



安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：重组人凝血因子 X 在 HEK293 细胞中的表达及活性检测
作者：冯佳宁, 邹森, 赵泽林, 李肖肖, 张志斐, 杨兆勇
网络首发日期：2025-06-05
引用格式：冯佳宁, 邹森, 赵泽林, 李肖肖, 张志斐, 杨兆勇. 重组人凝血因子 X 在 HEK293 细胞中的表达及活性检测[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250604.1645.009>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

重组人凝血因子 X 在 HEK293 细胞中的表达及活性检测

冯佳宁^{1*}, 邹森^{2*}, 赵泽林¹, 李肖肖¹, 张志斐¹, 杨兆勇²

(¹ 华北理工大学药学院, 唐山 063000; ² 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要 目的 瞬时转染重组人凝血因子 X (rhFX) 到 HEK293 细胞, 优化转染条件, 体外构建高效表达 rhFX 的方法, 检测 rhFX 活性。**方法** pcDNA3.1-EGFP 与 FX 基因构建真核表达载体 pcDNA3.1-EGFP-FX 并转染 HEK293 细胞, 验证转染系统的有效性。pcDNA3.1 与 FX 基因片段构建重组表达载体 pcDNA3.1-FX, 脂质体方法转染 HEK293 细胞, Western blot 和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测细胞上清液中 rhFX 的表达。优化转染条件, ELISA 测定 rhFX 的浓度; 凝血酶原时间 (PT) 和发色底物法测定 rhFX 凝血生物活性。**结果** 在 HEK293 细胞上清液中成功表达 rhFX。在细胞密度 80%, 质粒 DNA 与: 转染试剂的比例为 1:2, 转染后第 3 天, rhFX 表达量最高。ELISA 检测 3 次上清液表达量最高为 5.20 ng/mL。与对照组 pcDNA3.1 空载体转染收集的上清液相比, 实验组 rhFX 的 PT 时间更短 ($P < 0.0001$), 基于 rhFX 的发色底物法测得依度沙班的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 1.449 nmol/L 文献报导的 0.78 nmol/L 处于同一数量级。**结论** 使用 HEK293 细胞成功表达出具有生物活性的 rhFX 蛋白, 为进一步推动 rhFX 药物的研发奠定基础。

关键词 重组人凝血因子 X; 瞬时表达; 表达优化; HEK293 细胞; 凝血因子 X 缺乏症; 凝血酶原时间

中图分类号 R 554

文献标志码 A

Expression and optimization of recombinant human coagulation factor X in HEK293 cells

Feng Jianing¹, Zou Sen², Zhao Zelin¹, Li Xiaoxiao¹, Zhang Zhifei¹, Yang Zhaoyong²

(¹ College of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000;

² Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82373767、82301185)

作者简介: 冯佳宁, 男, 硕士研究生;

张志斐, 女, 硕士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhangzhifeifei7208@163.com

杨兆勇, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: zhaoyongy@imb.pumc.edu.cn

*对本文具有同等贡献

Abstract Objective To perform transient transfection of recombinant human Factor X (rhFX) into HEK293 cells, to optimize transfection parameters, to develop a high-yield in vitro expression system for rhFX production, and to assess the biological activity of expressed rhFX. **Methods** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-EGFP-FX was constructed by inserting the FX gene into pcDNA3.1-EGFP and subsequently transfected into HEK293 cells to validate the transfection system efficiency. The recombinant expression vector pcDNA3.1-FX was generated through ligation of the FX gene fragment with pcDNA3.1, followed by liposome-mediated transfection into HEK293 cells. The expression of rhFX in the cell supernatant was analyzed by Western blot and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Transfection conditions were systematically optimized, and rhFX concentration was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The coagulation bioactivity of rhFX was evaluated through prothrombin time (PT) assay and chromogenic substrate method. **Results** Recombinant human Factor X (rhFX) was successfully expressed in the supernatant of HEK293 cells. Optimal expression was achieved at 80% cell confluence with a ratio of plasmid DNA to transfection reagent as 1:2. Peak rhFX production was observed on day 3 post-transfection. Triplicate ELISA measurements demonstrated a maximum rhFX concentration of 5.20 ng/mL in the supernatant. The prothrombin time (PT) of rhFX-containing supernatant was significantly shorter ($P < 0.0001$) compared to control supernatant from pcDNA3.1 empty vector-transfected cells. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of etoxaban was determined to be 1.449 nmol/L using the chromogenic substrate method based on rhFX, which was in the same order of magnitude as the reported 0.78 nmol/L in the literature. **Conclusion** HEK293 cells successfully express biologically active recombinant human Factor X (rhFX) protein, laying a foundation for advancing the development of rhFX-based therapeutics.

Key words recombinant human coagulation factor X; instantaneous expression; expression optimization; HEK293 cells; coagulation factor X deficiency; prothrombin time

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82373767, 82301185)

Corresponding authors Zhang Zhifei, E-mail: zhangzhifeifei7208@163.com; Yang Zhaoyong, E-mail: zhaoyongy@imb.pumc.edu.cn

凝血因子 X (coagulation Factor X, FX) 缺乏症是一种罕见的常染色体隐性遗传出血性疾病^[1]。临床表现包括关节腔积血、胃肠道和中枢神经系统出血^[2]。治疗手段包括凝血因子 X 浓缩物、输注新鲜冰冻血浆和凝血酶原复合物浓缩剂等^[3-4]。但易发生感染、过敏反应以及血栓和弥散性血管内凝血等情况^[5]。

近年来,随着重组凝血因子技术的进步和新型产品的开发,全球重组凝血因子市场持续增长。美国食品和药物管理局已批准 20 多种重组凝血因子药物上市,其中大部分是在 2013 年以后批准的^[6]。重组人凝血因子 VII、重组凝血因子 VIII 和重组凝血因子 IX 已经有多款产品在全球上市^[7-8], Baxalta、CSL、Bayer、Novo Disk 等几大巨头重组凝血因子产品占据了大部分市场。仅在 2015 年经美国 FDA 批准,血浆来源的产品 Coagadex 成为唯一一个针对凝血因子 X 缺乏症药物上市,但目前还没有重组人凝血因子 X (recombinant human coagulation factor X, rhFX) 药物上市。且目前国内还没有重组凝血因子产品上市^[9],进口重组产品市场占比很高。因此,开发 rhFX 具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 pcDNA3.1 载体和 pcDNA3.1-EGFP 载体均由中国医学科学院医学生物技术研究所提供。人胚肾细胞系 HEK293 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司,大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α 购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器 MEM 基础培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号: PM150411); 胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-EDTA (美国赛默飞世尔科技旗下吉布科品牌, 货号: 1966173C、25200056); 无内毒素质粒小提中量快速提取试剂盒 (北京宝如亿生物技术有限公司, 货号: RA1508); *Hind* III 限制性内切酶、*Bam* H I 限制性内切酶、*Xho* I 限制性内切酶 (北京宝日医生物技术有限公司, 货号: 1615、1605、1635); 快速纯化凝胶 DNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 货号: DC301); 聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI)、依度沙班 (Edoxaban) (美国 MedChemExpress 公司, 货号: HY-K2014、HY-10264); 小鼠抗人凝血因子 X 抗体 (美国 Research & Diagnostics Systems 公司, 货号: MAB1063)、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 货号: D110087-0100); PVDF 膜 (上海碧云天生物科技股份有限公司, 货号: FFP32); TBST 速溶颗粒 (北京兰博利德商贸有限公司, 货号: T7209B); 考马斯亮蓝快速染液 (上海雅酶生物医药科技有限公司, 货号: PS111); 人凝血因子 X (F10) 酶联免疫吸附检测试

剂盒（科鹿武汉生物科技有限责任公司，货号：ELK1557）；蝥蛇蛇毒（russel's viper venom, RVV）（瑞士 Pentapharm 公司，货号：121-06）；Xa 因子发色底物 S-2765（chromogenic substrate for factor Xa, S2765）（北京阿斯雷尔生物技术有限公司，货号：AS00-0102）；凝血酶原时间（prothrombin time, PT）试剂（武汉中太生物技术有限公司，货号：PX1201）；凝血分析仪（武汉景川诊断技术股份有限公司，BCS-6100）；DNA 测序、基因和引物合成均在北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 质粒 pcDNA3.1-FX 和 pcDNA3.1-EGFP-FX 的构建 在 GenBank 中检索凝血因子 X 的基因序列（M57285.1）并由华大基因进行人源蛋白密码子优化并合成，优化后的序列适合在 HEK293 细胞系统中表达。为了使 rhFX 在真核载体 pcDNA3.1 中高效表达，采用 PCR 的方法在凝血因子 X 基因序列前添加起始密码子（ATG）；在起始密码子前添加 Kozak 序列（GCCACC）以增强真核基因的翻译效率。在基因片段上游添加 *Hind* III 酶切位点，下游添加 *Bam*HI 酶切位点。将修饰后的含有 Kozak 序列的 FX 基因构建至 pcDNA3.1、pcDNA3.1-EGFP 载体中。在 Primer 5.0 软件上设计 PCR 扩增引物如下：上游：FX-*Hind* III-F 为 5'-CCCAAGCTTGCCACCATGGGAAGACCCCTGCATCTGGT-3'；下游：FX-*Bam*HI-R 为 5'-CGCGGATCCTCAATGATGGTGGTGGTGGTGGTTCAGGG-3'。FX 片段和 pcDNA3.1 载体分别用 *Hind* III 酶和 *Bam*HI 酶双酶切，将酶切后的目的片段回收并连接到酶切后的 pcDNA3.1 载体上。连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞，取菌液在氨苄抗性的琼脂固体培养基上筛选抗性菌落，挑取 5 个单个菌落做菌落 PCR。根据菌落 PCR 结果选取 4 个阳性菌落于 37℃、200 r/min 恒温摇床上摇 12 h 后，将部分菌液送至北京六合华大基因科技有限公司测序鉴定。无内毒素质粒提取试剂盒提取重组质粒，对质粒进行酶切验证。pcDNA3.1-EGFP 质粒的构建：以上述 pcDNA3.1-FX 载体为模板，模板和 pcDNA3.1-EGFP 载体使用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切反应。取酶切回收后的 FX 目的片段和 pcDNA3.1-EGFP 载体片段连接，转化和质粒验证步骤同 pcDNA3.1-FX 质粒构建过程。

1.2.2 pcDNA3.1-EGFP-FX 和 pcDNA3.1-FX 质粒瞬时转染 以添加 10%胎牛血清的 MEM 基础培养基为 HEK293 细胞生长培养基，于 37℃、5%CO₂ 环境中贴壁培养。细胞长至 90%左右，0.25%胰酶消化 1 min，1 200 r/min。以 HEK293 细胞作为转染细胞系，将 pcDNA3.1-FX、pcDNA3.1-EGFP-FX 重组质粒转染至细胞内，转染前 1 天铺板，转染过程根据 PEI 的说明书进行。转染后每隔 24 h 观察荧光强度。使用同样方法将 pcDNA3.1-FX 重组质粒转染至 HEK293，阴性对照选用 pcDNA3.1 空质粒。纯化后通过 Western blot 和十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 鉴定蛋白表达。

1.2.3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测细胞上清液中的 rhFX 对细胞上清液进行 Ni-NTA 亲和层析纯化, 用不同浓度咪唑缓冲液洗脱收集, 浓缩后取 20 μL 样本与 5 μL 蛋白质上样缓冲液混合煮沸 5 min。SDS-PAGE 电泳条件是 130 V, 50 min。将分离胶部分置于考马斯亮蓝快速染液中染色 40 min。采用半干电转法将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 条件为 350 mA, 80 min。TBST 室温漂洗 30 s, 用无蛋白封闭液室温封闭 40 min。加小鼠抗人凝血因子 X 抗体 (1:5 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢振荡孵育过夜。TBST 快速振荡洗涤 10 min, 重复 3 次, 加入 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:5 000) 室温缓慢振荡孵育 1 h, TBST 快速振荡洗涤 10 min, 重复 3 次。结束后在成像仪下曝光显影。

1.2.4 质粒 pcDNA3.1-FX 转染 HEK293 细胞的条件优化 从 HEK293 细胞密度、质粒与转染试剂比例、转染天数等角度系统优化转染条件, Western blot 分析检测不同条件下 HEK293 细胞分泌 rhFX 蛋白表达水平。① HEK293 细胞密度的优化: 在 6 孔板中铺不同密度的 HEK293 细胞, 使其第 3 天时, 可以达到孔底面积的 60%、70%、80%、90%、100%, Western blot 观察 rhFX 蛋白表达情况。② 质粒 DNA 与转染试剂比例的优化: 设置 DNA (μg) 和 PEI (μL) 的用量比例为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5。Western blot 观察 rhFX 蛋白表达情况, 选取最佳转染质粒和 PEI 的用量比。③ 转染天数的优化: 连续 6 天同一时间在 T75 细胞培养瓶中铺相同数量的 HEK293 细胞, 细胞贴壁 24 h 后转染, 第 8 天同一时间分别取所有瓶的上清液做 Western blot 检测。使六瓶细胞分别对应第 6、5、4、3、2、1 天 rhFX 的蛋白表达量。三种优化条件阴性对照均选用 pcDNA3.1 空质粒转染。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液中的 rhFX 浓度 按照人凝血因子 X (F10) 酶联免疫吸附检测试剂盒说明书操作, 试剂盒中自带标准品绘制标准曲线, 阴性对照选用 pcDNA3.1 空质粒转染的细胞上清液。样本为 3 次转染后的 HEK293 细胞上清液; 取浓缩后样本 100 μL 加到酶标孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 80 min。加洗涤缓冲液洗涤 3 次, 拍干后加入 100 μL 生物素化抗体工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min。加洗涤缓冲液洗涤 3 次, 拍干后加入 100 μL HRP 酶工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min。加洗涤缓冲液洗涤 5 次, 拍干后加入 90 μL 四甲基联苯胺, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。加入 50 μL 终止液, 立即在波长 450 nm 处测定 OD 值。利用 prism 绘制标准曲线, 计算样品中 rhFX 的浓度。

1.2.6 rhFX 的凝血活性检测 参照中国药典 2020 版第四部通则中一期凝固法, 测定 rhFX 的促凝活性。取稀释后的 rhFX 50 μL , 加入 50 μL 乏 X 因子血浆, 置于半自动凝血分析仪

上 37 °C 孵育 3 min，加入提前预温好的凝血酶原时间^[10]试剂 100 μL，记录凝固时间。分别测定 3 次瞬时转染细胞上清液中 rhFX 样本凝固时间。阴性对照选用 pcDNA3.1 空质粒转染的细胞上清液。

1.2.7 发色底物法测定 rhFX 活性 为进一步检测 rhFX 的凝血活性，采用发色底物法构建筛选凝血因子 Xa (coagulation factor Xa, FXa) 抑制剂的方法。RVV 激活 rhFX 变为 FXa，FXa 催化发色底物 S2765 水解，释放对硝基苯胺 (p-Nitroaniline, pNA)，pNA 在 405 nm 处具有特征性吸收峰，其生成速率与 FXa 活性成正比；而依度沙班 (Edoxaban) 通过特异性抑制 FXa 活性，可剂量依赖性地降低 pNA 的生成速率。rhFX、RVV、S2765 用实验室自配缓冲液 (50 mol/L Tris、10 mol/L CaCl₂、150 mol/L NaCl) 稀释，在体系中终浓度分别为 2 nmol/L，0.31 U/mL，100 μmol/L。Edoxaban 从 1 μmol/L 起始，按梯度稀释法 3 倍稀释。在 384 孔板中，每孔首先加入 10 μL 不同浓度的 Edoxaban，空白组加入 10 μL DMSO。然后加入 30 μL 稀释后的 rhFX 和 RVV 混合液。最后加入 40 μL 稀释后的 S2765。37 °C 孵育 30 min，立即在波长 405 nm 处测定 OD 值。抑制率 = $\left(\frac{Ac-As}{Ac-As}\right) \times 100\%$ 。As: 实验孔吸光度 (加 rhFX、Edoxaban)；Ac: 对照孔吸光度 (加 rhFX，不加 Edoxaban)；Ab: 空白孔吸光度 (rhFX、Edoxaban 均不加)。利用 prism 绘制曲线，计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.2.8 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验进行统计分析，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

2.1.1 重组质粒 pcDNA3.1-FX 和 pcDNA3.1-EGFP-FX 构建情况 质粒 pcDNA3.1-FX 构建：将目的基因 FX 构建至载体 pcDNA3.1 (5 428 bp) 的 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切位点之间 (图 1A)。质粒 pcDNA3.1-EGFP-FX 构建：将目的基因 FX 构建至载体 pcDNA3.1-EGFP (6 173 bp) 的 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点之间 (图 1B)。

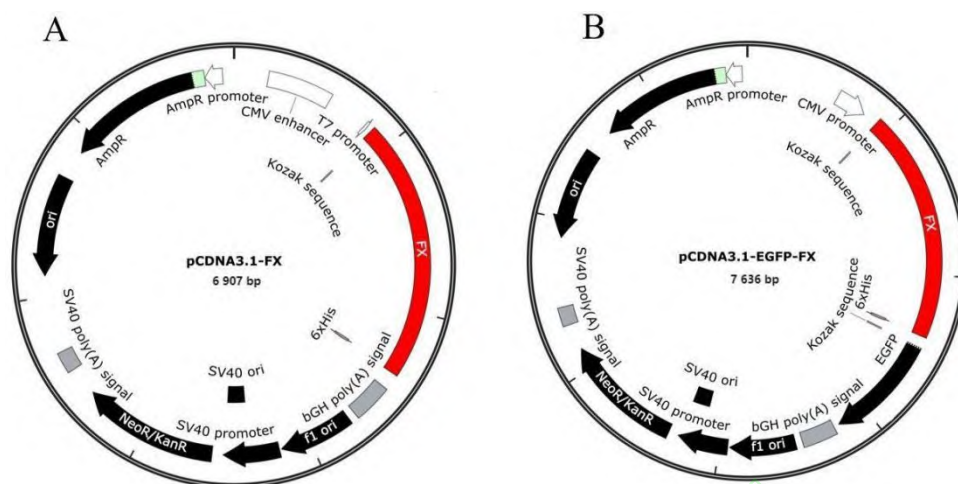


图1 重组质粒图谱

Fig. 1 Recombinant plasmid profile

A: Schematic diagram of pCDNA3.1-*FX* plasmid; B: Schematic diagram of pCDNA3.1-*FX*-EGFP plasmid.

2.1.2 阳性重组质粒菌落的筛选 将构建好的质粒转化至感受态细胞 DH5 α , 隔夜培养后, 挑取 5 个阳性菌落进行 PCR 验证, 经琼脂糖凝胶电泳分析, pCDNA3.1-*FX* (图 2A) 和 pCDNA3.1-EGFP-*FX* (图 2B) 的单个菌落均介于 1 200~2 000 bp 位置附近, 条带大小与目的蛋白一致。

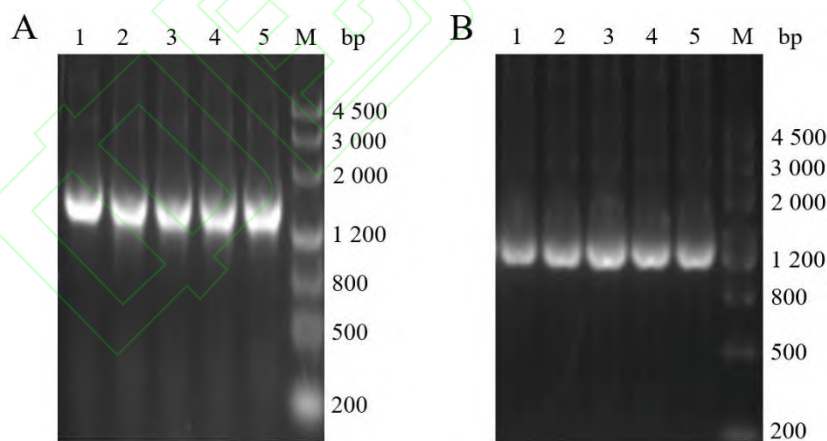


图2 菌落 PCR 产物验证

Fig. 2 Validation of Colony PCR product

A: PcDNA3.1-*FX* colony PCR target band; B: PcDNA3.1-EGFP-*FX* colony PCR target band; M: Marker; 1-5: PCR validation of 5 positive bacterial colonies.

2.1.3 重组质粒的鉴定 阳性菌落扩大培养后，pcDNA3.1-*FX* 质粒经琼脂糖凝胶电泳分析可见 6 133~8 023 bp 之间有目的条带；质粒经 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切后，电泳结果显示在 1 200~2 000 bp 之间有 *FX* 目的条带，在 4 500 bp 上方有酶切后的 pcDNA3.1 载体质粒片段，证明 pcDNA3.1-*FX* 构建成功（图 3A、图 3B）。pcDNA3.1-EGFP-*FX* 质粒经琼脂糖凝胶电泳分析可见 6 133~8 023 bp 之间有目的条带，用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切后，电泳结果显示在 1 200~2 000 bp 之间有 *FX* 目的条带，在 4 500 bp 上方有酶切后的 pcDNA3.1-EGFP 载体质粒片段，证明 pcDNA3.1-EGFP-*FX* 构建成功（图 3C、3D）。在此基础上，上述质粒经北京六合华太基因科技有限公司测序验证无误。

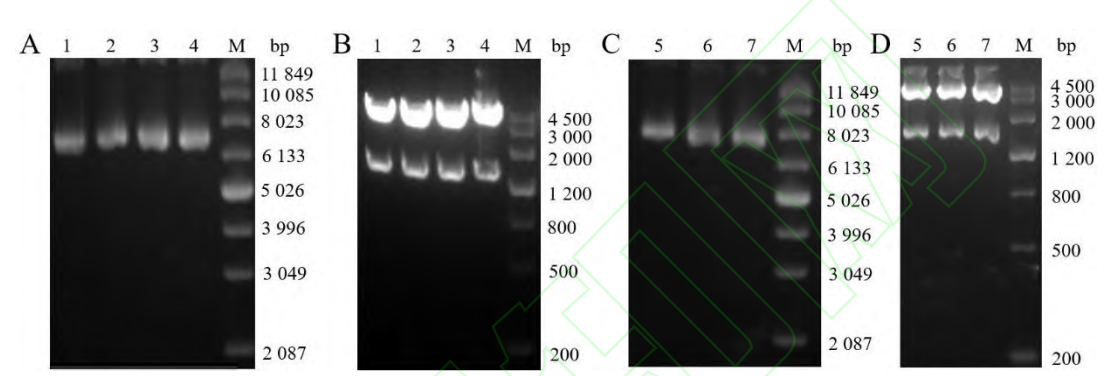


图 3 pcDNA3.1-*FX* 质粒和 pcDNA3.1-EGFP-*FX* 质粒酶切验证

Fig. 3 Enzyme digestion validation of pcDNA3.1-*FX* plasmid and pcDNA3.1-EGFP-*FX* plasmid

A: Validation diagram of pcDNA3.1-*FX* plasmid; B: Validation diagram of pcDNA3.1-*FX* plasmid digestion; C: Validation diagram of pcDNA3.1-EGFP-*FX* plasmid; D: Validation diagram of pcDNA3.1-EGFP-*FX* plasmid digestion; M: Marker; 1-4: Validation of different plasmids and enzyme digestion products of pcDNA3.1-*FX*; 5-7: Validation of different plasmids and enzyme digestion products of pcDNA3.1-*FX*-EGFP.

2.2 pcDNA3.1-EGFP-*FX* 质粒成功转染 HEK293 细胞 为验证真核蛋白表达系统的有效性，将 pcDNA3.1-EGFP-*FX* 质粒转染 HEK293 细胞，每隔 24 h 观察荧光。转染后的细胞观察到绿色荧光。第 1~3 天绿色荧光强度逐渐增强，第 4~6 天后荧光强度衰减。提示转染后第 3 天蛋白表达量最高（图 4）。

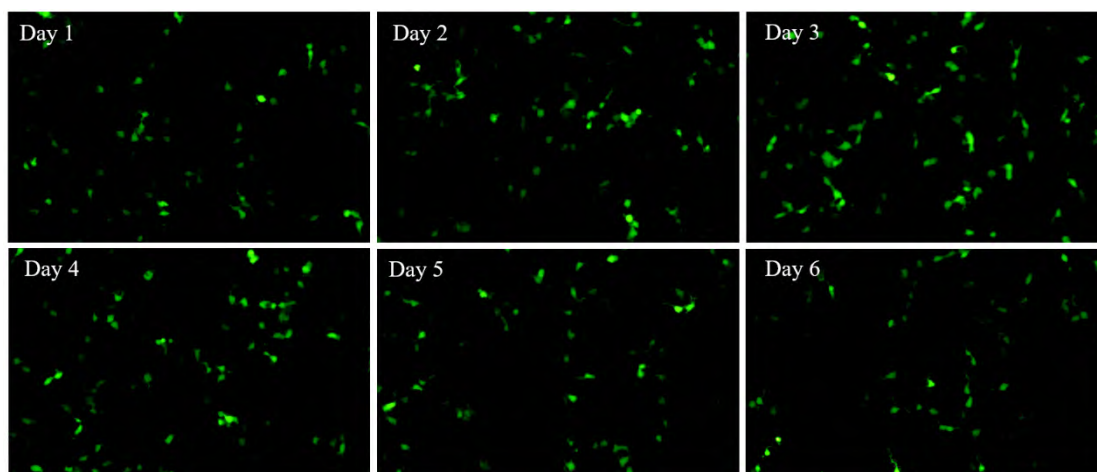


图 4 pcDNA3.1-EGFP-FX 转染 HEK293 细胞后不同天数的荧光强度 $\times 100$

Fig. 4 Fluorescence intensity of pcDNA3.1-EGFP-FX transfection at different days $\times 100$

2.3 rhFX 蛋白在 HEK293 细胞中成功表达 携带 His 标签的 rhFX 蛋白从镍柱上洗脱，随后通过 Western blot（图 5A）和 SDS-PAGE（图 5B）对收集的 Elution 洗脱液分析鉴定，结果显示在 56 ku 处均显示有特异性条带；使用 pcDNA3.1 空质粒转染的细胞上清液未观察到特异性条带，表明 rhFX 蛋白在 HEK293 细胞中成功表达。

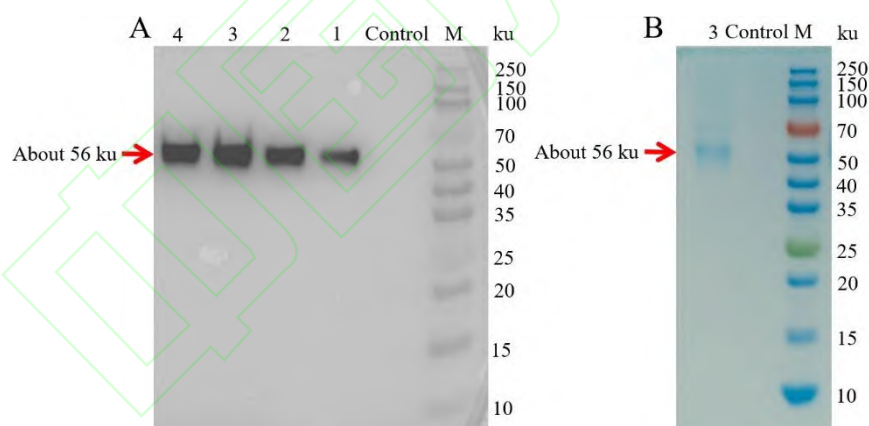


图 5 Western blot 和 SDS-PAGE 分析鉴定 rhFX 的表达

Fig. 5 Identification of rhFX expression by Western blot and SDS-PAGE analysis

A: Western blot analysis of rhFX; B: SDS-PAGE analysis and identification of rhFX; M: Marker; Control: Cell supernatant transfected with cDNA3.1 empty plasmid; 1-4: rhFX protein.

2.4 rhFX 表达条件优化 为了提高蛋白表达量和活性，对转染 HEK293 细胞条件进行优化。① 对转染天数进行优化，显示转染后第 1~3 天 rhFX 表达量逐渐增加，rhFX 蛋白表达量在第 3 天达到最高，第 4~6 天开始蛋白表达量逐渐下降（图 6A）。② 质粒 DNA 与

转染试剂比例优化结果显示质粒（μg）和 PEI（μL）的比例为 1:2，rhFX 蛋白表达量最高（图 6B）。③ 对细胞密度进行优化，结果显示当细胞密度为 80%时转染，rhFX 蛋白表达蛋白量最高（图 6C）。pcDNA3.1 空质粒转染的细胞上清液未观察到特异性条带。

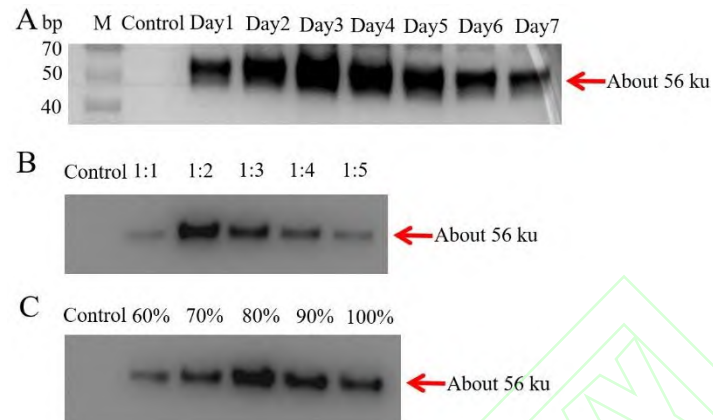


图 6 不同条件下 Western blot 鉴定 rhFX 的表达

Fig. 6 Western blot identification of rhFX expression under different conditions

A: Sampling on different days; B: Transfection at different ratios of plasmid and PEI; C: Transfection at different HEK293 densities; M: Marker; Control: Cell supernatant transfected with pcDNA3.1 empty plasmid.

2.5 细胞上清液中 rhFX 含量测定 收集细胞上清液，根据人凝血因子 X（F10）酶联免疫吸附检测试剂盒检测细胞上清液中的 rhFX 浓度，标准品绘制标准曲线为 $Y = 0.1382X + 0.1228$ ， $R^2 = 0.9896$ （图 7）。检测 3 次瞬时转染 HEK293 细胞的上清液，将待测样本 OD 值带入标准曲线，rhFX3 次瞬时转染浓度 5.00 ng/mL、4.80 ng/mL 和 5.20 ng/mL。

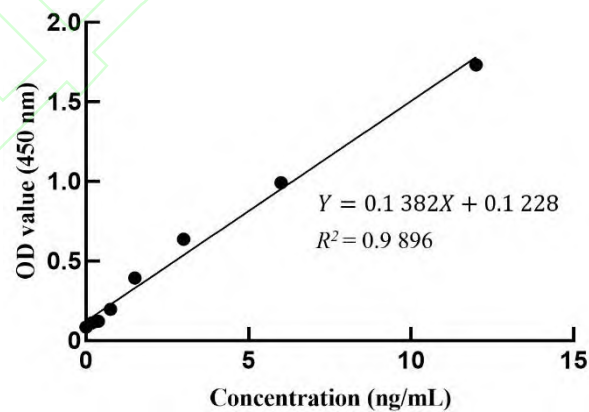


图 7 ELISA 检测上清液中 rhFX 浓度的标准曲线

Fig. 7 Standard curve for detecting rhFX concentration in supernatant by ELISA

2.6 rhFX 凝血活性测定 参照中国药典 2020 版第四部通则中的一期凝固法，取转染后上清液测定 rhFX 的促凝活性。结果显示，pcDNA3.1 空质粒转染的对照组细胞上清液凝固时间大于 120 s，3 次瞬时转染样本中 rhFX 的凝结时间分别是 61.1 s，60.9 s，60.2 s；每个样本重复 3 次，误差在 1 s 以内，（图 8）。结果显示实验组 rhFX 与对照组 pcDNA3.1 空载体转染收集的上清液相比，凝固时间缩短，差异有统计学意义（ $P < 0.0001$ ），提示 rhFX 蛋白促进了乏 X 血浆凝固。

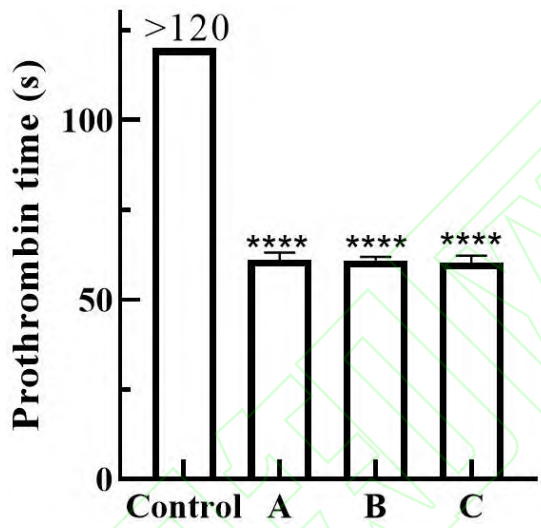


图 8 一期凝固法检测细胞上清液 rhFX 活性

Fig. 8 Detection of rhFX activity in cell supernatant by one-stage coagulation method

**** $P < 0.0001$ Compared with Control group.

2.7 发色底物法测定 rhFX 蛋白活性 采用发色底物法构建筛选 FXa 抑制剂的方法，结果如图 9 所示，Edoxaban 的 IC_{50} 为 1.449 nmol/L，与文献报道 0.78 nmol/L 的接近^[11]，证明纯化后的 rhFX 具有良好的凝血活性。

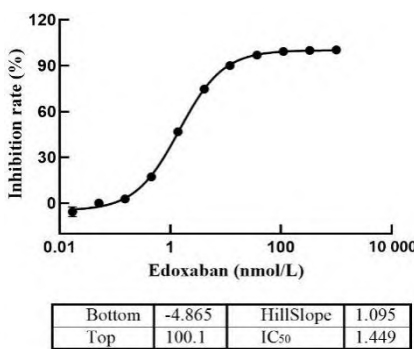


图 9 发色底物法对 rhFX 进行阳性药的验证

Fig. 9 Validation of rhFX as a positive drug using chromogenic substrate method

3 讨论

出血性疾病是一类涉及多个临床学科的重要疾病，治疗出血性疾病的第一代产品是血源凝血因子，但是存在生产原料难以获取的局限性，上游血浆采集量决定了药物的产量，且人源产品存在血源感染的可能性^[12]。重组技术的发展让凝血因子摆脱对血浆的依赖，产品供应不再受到血浆采集量的制约，避免了感染的可能性。先天性出血性障碍多由凝血级联反应通路上的分子基因突变引起。FX 是凝血级联反应中的关键因子，在止血过程中起着至关重要的作用^[13]。但由于凝血因子 X 缺乏症患者相对罕见，患者数量远低于血友病 A 和血友病 B，往往不被重视，导致相关研究和开发进展缓慢。目前，暂时没有 rhFX 药物上市，仅有血浆浓缩物 Coagadex 被 FDA 批准上市。研究者尝试在大肠埃希菌中表达 rhFX，最终蛋白以包涵体形式存在，不仅缺乏生物活性，还增加工艺开发难度和成本，阻碍了进一步的优化和开发^[14]；亦有学者利用 HEK293 细胞表达 rhFX，表达产量为 (1.317 ± 0.146) ng/mL^[15]，该产量仍有提升空间。然而，整体而言，国内外（特别是国内）对 rhFX 的开发研究甚少，因此迫切需要加强相关研究。

与中国仓鼠卵巢细胞类似，HEK293 细胞是生物技术药物重要的细胞系之一，也是基因工程和生物制药的重要工具，因此本研究采用 HEK293 细胞进行表达。为了提高 rhFX 的表达水平，在目的基因起始处添加 Kozak 序列以增强真核基因的翻译效率。Western blot 分析和 SDS-PAGE 分析显示，在上清液中检测到单一条带，分子量在 56 ku 左右，证明利用 HEK293 细胞成功表达出 rhFX。优化瞬时转染条件不仅可以提高转染效率和蛋白表达水平，还能减少细胞毒性、节省时间和成本，并增强实验的可重复性。本研究系统性地调整细胞密度、质粒 DNA 与转染试剂的比例和取样时间，结果显示第 1~3 天 rhFX 表达量逐渐增加，转染后第 3 天 rhFX 蛋白表达量最高，第 4~6 天开始蛋白表达量逐渐下降。当细胞密度为 80%、DNA 质粒 (μg) 和 PEI (μL) 的比例为 1:2 时转染，rhFX 蛋白表达量最高，成功确定了 rhFX 最优的表达条件。人凝血因子 X (F10) 酶联免疫吸附检测试剂盒检测 rhFX 浓度为 5.2 ng/mL，浓度比冯远征文章中 FX 野生型 (1.317 ± 0.146) ^[15] 大。参照中国药典 2020 版第四部通则中一期凝固法分别检测 rhFX 蛋白、对照组 pcDNA3.1 空载体上清液活性，结果显示对照组 pcDNA3.1 空载体转染收集的上清液相比，实验组 rhFX 与凝固时间缩短，具有显著差异 ($P < 0.0001$)，提示 rhFX 蛋白促进了乏 X 血浆凝固。为了进一步检测 rhFX 蛋白活性，确保在纯化后仍保持其生物活性，采用发色底物法构建筛选 FXa 抑制剂的方法，

Edoxaban 的 IC_{50} 为 1.449 nmol/L, 与文献报道的接近。证明纯化后的 rhFX 可以用于抑制剂的筛选, 并具备良好的生物活性。

综上所述, 成功利用 HEK293 细胞表达出 rhFX 蛋白, 证实当细胞密度为 80%、质粒 (μg) 和 PEI (μL) 的比例为 1:2 时转染的第 3 天, rhFX 蛋白表达量最高。成功构建筛选 FXa 抑制剂的方法, 证实 rhFX 具有良好的生物活性。未来将进一步提高 rhFX 蛋白表达量和活性, 利用 G418 加压筛选得到 rhFX 的单克隆细胞株, 驯化为悬浮细胞, 并探索更有利的纯化条件。

参考文献

- [1] Ichinose A, Osaki T, Souri M. Autoimmune coagulation factor X deficiency as a rare acquired hemorrhagic disorder: a literature review[J]. *Thromb Haemost*, 2022, 122(3): 320-8. doi: 10.1055/a-1496-8527.
- [2] Peyvandi F, Auerswald G, Austin S K, et al. Diagnosis, therapeutic advances, and key recommendations for the management of factor X deficiency[J]. *Blood Rev*, 2021, 50: 100833. doi: 10.1016/j.blre.2021.100833.
- [3] Escobar M A, Kavakli K. Plasma-derived human factor X concentrate for the treatment of patients with hereditary factor X deficiency[J]. *Haemophilia*, 2024, 30(1): 59-67. doi: 10.1111/hae.14894.
- [4] Santana J M, Brovman E Y. Prothrombin complex concentrates in cardiac surgery: where are we?[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2022, 35(1): 36-41. doi: 10.1097/ACO.0000000000001074.
- [5] Payne J, Batsuli G, Leavitt A D, et al. A review of the pharmacokinetics, efficacy and safety of high-purity factor X for the prophylactic treatment of hereditary factor X deficiency[J]. *Haemophilia*, 2022, 28(4): 523-31. doi: 10.1111/hae.14570.
- [6] 李 敏, 吴日伟. 凝血因子药物市场分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(5): 133-9. doi: 10.13523/j.cb.20170517.
- [6] Li M, Wu R W. The analysis of coagulation factors market[J]. *China Biotechnol*, 2017, 37(5): 133-9. doi: 10.13523/j.cb.20170517.
- [7] Xue F, Zhao X, Sun J, et al. Pharmacokinetic, efficacy and safety evaluation of B-domain-deleted recombinant FVIII (SCT800) for prophylactic treatment in adolescent and adult patients with severe haemophilia A[J]. *Haemophilia*, 2021, 27(5): 814-22. doi: 10.1111/hae.14350.
- [8] Shapiro A D, Chambost H, Ozelo M C, et al. Recombinant factor IX Fc for major surgery in hemophilia B: factor IX plasma activity levels and effective hemostasis[J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2023, 7(6): 102169. doi: 10.1016/j.rpth.2023.102169.
- [9] 李 敏. 中国血液制品行业分析[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(9): 119-25. doi: 10.13523/j.cb.20160915.
- [9] Li M. The analysis of Chinese blood biologicals industry[J]. *China Biotechnol*, 2016, 36(9): 119-25. doi: 10.13523/j.cb.20160915.
- [10] 朱跃跃, 卞茂红, 谢如锋. 红细胞微粒的促凝血性质与小鼠急性肺损伤的关系[J].

安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 89-94. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.019.

- [10] Zhu Y Y, Bian M H, Xie R F. Relationship between procoagulant properties of red blood cell-derived microparticles and acute lung injury in mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(1): 89-94. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.01.019.
- [11] Siddiqui F, Hoppensteadt D, Jeske W, et al. Factor xa inhibitory profile of apixaban, betrixaban, edoxaban, and rivaroxaban does not fully reflect their biologic spectrum[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2019, 25: 1076029619847524. doi: 10.1177/1076029619847524.
- [12] Valentino L A, Kaczmarek R, Pierce G F, et al. Hemophilia gene therapy: first, do no harm[J]. *J Thromb Haemost*, 2023, 21(9): 2354-61. doi: 10.1016/j.jtha.2023.06.016.
- [13] Camire R M. Blood coagulation factor X: molecular biology, inherited disease, and engineered therapeutics[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2021, 52(2): 383-90. doi: 10.1007/s11239-021-02456-w.
- [14] 李心宇. 抗 O 型口蹄疫病毒重组蛋白疫苗的研制及凝血因子 X 的构建和表达[D]. 长春: 吉林大学, 2004.
- [14] Li X Y. The development of recombinant protein vaccine against type "O" of foot-and-mouth disease virus and the construction and expression of coagulation factor X. Changchun: Jilin University, 2004.
- [15] Feng Y, Ma J, Tang L V, et al. Characterization of a missense mutation in the catalytic domain and a splicing mutation of coagulation factor X compound heterozygous in a Chinese pedigree[J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(10): 1521. doi: 10.3390/genes12101521.