園地區 2 隻中有 1 隻，台中地區 6 隻中有 2 隻，彰化地區 11 隻中有 3 隻，嘉義地區 2 隻中有 1 隻，澎湖地區 5 隻中有 0 隻。就發現的 VKORC1 變異點而言，則包括 L42I、I49V、S56P、T89I、T89A、L105P、Y139H、A143V、S149G，及 F150L (表一)。



圖一、胺基酸序列比對 7 隻 VKORC1 有變異的小黃腹鼠。Guangdong：廣東。TY：桃園。TC：台中。CW：彰化。CY：嘉義。地區代號後面 m 或 f 分別表示雄鼠或雌鼠的性別代碼。

Figure 1. VKORC1 amino acid alignments of seven mutated individuals from *Rattus losea*. TY: Taoyuan. TC: Taichung. CW: Changhua. CY: Chiayi. Followings are gender codes (m for male and f for female) and number codes for individuals.

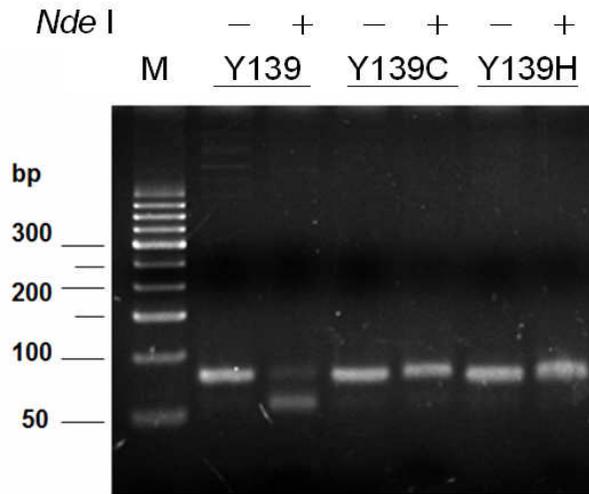
Table 1. Protein sequence analysis of vitamin-K-epoxidase reductase C1 from *Rattus losea* in Taiwan.

Source	Number of rats tested	Type of VKORC1 diversities	Number of occurrence
Taoyuan	2	I49V, S56P, L105P, S149G	1
Taichung	6	Y139H, F150L	1
Changhua	11	T89I	1
		A143V	1
		L42I	2
Chiayi	2	T89A	1
Penghu	5	none	-

桃園發現的 S56P 及彰化發現的 A143V 這兩種變異型也發生在溝鼠 (Pelz *et al.*, 2005; Rost *et al.*, 2009)。文獻中所發現的溝鼠 Y139 變異型包括 Y139C、Y139F，及 Y139S，然而發現臺中地區小黃腹鼠的變異型為 Y139H。Rost 等人 2009 年的實驗結果顯示，即使有相當多的 VKORC1 變異型或許與抗藥性無關，但 Y139 的突變可能與抗藥性有關。為了加速鼠類的 VKORC1 Y139 變異性的檢測，我們設計了 PCR-RFLP 的檢測方法，其結果顯示 *Nde* I 可以切割野生型的 Y139，但無法切割突變型的 Y139 (圖二)。若能以鼠類糞便取代組織進行 DNA 檢測，對於田間及穀倉鼠類的 VKORC1 變異研究將有所助益。尤其在食物來源豐富而不易誘捕的穀倉，相當容易取得鼠類的糞便。

雖然穀倉害鼠的糞便相當容易取得，然而有多種鼠類在穀倉出沒，由於單由糞便外型或大小並無法精準判別鼠種來源，若能以分子檢測資料來判別將是較好的鑑別方式。種與種之間的鑑別通常可利用粒線體細胞色素 b (Cyt b) 來設計 PCR。然而在穀倉內常出沒的溝鼠、家鼯鼠、屋頂鼠、鬼鼠和小黃腹鼠中，目前仍沒有小黃腹鼠的粒線體 Cyt b 序列資料，因此我們依據已知的鼠類序列設計保留性區域的 PCR，獲得小黃腹鼠的 0.3 kb PCR 產物，並經解序比對發現與 Cyt b 高度相似。獲得部分小黃腹鼠的粒線體 Cyt b 序列資料後，我們比對穀倉常出沒鼠類的粒線體 Cyt b，設計鑑別穀倉鼠類的多引子 PCR 以提升鑑別效率。

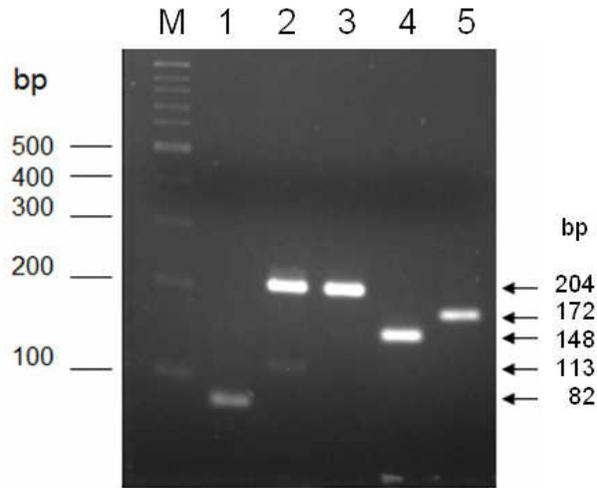
多引子 PCR 的預期產物為 82 bp (溝鼠)、148 bp (鬼鼠)、172 bp (家鼯鼠)、204 bp (小黃腹鼠)，204 bp 及 113 bp (屋頂鼠)，Lane 1~5 分別使



圖二、PCR-RFLP 檢測 VKORC1 的 Y139 突變。*Nde* I 水解前與水解後的 PCR 產物以 4% 洋菜膠電泳分離。

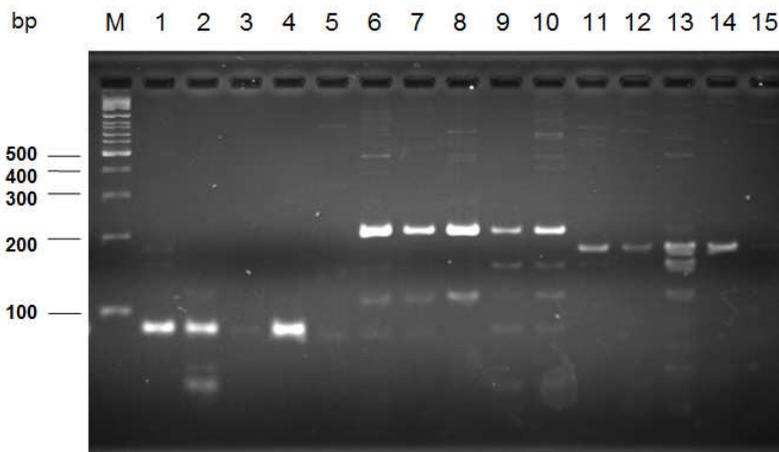
Figure 2. The VKORC1 Y139 mutation analysis by PCR-RFLP. The PCR products were resolved on a 4% agarose gel before or after *Nde* I digestion.

用溝鼠、屋頂鼠、小黃腹鼠、鬼鼠、及家鼯鼠之血液 DNA 做為 PCR 模板 (圖三)，顯示多引子 PCR 可以快速鑑別穀倉中鼠類檢體種類。在南投縣草屯的南埔穀倉內三個區塊進行糞便取樣。lane 1~5, 6~10, 11~15 的 PCR 分別使用三個區塊之糞便 DNA 作為 PCR 模板 (圖四)，發現實際從穀倉取得的糞便樣品新鮮度不一。檢測後可以發現不是每一個樣品的 DNA 品質都很好，其中有些 PCR 產物太弱 (如 3, 5, 15 號樣品)，有些雜帶較多 (如 2, 9, 10, 13 號樣品)，表示 DNA 量太少或品質不好或污染物太多。然而仍有半數樣品可以進行檢測，包括糞便 1,4 號 (82 bp，溝鼠)、6~8 號 (204 bp 及 113 bp，屋頂鼠)、11,12 及 14 號 (172 bp，家鼯鼠)。目前我們進行穀倉糞便的 PCR-RFLP 檢測中，其中家鼯鼠糞便發現有 VKORC1 Y139 異質型突變，其定序結果顯示含有 Y139C 的變異型。



圖三、鼠類粒線體細胞色素 b 的多引子 PCR。預期產物為 82 bp (溝鼠)、148 bp (鬼鼠)、172 bp (家鼯鼠)、204 bp (小黃腹鼠)、204 bp 及 113 bp (屋頂鼠)。

Figure 3. Multiplex PCR of rodent mitochondrial cytochrome b. The expected DNA sizes are 82 bp (*R. norvegicus*), 148 bp (*B. indica*), 172 bp (*M. musculus*), 204 bp (*R. losea*), and 204 bp along with 113 bp (*R. rattus*).



圖四、利用粒線體細胞色素 b 的多引子 PCR 鑑別穀倉鼠類糞便。Lane 1~5, 6~10, 11~15 的 PCR 分別使用三個區間之糞便 DNA 作為 PCR 模板。

Figure 4. Differentiation of rodents feces by multiplex PCR of mitochondria cytochrome b. Fecal DNA in lanes 1-5, 6-10, and 11-15 were from three partitioned areas of the barn.

總 結

臺灣的小黃腹鼠 VKORC1 解序資料中顯現出 VKORC1 的多態型，其中發現有文獻中溝鼠的 S56P 及 A143V 變異。Pelz *et al.* (2005) 的結果顯示 S56P 突變型的酵素活性低，在殺鼠靈存在下幾乎測不到活性，不能證明 S56P 與抗藥性有關。Rost *et al.* (2009) 的研究顯示 A143V 突變型受殺鼠靈抑制的效率近似野生型；而 Y139C、Y139F、及 Y139S 則較不易受殺鼠靈抑制。臺中小黃腹鼠 VKORC1 的 Y139H 則是一個新穎的突變型，是否與抗藥性有關還需進一步的研究。臺中地區其他數種鼠類的 VKORC1 Y139 變異與抗藥性檢驗我們正進行檢測中。

我們也利用穀倉的鼠類糞便來檢測鼠類的 VKORC1，糞便先以粒線體 Cyt b 的專一性 PCR 來鑑別鼠種來源，再進行 PCR-RFLP 檢測 VKORC1 的變異，檢測結果若為突變則進行解序檢查突變類型。我們利用糞便檢測草屯的南埔穀倉鼠類的 VKORC1，發現家鼯鼠的 Y139C 突變型。在英國、丹麥及德國，Y139C 是一個常見的抗藥性突變 (Pelz *et al.*, 2005)。未來還需要搭配活體抗藥性檢測資料以探討 VKORC1 變異與抗藥性的關係。

此外，在不同的鼠類或不同的地區，發展出來的抗藥性機制不見得相同，抗藥性機制可以是在藥物目標蛋白上發生突變或是改變基因表現量，或增加藥物代謝排除機制，或甚至會誘發補償系統，使得藥物所抑制生成的重要物質仍能夠順利產生，降低藥劑效用。而這些抗藥機制很可能同時存在一起作用，甚至在性別上具有差異。抗凝血殺鼠劑的抗藥性機制目前尚未完全清楚，相信會有更多的抗藥性機制將會被發現。

引用文獻

- Boyle CM. 1960. Case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* to anticoagulant poisons. *Nature* 188: 517.
- Buckle AP, Prescott CV, Ward KJ. 1994. Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides-a new perspective. pp 138-144. In: Halverson WS & Crabb AC (eds). *Proceedings of the sixteenth vertebrate*

- pest conference. Univ. of Calif., Davis.
- Daly AK, Aithal GP. 2003. Genetic regulation of warfarin metabolism and response. *Semin Vasc Med* 3: 231-8.
- Drummond DC, Rennison BD. 1973. The detection of rodent resistance to anticoagulants. *Bull World Health Organ* 48: 239-242.
- Drummond DC, Wilson EJ. 1968. Laboratory investigations of resistance to warfarin of *Rattus norvegicus* Berk. In *Montgome norvegicus* Berk. in Montgomeryshire and Shropshire. *Ann Appl Biol* 61: 303-312.
- Esmon CT, Suttie JW. 1976. Vitamin K-dependent carboxylase solubilization and properties. *J Biol Chem* 251: 6238-6243.
- Fasco MJ, Principe LM, Walsh WA, Friedman PA. 1983. Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry* 22: 5655-5660.
- Furie B, Furie BC. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53: 505-518.
- Gill JE, Kerins GM, Langton SD, MacNicoll AD. 1993. The development of a blood clotting response test for discriminating between difenacoum-resistant and susceptible Norway rats (*Rattus norvegicus*, Berk.). *Comp Biochem Physiol C* 104: 29-36.
- Goodstadt L, Ponting CP. 2004. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci* 29: 289-292.
- Greaves JH, Cullen-Ayres PB. 1988. Genetics of difenacoum resistance in the rat. pp 389-397. In: Suttie JW (ed). *Current advances in vitamin K research*. Elsevier, Amsterdam.
- Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S. 2007. Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos* 35: 62-66.
- Ishizuka M, Tanikawa T, Tanaka KD, Heewon M, Okajima F, Sakamoto KQ, Fujita S. 2008. Pesticide resistance in wild mammals--mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents. *J Toxicol Sci* 33: 283-291.
- Kohn MH, Pelz HJ. 2000. A gene-anchored map position of the rat

- warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans. *Blood* 96: 1996-1998.
- Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Videmann B, Billeret M, Berny P, Benoit E. 2005. Warfarin resistance in a French strain of rats. *J Biochem Mol Toxicol* 19: 379-385.
- Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427: 541-544.
- MacNicoll AD. 1985. A comparison of warfarin resistance and liver microsomal vitamin K epoxide reductase activity in rats. *Biochim Biophys Acta* 840:13-20.
- Markussen MD, Heiberg AC, Fredholm M, Kristensen M. 2007. 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 gamma-carboxylation. *J Biochem Mol Toxicol* 21: 373-381.
- Markussen MD, Heiberg AC, Fredholm M, Kristensen M. 2008. 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* 64: 239-248.
- Martin AD, Steed LC, Redfern R, Gill JE, Huson LW. 1979. Warfarin-resistance genotype determination in the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Lab Anim* 13: 209-214.
- Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicoll AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, Müller CR. 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170:1839-1847.
- Petterino C, Paolo B. 2001. Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet Hum Toxicol* 43: 353-360.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J. 2004. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and

- multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541.
- Rost S, Pelz HJ, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song KJ, Jäkel T, Oldenburg J, Müller CR. 2009. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice--a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet* 10.
- Thijssen HH, Janssen CA, Drittij-Reijnders MJ. 1986. The effect of S-warfarin administration on vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in liver, kidney and testis of the rat. *Biochem Pharmacol* 35: 3277-3282.
- Thijssen HH, Janssen CA, Mosterd JJ. 1989. Warfarin resistance: biochemical evaluation of a warfarin-resistant wild brown rat. *Biochem Pharmacol* 38: 3129-3132.
- Tie JK, Nicchitta C, von HG, Stafford DW. 2005. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation. *J Biol Chem* 280: 16410-16416.
- Valchev I, Binev R, Yordanova V, Nikolov Y. 2008. Anticoagulant rodenticide intoxication in animals - a review. *Turk J Vet Anim Sci* 32: 237-243
- Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. 2004. 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* 279: 25276-25283.
- Wallin R. 1986. Vitamin K antagonism of coumarin anticoagulation. A dehydrogenase pathway in rat liver is responsible for the antagonistic effect. *Biochem J* 236: 685-693.
- Wallin R, Hutson SM. 2004. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med* 10: 299-302
- Wallin R, Martin LF. 1987. Warfarin poisoning and vitamin K antagonism in rat and human liver. Design of a system in vitro that mimics the situation in vivo. *Biochem J* 241: 389-396.
- Wallin R, Hutson SM, Cain D, Sweatt A, Sane DC. 2001. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J* 15:

2542-2544.

Zimmermann A, Matschiner JT. 1974. Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. *Biochem Pharmacol* 23: 1033-1040.

Research prospects of the Mechanisms of Anticoagulant Rodenticide Resistance

Jen-Wen Lin^{1*}, Hsiu-Ying Liao¹, Jihn-Bin Wang², Ju-Chun Hsu³, Hai-Tung Feng¹

¹ Division of Pesticide Chemistry, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture

² Division of Applied Toxicology, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture

³ Department of Entomology, National Taiwan University

Abstract

Domestic and wild rodents are detrimental to household hygiene and agricultural production, respectively. Anticoagulant rodenticides are most commonly used to control the rodent pests, mainly because of their slow action and safety, and less impact to the environment. Warfarin, a first generation anticoagulant, has been used worldwide since 1950s. Just like insecticide-resistance, warfarin-resistance has occurred all over the world since the first report from Scotland in 1958. In Europe, many studies have provided evidences supporting the idea that mutation(s) on vitamin-K-epoxide reductase (VKOR) is the main cause leading to the warfarin resistance. The second generation anticoagulants, also called superwarfarins, are very toxic to rodents and less liable to metabolism. Even so, bromadiolone-resistance has already been found. Rodents resisted to anticoagulants mainly by two mechanisms. Mutations in rodenticide binding site may reduce the effect of rodenticide. In addition, overexpression of metabolizing P450 proteins sometimes lead to decreased effect of rodenticide. This article will review the recent researches about the anticoagulant resistance in the wild rodent pests..

Keywords: Anticoagulant, warfarin, bromadiolone, vitamin-K-epoxide

reductase (VKOR), cytochrome P450

* Corresponding author. E-mail: jenwen@tactri.gov.tw