·基础研究·

维生素K代谢相关基因 *CYP4F2* 参与凝血因子FⅨ活化的研究

刘 佳,秦留安,席少枝,刘 军,王绪云,李晓琪,杨 洁,尹 彤*
(解放军总医院心内科,北京 100853)

【摘 要】 目的 探索维生素K代谢相关基因 *CYP4F2* 对维生素K依赖性凝血因子活化(凝血因子FⅨ为例)的影响。**方法** 构建同时含有CYP4F2-cDNA片段与FⅨ-cDNA片段的pIRES质粒,通过酶切验证。使用Lipofectamine 2000转染试剂,将构建成功的pIRES-FⅨ-CYP4F2质粒以及pIRES-FⅨ质粒、pIRES空白对照质粒瞬时转染LO2细胞。在不同质粒转染的细胞中,通过Western blotting验证CYP4F2和FⅨ蛋白的表达,应用FⅨa Assay检测试剂盒检测FⅨa活性。**结果** 经酶切证实,pIRES-FⅨ-CYP4F2质粒构建成功。Western blotting证实,pIRES-FⅨ及pIRES-FⅨ-CYP4F2质粒成功转染LO2细胞。FⅨa Assay检测发现,在过表达FⅨ的LO2细胞培养上清和细胞裂解液中,FⅨa活性较对照组显著升高;当同时过表达CYP4F2和FⅨ后,LO2细胞培养上清和细胞裂解液中的FⅨa活性较单独过表达FⅨ组明显降低。**结论** 维生素K代谢相关基因 *CYP4F2* 的过表达对维生素K依赖性FⅨ的活化具有抑制作用。

【关键词】 CYP4F2;凝血因子;羧化活性;维生素K
【中图分类号】 R965 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.047

Vitamin K metabolize associated gene *CYP4F2* is involved in activation of coagulation factor Ⅸ

LIU Jia, QIN Liu-An, XI Shao-Zhi, LIU Jun, WANG Xu-Yun, LI Xiao-Qi, YANG Jie, YIN Tong*
(Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To determine the effect of vitamin K metabolize associated gene *CYP4F2* on the activation of vitamin K dependent coagulation factor Ⅸ (FⅨ). **Methods** The pIRES plasmid containing CYP4F2-cDNA fragment and FⅨ-cDNA fragment was constructed, and enzyme digestion was used to verify the products. The plasmids pIRES-FⅨ-CYP4F2, pIRES-FⅨ and pIRES (control plasmid) were transfected into LO2 cells respectively with Lipofectamine 2000 transfection reagent. Western blotting was used to detect the expression of CYP4F2 and FⅨ. The activity of FⅨa was detected by FⅨa activity assay kit. **Results** The results of enzyme digestion indicated that the pIRES-FⅨ-CYP4F2 plasmid was successfully constructed. The plasmids pIRES-FⅨ and pIRES-FⅨ-CYP4F2 were successfully transfected into LO2 cells. FⅨa activity was significantly higher in the supernatants and cell lysates from the FⅨ-overexpressed LO2 cells than the control cells, but the activity was significantly reduced in the LO2 cells with the over-expression of FⅨ and CYP4F2 than the cells with the over-expression of FⅨ. **Conclusion** The over-expression of CYP4F2 exerts inhibitory effect on the activation of vitamin K dependent FⅨ.

【Key words】 CYP4F2; coagulation factor; carboxylase activity; vitamin K
This work was supported by the General Program of Natural Science Foundation of Beijing (7152129) *and the Clinical Support Fund of Chinese PLA General Hospital* (2012FC-TSYS-3043).
Corresponding author: *YIN Tong*, *E-mail*: *yin1tong1@163.com*

维生素K循环是机体内维生素K依赖性凝血因子(Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ)活化的重要通路,环氧型维生素K经维生素K环氧化物还原酶(vitamin K epoxide reductase,VKOR,编码基因 *VKORC1*)转变为维生素K,然后在VKOR的作用下,转化为还原型维生素K,参与维生素K依赖性凝血因子的羧化反应[1]。由于维生素K循环是通过少量维生素K的反复利用,实现维生素K的氧化还原和γ羧化,因此,肝脏维生素K循环中的维生素K含量的稳态对凝血因子活化反应的影响更直接和显著。近年研究表明,在维

收稿日期:2016-11-11;**修回日期**:2016-12-02
基金项目:北京市自然科学基金面上项目(7152129);解放军总医院临床扶持基金(2012FC-TSYS-3043)
通信作者:尹 彤,E-mail:yin1tong1@163.com

生素K循环中,细胞色素P450家族的成员CYP4F2具有氧化水解维生素K的功能[1],因此,CYP4F2有可能通过改变维生素K循环中维生素K含量的稳态影响凝血因子的活化,从而发挥其对凝血功能的影响。我们前期针对维生素K拮抗剂华法林的药物基因组学研究发现,在维生素K代谢和循环通路上的候选基因(*VKORC1*、*GGCX*、*CYP4F2*、*EPHX1*、*APOE*、*NQO1*、*CALU*)中,只有*CYP4F2*基因变异型与华法林出血并发症相关。经校正维生素K摄取等临床环境因素和已知相关基因变异因素(CYP2C9*3)后[2,3],其中携带CYP4F2rs3093168 CC基因型患者发生严重出血并发症的风险是非携带者的7.61倍[4],提示*CYP4F2*基因是影响华法林出血并发症的重要相关基因,其作用机制可能与CYP4F2参与影响凝血因子的活化密切相关。尽管如此,目前尚未见*CYP4F2*对维生素K依赖性凝血因子活性影响的相关文献报道。鉴于此,本研究以维生素依赖性凝血因子FⅨ活性的改变为例,通过在人肝细胞系LO2细胞中过表达CYP4F2和凝血因子FⅨ,探讨CYP4F2对维生素K依赖性凝血因子活化的影响,以期为基于药物基因组学的维生素K拮抗剂个体化抗凝治疗提供新的生物功能依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

携带人CYP4F2-cDNA的pCR4Zero质粒[5]和携带人凝血因子FⅨ-cDNA的pIRES质粒[6]分别由美国密西西比大学医学中心Stec教授和德国乌尔茨堡大学人遗传学研究所Czogalla教授惠赠。人正常肝脏细胞系LO2细胞购自军事医学科学院细胞库。质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、1640细胞培养基、胎牛血清及Lipofectamine 2000转染试剂为Invitrogen公司产品。*Xba* Ⅰ与*Sal* Ⅰ核酸限制性内切酶购自TAKARA公司。FⅨ抗体、CYP4F2抗体及FⅨa活性检测试剂盒购自ABCAM公司。

1.2 质粒构建

通过携带人CYP4F2-cDNA的pCR4Zero质粒和携带人凝血因子FⅨ-cDNA的pIRES质粒,构建同时含有CYP4F2-cDNA片段与FⅨ-cDNA片段的pIRES质粒。步骤如下:根据NCBI的*CYP4F2*基因CDS序列设计扩增引物。上游引物5'-tctagaatgtcccagctgagcctgtc-3',下游引物5'-gtcgactcagctcaggggctccaccc-3'。以pCR4Zero-CYP4F2质粒作为模板,PCR扩增*CYP4F2*基因CDS片段。反应体系:DNA模板1.5 μl、taq Master Mix 12.5 μl、上下游引物各0.8 μl、ddH_2O 9.4 μl。用2.0%琼脂糖凝胶电泳分离并回收PCR产物,扩增后的CYP4F2-cDNA片段连接到T载体。取连接产物转化TOP10感受态细胞,将转化菌液涂布于含氨苄青霉素(100 mg/ml)的LB固体培养基上,37℃培养过夜。挑取生长状态良好的菌落培养,提取质粒后使用*Xba* Ⅰ与*Sal* Ⅰ核酸限制性内切酶分别双酶切pIRES-FⅨ-cDNA质粒和连接CYP4F2-cDNA片段的T载体。使用T4连接酶16℃条件下将CYP4F2-cDNA片段连接到pIRES质粒的MCS B区域(此前pIRES质粒的MCS A区域已经包含FⅨ-cDNA片段),构建pIRES-FⅨ-cDNA质粒。取连接产物转化TOP10感受态细胞,将转化菌液涂布于含氨苄青霉素(100 mg/ml)的LB固体培养基上,37℃培养过夜。挑取生长状态良好的菌落培养,提取质粒进行双酶切并测序鉴定。

1.3 细胞培养及转染

使用含10%胎牛血清及5%双抗的1640培养基培养LO2细胞,常规换液、传代。取生长状态好的LO2细胞使用胰蛋白酶消化计数,将6×10^5细胞种植于直径为6 cm的平皿中。用含10%胎牛血清及3 nmol/L维生素K1(维生素K1使用10倍DMSO稀释后加入培养基)的1640培养基在37℃,5% CO_2的孵箱内培养过夜。待细胞融合面积达70%~80%后,更换无血清无双抗的1640培养基。将8 μg pIRES-FⅨ质粒溶于500 μl Opti-mem无血清培养基中(A管)。另将20 μl Lipofectamine 2000转染试剂溶于500 μl Opti-mem无血清培养基中(B管),室温静置5 min后将两管混合摇匀,室温孵育20 min后将混合液缓慢加入LO2细胞中,混匀后置于37℃,5% CO_2培养箱中培养。同样方法转染pIRES-FⅨ-CYP4F2质粒以及pIRES空白对照质粒。每组质粒做复孔同步转染。5 h后更换新的含10%胎牛血清及3 nmol/L维生素K1的1640培养基。48 h后收集培养上清于-80℃保存。

1.4 蛋白免疫印迹

质粒转染48 h后,分别刮取各组细胞,加入RIPA高效细胞裂解液。小心吸取上清提取细胞总蛋白,用BCA试剂盒(Solarbio,中国)进行蛋白定量。分别将各组蛋白加入1/4体积的蛋白上样缓冲液后置于沸水中煮5 min加样,每组蛋白上样30 μg。SDS-PAGE凝胶电泳100 V、1.5 h、半干转法将凝胶蛋白转至PVDF膜。转膜条件:恒流300 mA,2 h。使用5%脱脂奶粉37℃封闭1 h。将目的蛋白条带和内参条带剪开,两张含有目的蛋白的膜分别

加入 1∶1000 稀释的 FⅨ 抗体以及 1∶1000 稀释的 CYP4F2 抗体，含有内参蛋白的膜加入 1∶1000 稀释的 GAPDH 内参抗体（Solarbio，中国），置于 4℃ 冰箱过夜。TBST 洗膜 10 min，共 3 次。然后分别加入 1∶5000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体（Solarbio，中国），37℃ 孵育 1 h。再次 TBST 洗膜 10 min，共 3 次。用 ECL 化学发光检测试剂（Solarbio，中国）放射自显影检测 FⅨ和 CYP4F2 蛋白表达。

1.5 凝血因子活性检测

根据 FⅨa Assay 检测试剂盒说明书，将每组蛋白裂解液各取 10 μg 分别加入 96 孔板中，然后分别加入 10 μl 配制好的 master mix 溶液，加入 FⅨa Assay Buffer 溶液至 98 μl，混匀后 37℃ 孵育 15 min。每个孔中加入 2 μl FⅨa substrate-AMC 溶液，混匀。避光 37℃ 孵育 30 min 后放入荧光酶标仪（Ex/Em = 360/450 nm）。将每组细胞培养上清各取 10 μl 加入 96 孔板中，同样的方法对细胞培养上清中 FⅨa 活性进行检测。以上检测各组样本均做复孔重复 3 次，结果取均值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件对数据进行处理。计量资料用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组比较采用 t 检验，多组比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 扩增目的基因和构建质粒

PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后可得到一条大小约 1700 bp 的扩增条带（图 1A），与 NCBI 中 *CYP4F2* 基因 CDS 大小一致，提示成功克隆 *CYP4F2* 基因。pIRES-FⅨ-CYP4F2 质粒经 *Xba* Ⅰ与 *Sal* Ⅰ核酸限制性内切酶双酶切后琼脂糖凝胶电泳 50 min 后可获得 1 条大约 1700 bp 条带（图 1B），与 NCBI 中 *CYP4F2* 基因 CDS 大小一致，测序后证实含有 CYP4F2-cDNA 片段，提示质粒构建成功。

2.2 转染后蛋白表达

转染 pIRES-FⅨ质粒以及 pIRES-FⅨ-CYP4F2 质粒后，FⅨ和 CYP4F2 的表达显著增加（$P < 0.05$；图 2），提示质粒转染成功并正常表达。

2.3 凝血因子活性检测

使用 FⅨa 活性检测试剂盒以及荧光酶标仪对各组细胞裂解液及培养上清 FⅨa 进行定量分析。发现过表达 FⅨ后 LO2 细胞 FⅨa 的活性较正常对照组明显升高［培养上清：（2268.67 ± 114.15）*vs*（1614.00 ± 69.67），$P = 0.038$；细胞裂解液：（1097.33 ± 55.52）*vs*（778.67 ± 36.01），$P = 0.041$］。提示细胞中 FⅨa 的活性与 FⅨ表达呈正相关。而同时过表达 CYP4F2 和 FⅨ后 LO2 细胞 FⅨa 的活性较过表达 FⅨ组明显降低［培养上清：（1540.00 ± 72.64）*vs*（2268.67 ± 114.15），$P = 0.032$；细胞裂解液：（1805.33 ± 10.50）*vs*（1097.33 ± 55.52），$P = 0.036$］。提示维生素 K 代谢相关基因 *CYP4F2* 过表达对凝血因子的活化具有抑制作用，进一步对凝血产生影响。具体结果见图 3。

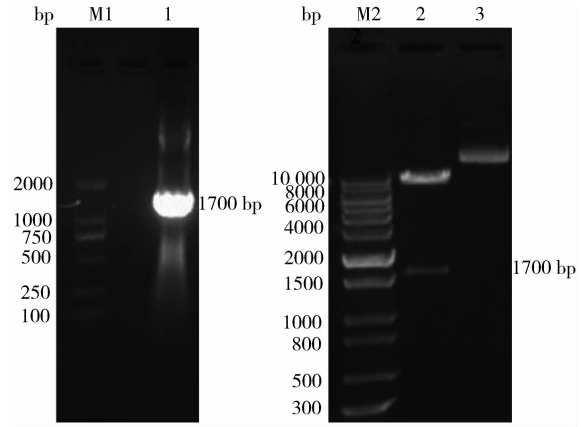


图 1 CYP4F2 基因 PCR 扩增产物和 pIRES-FⅨ-CYP4F2 重组质粒酶切

Figure 1 Electrophoresis of CYP4F2 PCR product and enzyme cleave identification of recombinant plasmid

M1：D2000 DNA marker；1：PCR product；M2：1kb plus DNA marker；2：pIRES-FⅨ-CYP4F2 plasmid cleaved by *Xba* Ⅰ/*Sal* Ⅰ；3：pIRES-FⅨ-CYP4F2 plasmid

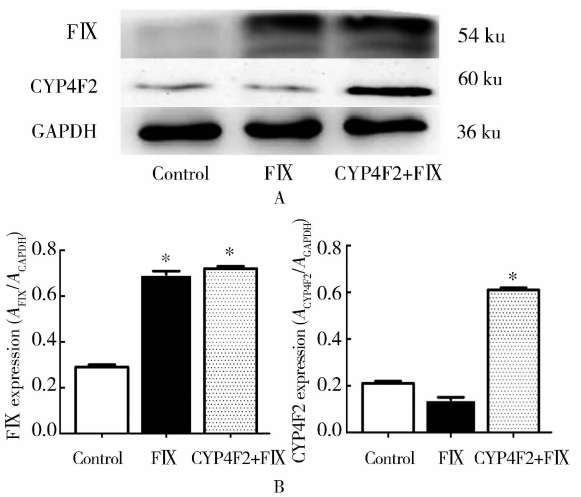


图 2 各组 LO2 细胞 FⅨ及 CYP4F2 蛋白表达

Figure 2 FⅨ and CYP4F2 protein expression of different LO2 cells

Control：empty plasmid（pIRES）；FⅨ：recombinant plasmid（pIRES-FⅨ）；CYP4F2 + FⅨ：recombinant plasmid（pIRES-FⅨ-CYP4F2）. Compared with control group，$^{*}P < 0.05$

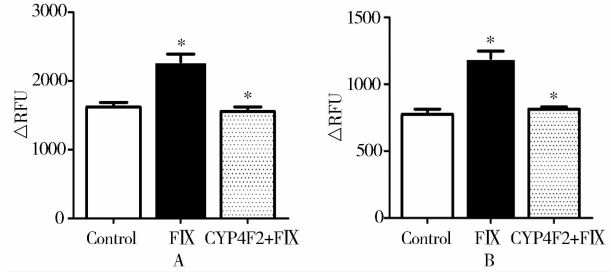


图3 各组LO2细胞裂解液和培养上清液中FⅨa定量分析

Figure 3 Quantitative analysis of FⅨa in cell culture supernatant and lysis solution from different plasmids

A: cell supernatant; B: cell lysates. Control: empty plasmid (pIRES); FⅨ: recombinant plasmid (pIRES-FⅨ); CYP4F2 + FⅨ: recombinant plasmid (pIRES-FⅨ-CYP4F2); RFU: relative fluorescence units. Compared with control group, $^{*}P<0.05$

3 讨 论

CYP4F2 基因是CYP450超家族的成员之一,位于19号染色体短臂,全长约20 kb,由13个外显子和12个内含子组成[7]。CYP4F2编码的蛋白具有氧化水解维生素K的功能,通过羟基化维生素K苯基侧链导致维生素K循环中还原型维生素K水平下降[1]。*CYP4F2* 基因突变后对维生素K的代谢能力改变,造成维生素K蓄积或减少。多个研究表明CYP4F2 * 3基因型与华法林高剂量有关[8,9]。但CYP4F2与出血并发症的相关性及作用机制研究相对较少。本研究通过在人肝细胞中过表达CYP4F2和FⅨ后发现,CYP4F2对维生素K依赖性凝血因子的活化具有抑制作用。该研究表明,CYP4F2的过表达可能增强了对维生素K循环中维生素K的氧化水解,导致还原型维生素K含量降低,进而导致凝血因子γ羧化反应减弱,凝血因子活性降低。由于经肝脏维生素K循环进行的凝血因子γ羧化反应的变化与维生素K拮抗剂华法林出血并发症的发生直接相关,因此,本研究为前期发现的 *CYP4F2* 基因变异型与华法林出血并发症的关联性提供了生物功能依据[4,10]。

本研究通过补充外源性维生素K1使细胞培养液中维生素K1浓度达到3 nmol/L,该浓度与人血浆中维生素K浓度接近[11,12],因此,既能保证细胞完成正常的维生素K循环,又能避免外源性维生素对实验造成的干扰。由于FⅨ是分泌蛋白,因此本研究分别采用细胞裂解液和细胞培养上清液作为样本检测FⅨa的活性。结果显示,无论是在细胞裂解液还是细胞培养上清液中,过表达CYP4F2后,FⅨa的活性均降低。另外,在肝细胞的维生素K循环中VKOR为关键酶[5],在维生素K的氧化还原过程中发挥重要作用。本研究在细胞培养过程中未额外转染外源性VKOR,而是依靠细胞内源性VKOR完成维生素K循环及凝血因子羧化反应。这样可能存在因细胞内源性VKOR活性不足而影响结果,但是通过对维生素K依赖性凝血因子活性的检测发现,依靠肝细胞内源性VKOR能够实现维生素K循环催化的凝血因子羧化反应。

综上所述,本研究证实在肝细胞中过表达CYP4F2可导致维生素K依赖性FⅨa的活性降低。该结果将有助于进一步揭示 *CYP4F2* 基因与维生素K拮抗剂华法林出血关联性的相关功能机制。

【参考文献】

[1] Stafford DW. The vitamin K cycle[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8): 1873-1878.

[2] Lewis BC, Nair PC, Heran SS, *et al*. Warfarin resistance associated with genetic polymorphism of VKORC1: linking clinical response to molecular mechanism using computational modeling[J]. Pharmacogenet Genomics, 2016, 26(1): 44-50. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000184.

[3] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1 — rationale and perspectives[J]. Thromb Res, 2007, 120(1): 1-10. DOI: 10.1016/j.thromres.2006.10.021.

[4] Wang HJ, Ma C, Yang J, *et al*. CYP4F2 polymorphism as a genetic risk factor for major hemorrhagic complications in Chinese patients on warfarin therapy[J]. J Geriatr Cardiol, 2012, 9(2): 209-210. DOI: 10.3724/SP.J.1263.2012.04162.

[5] Stec DE, Roman RJ, Flasch A, *et al*. Functional polymorphism in human CYP4F2 decreases 20-HETE production[J]. Physiol Genomics, 2007, 30(1): 74-81. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00003.2007.

[6] Fregin A, Czogalla KJ, Gansler J, *et al*. A new cell culture-based assay quantifies vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiothreitol-driven VKOR assay[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(5): 872-880. DOI: 10.1111/jth.12185.

[7] Bylund J, Finnstrom N, Oliw EH. Gene expression of a novel cytochrome P450 of the CYP4F subfamily in human seminal vesicles[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 261(1): 169-174. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1011.

[8] Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, *et al*. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose[J]. Blood, 2008, 111(8): 4106-4112. DOI: 10.1182/blood-2007-11-122010.

[9] McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, *et al*. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(6): 1337-1346. DOI: 10.1124/mol.109.054833.

[10] Roth JA, Boudreau D, Fujii MM, *et al*. Genetic risk factors for major bleeding in patients treated with warfarin in a community setting[J]. Clin Pharmacol Ther, 2014, 95(6): 636-643. DOI: 10.1038/clpt.2014.26.

[11] Shea MK, O'Donnell CJ, Vermeer C, *et al*. Circulating uncarboxylated matrix gla protein is associated with vitamin K nutritional status, but not coronary artery calcium, in older adults[J]. J Nutr, 2011, 141(8): 1529-1534. DOI: 10.3945/jn.111.139634.

[12] Kamao M, Suhara Y, Tsugawa N, *et al*. Determination of plasma vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using vitamin K analogs as internal standards[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 816(1-2): 41-48. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.11.003.

(编辑: 王彩霞)