

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 *F10* 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 *F10* 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 与聚乙烯亚胺 (PEI) 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, 与文献报导的 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 **文章编号** 1000-1492(2025)09-1583-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.003

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]。治疗手段包括使用凝血因子 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药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 (北京宝日生物技术有限公司, 货号: 1615、1605、

2025-05-02 接收

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: zhangzhifei7208@163.com;

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

* 对本文具有同等贡献

1635); 快速纯化凝胶 DNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物技术股份有限公司,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(上海碧云天生物技术股份有限公司,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 FX(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); 蝰蛇蛇毒(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 *F10* 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 *F10* 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*H I 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'-CCCAAGCTTGCACCATGGGAAG-ACCCCTGCATCTGGT-3';下游: *FX-Bam*H I-R 为 5'-CGCGGATCCTCAATGATGGTGGTGGTGGTGGT-CAGGG-3'。*F10* 片段和 pcDNA3.1 载体分别用 *Hind* III 酶和 *Bam*H I 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 °C、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 *F10* 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-*F10* 质粒构建过程。

1.2.2 pcDNA3.1-EGFP-*F10* 和 pcDNA3.1-*F10* 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 °C、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 离心 3 min。以 HEK293 细胞作为转染细胞系,将 pcDNA3.1-*FX*、pcDNA3.1-EGFP-*F10* 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-*F10* 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 μ L 样本与 5 μ L 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 FX 抗体(1:5 000)4 °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 d 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 6 瓶细胞分别对应第 6、5、4、3、2、1 天 rhFX 的蛋白表达量。3 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 FX(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 $^{\circ}\text{C}$ 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 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 CaCl_2 、150 mol/L NaCl) 稀释, 在体系中终浓度分别为 2 nmol/L、0.31 U/mL、100 $\mu\text{mol/L}$ 。Edoxaban 从 1 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 立即在波长 405 nm 处测定吸光度值。抑制率 = $(\frac{Ac - As}{Ac - As}) \times 100\%$ 。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, IC_{50})。

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 *F10* 构建至载体 pcDNA3.1 (5 428 bp) 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点之间 (图 1A)。质粒 pcDNA3.1-EGFP-FX 构建: 将目的基因 *F10* 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)。

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。

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*H 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 载体质粒片段, 证明 pcDNA3.1-FX 构建成功 (图 3A、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大基因

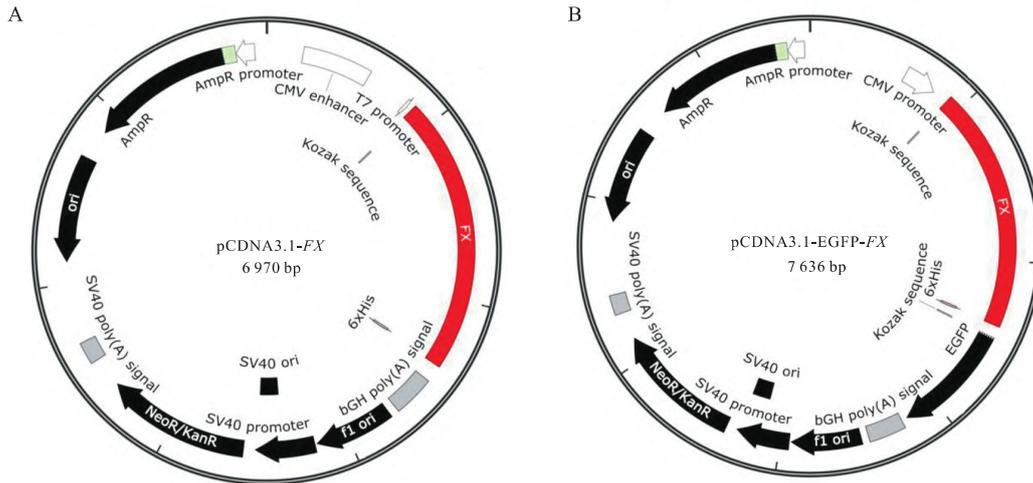


图 1 重组质粒图谱

Fig. 1 Recombinant plasmid profile

A: Schematic diagram of pcDNA3.1-FX plasmid; B: Schematic diagram of pcDNA3.1-FX-EGFP plasmid.

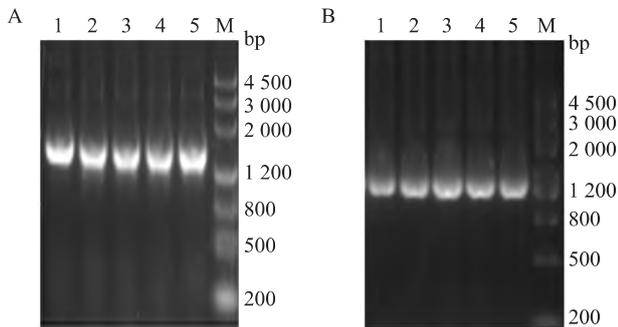


图 2 菌落 PCR 产物验证

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.

科技有限公司测序验证无误。

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)。

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

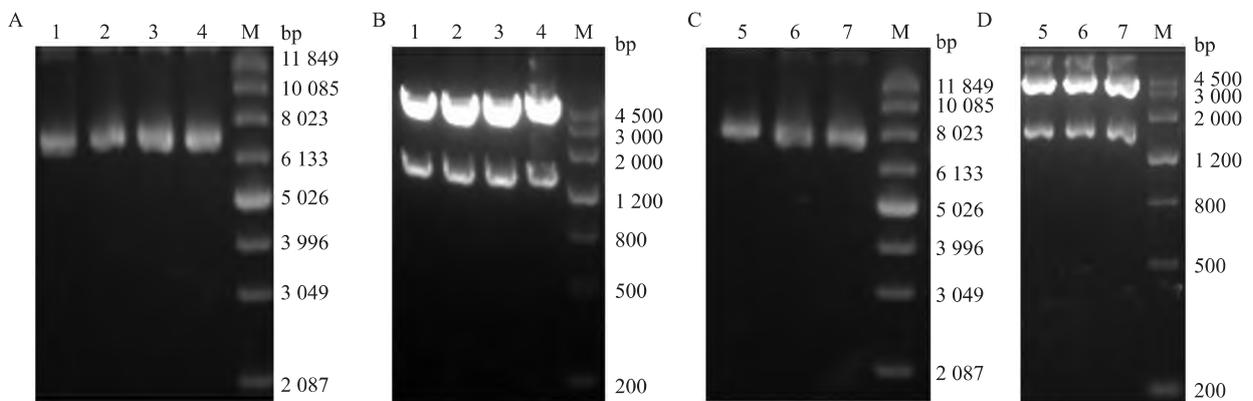


图 3 pcDNA3.1-FX 质粒和 pcDNA3.1-EGFP-FX 质粒酶切验证

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.

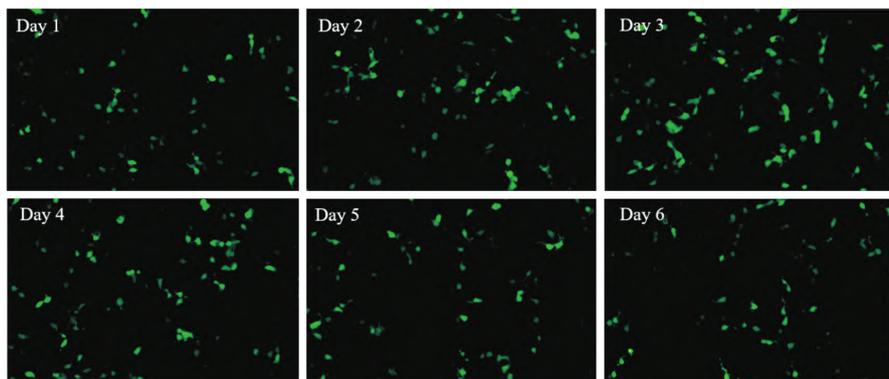


图4 pcDNA3.1-EGFP-FX 转染 HEK293 细胞后不同天数的荧光强度 ×100

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

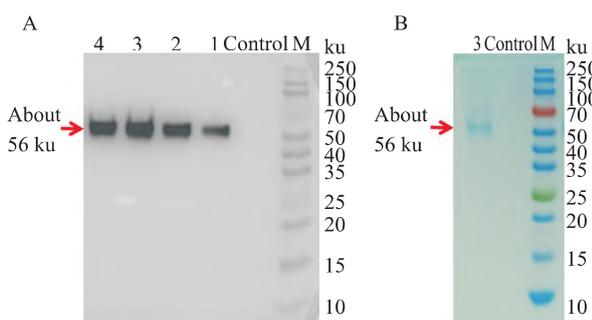


图5 Western blot 和 SDS-PAGE 分析鉴定 rhFX 的表达

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.

HEK293 细胞中成功表达。

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 4~7 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。

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 $Y = 0.138 2X + 0.122 8$, $R^2 = 0.989 6$ (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, rhFX 3 次瞬时

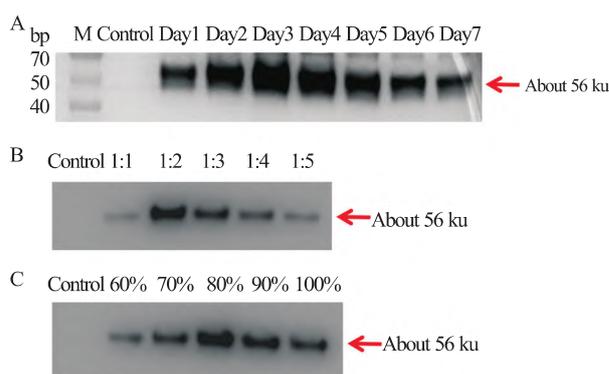


图6 不同条件下 Western blot 鉴定 rhFX 的表达

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.

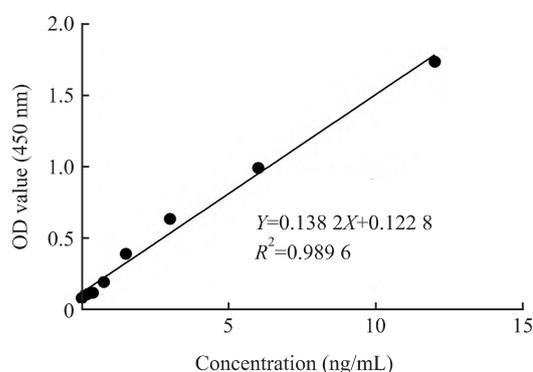


图7 ELISA 检测上清液中 rhFX 浓度的标准曲线

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

转染浓度 5.00 ng/mL、4.80 ng/mL 和 5.20 ng/mL。

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。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 ($t = 49.79, 93.04, 49.32$, 均 $P < 0.0001$), 提示 rhFX 蛋白促进了乏 X 血浆凝固 (图 8)。

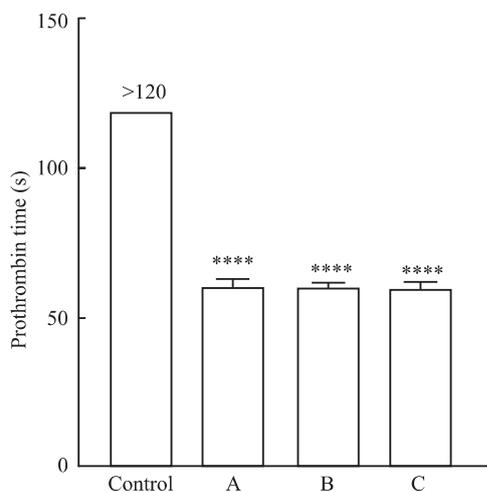
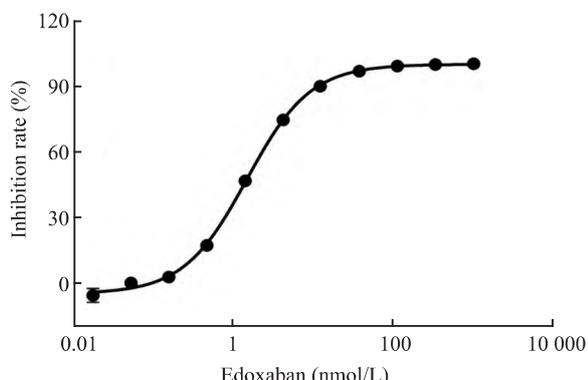


图 8 一期凝固法检测细胞上清液 rhFX 活性

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

A, B, and C represent the coagulation times of rhFX in the three transient transfection sample; **** $P < 0.0001$ vs 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, 证明纯化后的



| | | | |
|--------|--------|-----------|-------|
| Bottom | -4.865 | HillSlope | 1.095 |
| Top | 100.1 | IC_{50} | 1.449 |

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

rhFX 具有良好的凝血活性。

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^[11]。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^[12]。但由于 FX 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^[13]; 亦有学者利用 HEK293 细胞表达 rhFX, 表达产量为 (1.317 ± 0.146) ng/mL^[14], 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 (μ g) 和 PEI (μ L) 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 FX (F10) 酶联免疫吸附检测试剂盒检测 rhFX 浓度为 5.20 ng/mL, 浓度比冯远征文章中 FX 野生型 (1.317 ± 0.146) ^[14] 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 的凝固时间缩短,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^[15]报道的接近。证明纯化后的 rh-FX 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 rh-FX 蛋白表达量和活性,利用 G418 加压筛选得到 rh-FX 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, Soury 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] 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.
- [12] 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.
- [13] 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. doi: 10.7666/d.Y966945.
- [13] 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. doi: 10.7666/d.Y966945.
- [14] 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.
- [15] Siddiqui F, Hoppens 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 Haemost*, 2019, 25: 1076029619847524. doi: 10.1177/1076029619847524.

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

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

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

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

Peking Union Medical College, Beijing 100050)

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 *F10* 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 *F10* 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* rhFX was successfully expressed in the supernatant of HEK293 cells. rhFX was successfully expressed in the supernatant of HEK293 cells. The highest expression level of rhFX was achieved on the third day after transfection when the cell density was 80% and the ratio of plasmid DNA to polyethyleneimine (PEI) transfection reagent was 1 : 2. 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