

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VII稳定转染细胞株的构建及鉴定
作者： 李肖肖，陈佳彬，刘佳骏，张志斐，邹森，朱丽华，杨兆勇
收稿日期： 2025-11-07
网络首发日期： 2025-12-18
引用格式： 李肖肖，陈佳彬，刘佳骏，张志斐，邹森，朱丽华，杨兆勇. 重组人凝血因子VII稳定转染细胞株的构建及鉴定[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251217.1831.008>



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、外文字符、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VII稳定转染细胞株的构建及鉴定

李肖肖¹, 陈佳彬¹, 刘佳骏¹, 张志斐¹, 邹森², 朱丽华¹, 杨兆勇²

(¹华北理工大学, 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 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 构建稳定表达重组人凝血因子VII (rhFVII) 的单克隆人胚胎肾 293 细胞株 (HEK293), 评估其 rhFVII表达量及促凝血生物活性。方法 重组质粒 pcDNA3.1-EGFP-FVII 转染 HEK293 细胞, 验证转染系统的有效性。重组质粒 pcDNA3.1-FVII转染 HEK293 细胞, 遗传霉素 (G418) 筛选单克隆稳定转染细胞株, 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 鉴定 FVII 基因的转录, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 检测单克隆稳定转染细胞株上清液中的 rhFVII表达水平。酶联免疫吸附 (ELISA) 实验测定 rhFVII浓度, 人凝血因子 VII效价法测定 rhFVII的促凝血活性。结果 转染 pcDNA3.1-EGFP-FVII的 HEK293 细胞呈现绿色荧光, pcDNA3.1-FVII瞬时转染 HEK293 细胞后成功表达 rhFVII。筛选得到单克隆稳定转染细胞株, FVII基因整合至单克隆稳定转染细胞株基因组, 细胞活力良好, 细胞上清液纯化后获得 rhFVII单一条带。rhFVII表达量最高为 (1.27±0.09) mg/L, 促凝血活性最高为 (380.29±13.80) %。结论 筛选获得的单克隆 HEK293 细胞株, 能够高效、稳定表达具备优良促凝血生物活性的 rhFVII蛋白, 为该类药物的研发奠定基础。

关键词 重组人凝血因子 VII; 稳定表达; HEK293 细胞; 单克隆稳定转染细胞株; 血友病

中图分类号 R 554

文献标志码 A

Construction and characterization of recombinant human coagulation factor VII stable transfected cell lines

Li Xiaoxiao¹, Chen Jiabin¹, Liu Jiajun¹, Zhang Zhifei¹, Zou Sen², Zhu Lihua¹, Yang Zhaoyong²

(¹North China University of Science and Technology, Hebei Key Laboratory of Basic Medicine for Chronic Diseases, Tangshan 063000; ²Institute of Pharmaceutical Biotechnology,

2025-11-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82301185、82373767); 河北省自然科学基金项目(编号: H2022209048)

作者简介: 李肖肖, 女, 硕士研究生;

邹森, 男, 博士, 助理研究员, 通信作者, E-mail: zousen@hotmail.com;

朱丽华, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhulihua1972@163.com

Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract Objective To construct a stable monoclonal human embryonic kidney 293 (HEK293) cell line expressing recombinant human coagulation factor VII (rhFVII) and evaluate the expression level and procoagulant bioactivity of rhFVII. **Methods** The plasmid pCDNA3.1-EGFP-FVII was transfected into HEK293 cells to verify the effectiveness of the transfection system. The plasmid pCDNA3.1-FVII was transfected into HEK293 cells, and monoclonal stable transfected cell lines were selected using geneticin (G418). The transcription of the FVII gene was identified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression level of rhFVII in the supernatant of the monoclonal stable transfected cell line was detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot. The concentration of rhFVII was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the procoagulant activity of rhFVII was measured by human coagulation factor VII potency assay.

Results HEK293 cells transfected with pcDNA3.1-EGFP-FVII showed green fluorescence, indicating that rhFVII was successfully expressed in the supernatant of HEK293 cells after transient transfection with pcDNA3.1-FVII. The monoclonal stable transfected cell line was obtained by G418 screening. RT-PCR identified that the FVII gene was integrated into the genome of the monoclonal stable transfected cell line. The cell viability was good as detected by Cell Counting Kit-8, and a single band of rhFVII was obtained by purification of the cell supernatant. The highest rhFVII expression was (1.27 ± 0.09) mg/L, and the highest procoagulant activity was $(380.29\pm13.80)\%$. **Conclusion** The monoclonal HEK293 cell lines which can express rhFVII protein efficiently and stably with excellent procoagulant bioactivity is successfully screened, laying a foundation for the development of drugs.

Key words recombinant human coagulation factor VII; stable expression; HEK293 cells; monoclonal stable transfected cell lines; hemophilia

Fund Programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82301185, 82373767); Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2022209048)

Corresponding authors Zou Sen, E-mail: zousen@hotmail.com; Zhu Lihua, E-mail: zhulihua1972@163.com

血友病是一种 X 染色体连锁隐性遗传出血性疾病，部分患者因产生凝血因子VIII

(coagulation factor VIII) 和凝血因子IX (coagulation factor IX) 抑制性抗体导致常规治疗失效, 而凝血因子VII (coagulation factor VII) 通过旁路机制为其提供了重要替代治疗选择^[1]。FVII是一种维生素 K 依赖的单链糖蛋白, 在人体内以酶原形式存在。药用 FVII的来源主要包括血源性 FVII和体外表达的重组人凝血因子VII(recombinant human coagulation factor VII, rhFVII) ; 二者功能相似, 仅在 γ 羧基化和 N 糖基化方面存在微小差异^[2]。当前, 市售 rhFVII 产品均为国外研究团队开发, 包括 NovoSeven [叙利亚幼地鼠肾细胞 (baby hamster Syrian kidney, BHK) 表达]^[3]、Sevenfact (转基因兔乳汁中提取)^[4]和 AryoSeven (NovoSeven 仿制药)^[5]等。rhFVII生产过程复杂、产量低, 我国研究团队对 rhFVII的研究主要停留在科研及临床试验阶段, 尚无国产 rhFVII产品上市。人类来源的 HEK293 细胞因其生产的药用蛋白结构更接近天然人类蛋白而具有显著优势^[6], 但在 rhFVII表达领域仍面临产量不足的技术瓶颈。该研究旨在构建有效的 rhFVII表达载体, 筛选获得稳定表达 rhFVII的单克隆 HEK293 细胞株, 并评估 rhFVII的表达量及促凝血活性, 为 rhFVII的药物研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒菌株及细胞

pcDNA3.1-FVII质粒和 pcDNA3.1-EGFP-FVII质粒均由医学科学院医药生物技术研究所提供, HEK293 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂与仪器

MEM 基础细胞培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 货号: PM150411) ; 0.25% 胰蛋白酶和胎牛血清 (美国 Gibco, 货号: A5670801、25200-056) ; PEI 转染试剂 (美国 MCE, 货号: HY-K2014) ; PVDF 膜和 G418 (遗传霉素或新霉素, Geneticin) (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: FFP32、ST081) ; 小鼠抗 hFVII单克隆抗体 (美国 R&D 公司, 货号 MAB233) ; 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (上海生工生命科学有限公司, 货号: D110087) ; Human F7 ELISA Kit 试剂盒 (武汉菲恩生物科技有限公司, 货号: EH3030) ; One Step SuperRT-PCR Mix Kit 和总 RNA 提取试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: T2240、R1200) ; 凝血酶原时间测定试剂盒 (武汉中太生物技术有限公司, 货号: R1200) ; 凝血分析仪 (武汉景川诊断技术股份有限公司, BCS-6100) ; 标准血浆 (上海船夫生物技术有限公司, 货号: BMS10) 。乏VII因子血浆 (上海船夫生物技术有限公司, 货号: BMC07) 。免疫耗竭法制备: 因子VII特异性单克隆抗体选择性吸附并去除正常人血浆中的VII因子。该

类血浆缺乏 FVII活性，其他凝血因子活性不变）。

1.2 方法

1.2.1 HEK293 细胞培养及 pcDNA3.1-EGFP-FVII转染

配制 MEM 完全培养基，MEM 基础培养基中加入 10% 胎牛血清。HEK293 细胞置于 MEM 完全培养基中，在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中贴壁培养。细胞融合度达 90% 时，使用 0.25% 胰酶消化 1 min，完全培养基终止消化，1 200 r/min 离心 3 min。完全培养基重悬 HEK293 细胞，调整细胞密度为 10⁶ cells/mL，接种于细胞培养瓶。HEK293 细胞的对数生长期（一般接种后 48 h）进行转染，转染前 2 h 将培养基更换为 MEM 基础培养基；pcDNA3.1-EGFP-FVII 以脂质体转染方式转染细胞；转染后第 1~6 天每日观察细胞荧光强度。以 pcDNA3.1-EGFP 空载体转染 HEK293 细胞作为阴性对照。

1.2.2 pcDNA3.1-FVII瞬时转染及单克隆稳定转染细胞株筛选

MEM 完全培养基重悬 HEK293 细胞，以 10⁴ cells/mL 的密度将 HEK293 细胞接种在 24 孔板中。24 h 后，更换含有不同遗传霉素（Geneticin, G418）浓度梯度（0、100、200、300、400、500、600、700、800 μg/mL）的完全培养基，每个梯度重复 3 个复孔；将 10 d 左右能够杀死所有 HEK293 细胞的最小 G418 浓度作为最适宜的筛选浓度。

HEK293 细胞融合度为 70% 时，按照 pcDNA3.1-FVII 与 PEI 转染试剂质量比为 1:2 的比例制备脂质体混合物；转染 HEK293 细胞。转染 48 h 后收集细胞上清液，Western blot 检测 rhFVII 的表达情况；阴性对照选用 pcDNA3.1 空质粒。瞬时转染 48 h 后，使用含 G418（300 μg/mL）的 MEM 完全培养基筛选抗性细胞集落；2~3 d 更换新鲜培养基。有限稀释法将抗性细胞集落稀释并转移至 96 孔板中（保证每个孔中的细胞数目不超过 1 个），含有 G418 的完全培养基筛选单克隆稳定转染细胞株。筛选出 9 株单克隆稳定转染细胞株继续在含有 G418 的 MEM 完全培养基中扩大培养，分别命名为 FVII-M1 至 FVII-M9。

1.2.3 单克隆稳定转染细胞株的鉴定及活力检测

Primer 5.0 软件设计引物并由北京六合华大基因科技有限公司合成，上游引物 P1 为 5’TGCTGCTGTTGGTGAAT3’；下游引物 P2 为 5’TAAGGCGATGTCGTGAT3’。按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取单克隆稳定转染细胞株的总 RNA。逆转录 One Step SuperRT-PCR Mix Kit 试剂盒检测扩增 FVII 基因。单克隆稳定转染细胞株活力检测：细胞接种于 96 孔板（1000 个/孔），分别在细胞生长至 24、48、72、96 h 时加入 10 μL CCK8 溶液，在 450 nm 处检测吸光度（absorbance, A）并按照说明书计算细胞活力；独立重复 3 次实验。细胞活力（%）

$$= \left(\frac{A_s - A_b}{A_c - A_b} \right) \times 100\%$$

。As：实验孔吸光度；Ac：对照孔吸光度；Ab：空白孔吸光度。

1.2.4 rhFVII蛋白纯化

HisTag Ni-NTA 树脂预先用低浓度咪唑缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 8.0) 平衡。单克隆稳定转染细胞株上清用低浓度咪唑缓冲液和 1% 的蛋白酶抑制剂重悬, 摆床上以 75 r/min 的速度孵育 2 h, 使目的蛋白与镍柱填料充分结合。将混合液转移至亲和层析空柱中, 待液体完全流出后, 沿管壁缓慢加入中浓度咪唑缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 8.0), 洗去非特异性结合蛋白。最后, 高浓度咪唑缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 8.0) 洗脱目的蛋白, 即为纯化后的 rhFVII。为验证纯化效果, 将 rhFVII 样本与 5x loading buffer 按体积比 4:1 混合, 煮沸 5 min 后进行 12.5% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)；SDS-PAGE 电泳结束后设置电转仪为恒流 350 mA、80 min 快速转膜, 进行 Western blot 检测。Western blot 结束后在 PVDF 膜上加入发光液并立即显影。

1.2.5 rhFVII浓度检测

参照 Human FVII ELISA Kit 说明书操作, 试剂盒自带标准品绘制标准曲线。取 100 μL 纯化后的 rhFVII 样本加到酶标孔中, 波长 450 nm 处测定 A 值并根据标准曲线计算 rhFVII 的浓度。以转染 pcDNA3.1 空质粒的 HEK293 细胞上清为阴性对照。重复独立制备 3 次单克隆稳定转染细胞株的 rhFVII 样本检测浓度, 数据呈正态性分布并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.2.6 rhFVII凝血生物活性检测

参照中国药典中测定 FVII 凝血生物活性的方法 (即人凝血因子VII效价法), 以乏VII因子血浆作为基质血浆, 检测 rhFVII 样本的凝血活性^[7]。将标准血浆用咪唑稀释液分别稀释 5、10、20、40 和 80 倍, 对应的凝血活性分别为 200%、100%、50%、25% 和 12.5%。取稀释后的标准血浆 50 μL, 分别加入 50 μL 乏VII因子血浆, 置于凝血分析仪上保温 3 min。将 100 μL 凝血活酶溶液 (即 PT 试剂, 含组织因子和 Ca²⁺) 加入不同稀释梯度的标准血浆中, 立即开始计时。以百分比活性的对数为横坐标, 以血浆凝固时间的对数为纵坐标绘制标准曲线。相同步骤测定样本中 rhFVII 的凝血时间, 依据标准曲线计算 rhFVII 的百分比活性。重复独立制备 3 次单克隆稳定转染细胞株的 rhFVII 纯化样本检测促凝血时间, 数据呈正态性分布并以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.2.7 凝血活酶激活实验

为探究室温下凝血活酶溶液（即 PT 试剂，含组织因子和 Ca^{2+} ）对 rhFVII的激活作用，参照说明书检测凝血活酶溶液与 rhFVII的反应比例及反应时间对 rhFVII活化程度的影响。① rhFVII样本与凝血活酶溶液分别按体积比为 1:4、1:2、1:1、2:1 和 4:1 的比例混合；室温静置 6 h 后，Western blot 检测 rhFVII的活化情况（以小鼠抗 His 标签的单克隆抗体为一抗）。② rhFVII样本与凝血活酶溶液按体积比为 1:1 混合，室温下反应 0、2、6、12、18 和 24 h 后，Western blot 检测 rhFVII的活化情况。

1.3 统计学处理

GraphPad Prism 9.5.0 进行绘图和统计学分析。正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析（One-way ANOVA）比较多组间均数的差异，Dunnett's 多重检验进一步检测各实验组与对照组之间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-EGFP-FVII质粒转染 HEK293 细胞

为验证真核蛋白表达系统的有效性，将 pcDNA3.1-EGFP-FVII质粒瞬时转染 HEK293 细胞。24 h 后，HEK293 细胞开始呈现绿色荧光；第 1~4 天荧光强度逐渐增强，第 4~6 天后荧光强度衰减（图 1）。

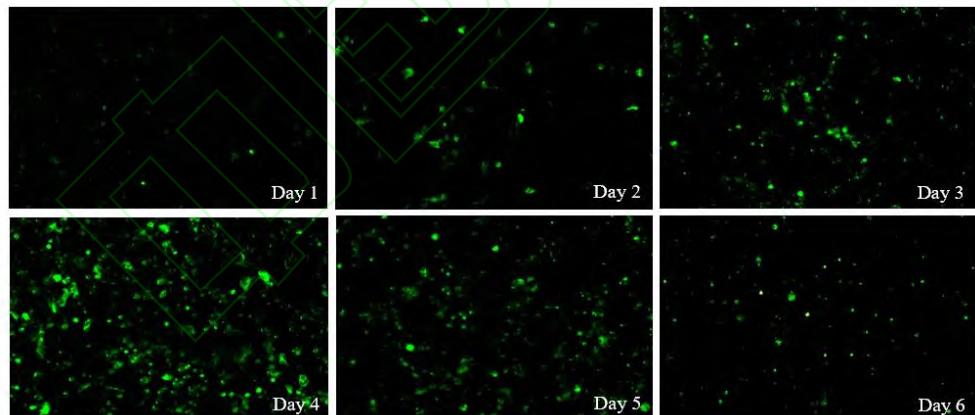


图 1 pcDNA3.1-EGFP-FVII瞬时转染 HEK293 细胞 $\times 100$

Fig.1 Transient transfection of pcDNA3.1-EGFP-FVII to HEK293 cells $\times 100$

2.2 瞬时转染细胞 rhFVII的表达量及促凝血活性

pcDNA3.1-FVII质粒转染 HEK293 细胞 48 h，细胞上清经 Western blot 检测显示特异性条带，分子量约 50 ku（图 2A），与预期一致。重复独立制备 3 次 rhFVII样本，测定 rhFVII 的浓度见图 2B。将 rhFVII样品倍比稀释，血浆凝固时间随稀释倍数增加而增加（图 2C）。

以百分比活性的对数为横坐标，血浆凝固时间的对数为纵坐标绘制标准曲线（图 2D）；瞬时转染上清液中 rhFVII 的促凝血活性分别为 144.31%、188.33% 和 174.02%。

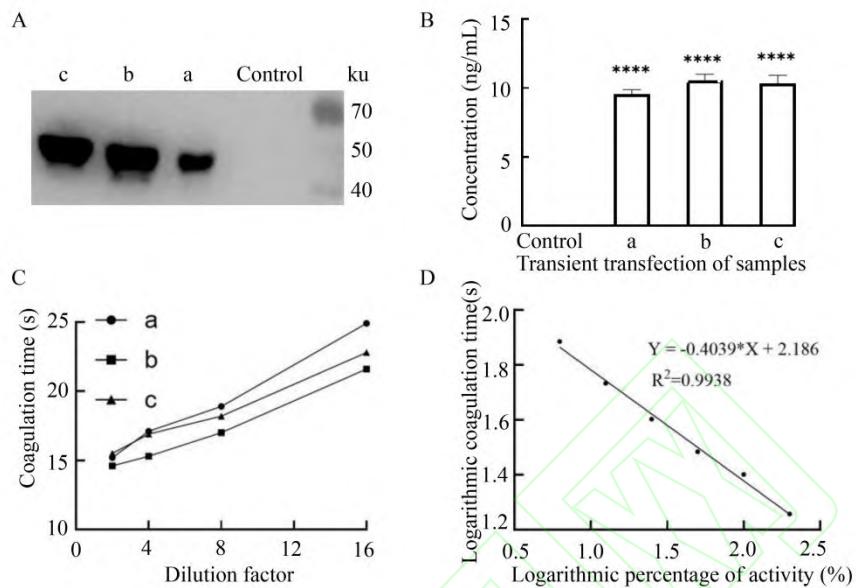


图 2 瞬时转染 rhFVII 的浓度和促凝血活性

Fig.2 Concentration and procoagulant activity of transiently transfected rhFVII.

注：A: Western blot identification of rhFVII in HEK293 cells transiently transfected with pcDNA3.1-FVII recombinant plasmid; B: Concentrations of rhFVII in different transiently transfected samples. Each rhFVII sample was transiently transfected for 3 repeated trials; C: Plasma coagulation time of different transiently transfected samples diluted at different multiplicities; D: Standard curve for procoagulant activity of normal reference plasma; a, b and c: rhFVII sample; **** $P < 0.0001$ vs Control group.

2.3 单克隆稳定转染细胞株的筛选及活力鉴定

G418 (300 μ g/mL) 筛选抗性 HEK293 细胞，获得 9 株单克隆稳定转染细胞株（命名为 FVII-M1 至 FVII-M9）。提取总 RNA 后，RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶分离，目的片段在 1 300 bp 附近（图 3A），提示 FVII 基因整合至单克隆稳定转染细胞株的基因组。检测 FVII-M1 至 FVII-M5 的细胞活力，单克隆稳定转染细胞株在培养 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后的细胞活力值，与正常 HEK293 细胞相比差异无统计学意义（图 3B）。

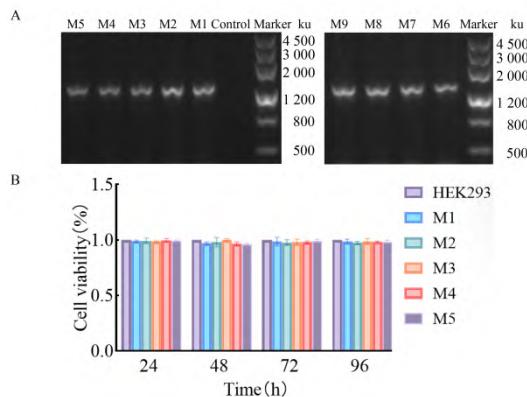


图 3 单克隆稳定转染细胞株的筛选及鉴定

Fig.3 Screening and characterization of monoclonal stable transfected cell lines

注: A: RT-PCR identification of FVII gene in the genome of monoclonal stable transfected cell lines; M1-M9: monoclonal stable transfected cell line; Marker: DNA Marker III; B: Cell viability of five monoclonal stable transfected cell lines detected by CCK8 assay.

2.4 单克隆稳定转染细胞株表达 rhFVII的浓度

收集单克隆稳定转染细胞株 (FVII-M1/M2/M3/M4/M5) 上清经镍柱纯化。SDS-PAGE 和 Western blot 结果显示, rhFVII 均为特异性条带, 分子量约为 50 ku (图 4A、4B)。重复独立制备 3 次单克隆稳定转染细胞株的 rhFVII 样本, 测定五株单克隆稳定转染细胞产生的 rhFVII 浓度见图 4C、4D。

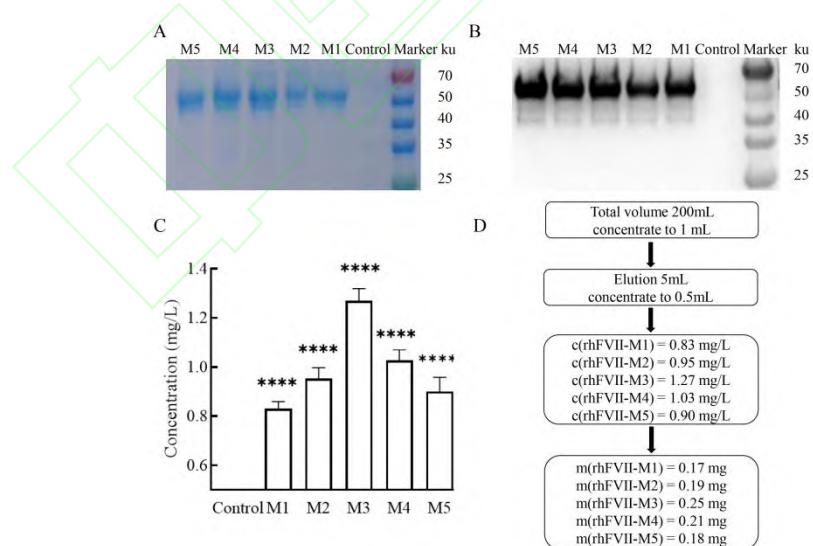


图 4 rhFVII的浓度测定

Fig.4 Measurement of rhFVII concentration

A: SDS-PAGE analysis of rhFVII secreted in different monoclonal stable transfected cell

lines; B: Western blot analysis of rhFVII secreted in different monoclonal stable transfected cell lines; C: Concentrations of rhFVII secreted in different monoclonal stable transfected cell lines; D: Calculated yield graph of rhFVII; **** $P<0.0001$ vs Control group; M1-M5: monoclonal stable transfected cell line; Marker: Protein Marker.

2.5 单克隆稳定转染细胞株表达 rhFVII的促凝血活性

重复独立制备 3 次单克隆稳定转染细胞株的 rhFVII样本，人凝血因子VII效价法检测 rhFVII的凝血生物活性。对照组细胞上清促凝血时间大于 120 s，单克隆稳定转染细胞株表达 rhFVII的促凝血时间显著低于对照组 ($P<0.0001$)。其中，FVII-M1 促凝血时间最短 (13.93 ± 0.21) s，促凝血生物活性达到 (380.29 ± 13.80) % (表 1)，表明单克隆稳定转染细胞株产生的 rhFVII具有良好的促凝血活性。

表 1 单克隆稳定转染细胞株 rhFVII的促凝血时间及活性 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Coagulation time and procoagulant activity of rhFVII secreted by monoclonal

stable transfected cell lines ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Sample	Control	M1	M2	M3	M4	M5
Coagulation time (s)	>120	13.93 ± 0.21 ***	15.03 ± 0.05 ***	14.70 ± 0.08 ***	15.63 ± 0.39 ***	13.97 ± 0.05 ***
Procoagulant activity (%)	0	380.29 ± 13.80 ***	314.79 ± 2.43 ***	332.79 ± 4.58 ***	286.48 ± 17.93 ***	377.71 ± 3.17 ***

注: *** $P<0.0001$ vs Control group.

2.6 凝血活酶激活 rhFVII

为评估室温下凝血活酶对 rhFVII的激活作用，检测凝血活酶与 rhFVII的比例及反应时间对 rhFVII活化程度的影响。凝血活酶激活 rhFVII的机制是将其单链蛋白结构切断为双链(即重链和轻链，重链发挥促凝血活性)。His 标签位于重链，轻链不含有 His 标签。结果显示，① rhFVII与凝血活酶比例为 1:1 时，rhFVII重链条带最明显；提示此比例是 rhFVII发挥促凝血活性的最适比例 (图 5A)；② rhFVII与凝血活酶 1:1 时，反应 0~12 h 内重链条带明显，反应 24 h 后未观察到重链条带 (图 5B)。

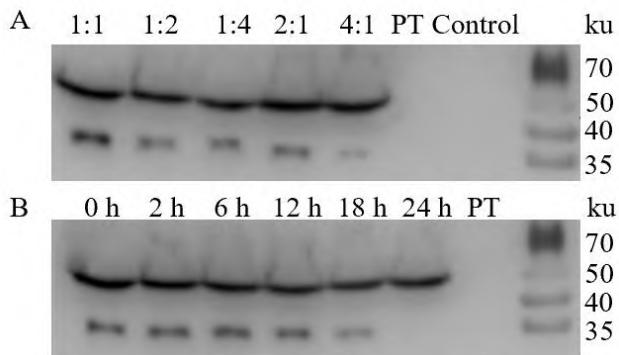


图 5 凝血活酶激活 rhFVII

Fig.5 Prothrombin activation of rhFVII

注: A: The effects of the ratio of thromboplastin to rhFVII on the activation level of rhFVII; B: The effects of the reaction time between thromboplastin and rhFVII on the activation level of rhFVII; PT: thromboplastin solution.

3 讨论

血友病治疗以凝血因子替代疗法为主,通过补充患者体内缺陷的凝血因子预防出血并降低复发相关并发症风险。rhFVII在特定类型血友病患者(如产生FVIII/FIX抑制物者)及遗传性FVII缺乏症患者的救治中具有不可替代性。rhFVII的临床应用已扩展至心脏外科术后出血、产后大出血、严重创伤性出血等危急场景,对于常规止血措施无效的难治性凝血功能障碍亦展现出独特疗效^[8-9]。尽管当前血友病诊疗体系日趋完善,但rhFVII的基础研究仍明显滞后,尤其在体外高效表达体系的构建、蛋白产量的提升及生物活性修饰等关键环节仍存在重大技术挑战。

哺乳动物细胞表达系统因具备规模化制备优势(高产量、强生物活性及良好工艺可控性),已成为重组蛋白药物的首选平台。其中,HEK293细胞凭借优异的人源化特性、高效增殖性能及便捷转染优势,能够精确完成复杂翻译后修饰,被广泛应用于单克隆抗体、细胞因子与治疗酶等生物制剂的开发。目前已有7种基于该细胞系生产的生物药物获得FDA与欧洲药品管理局上市许可^[10-11]。本研究基于HEK293系统,通过EGFP-FVII融合蛋白确认其真核表达效能,继而采用pcDNA3.1-FVII载体进行瞬时转染,成功获得具备功能活性的rhFVII,证实该体系是rhFVII制备的理想平台。值得注意的是,实验观察到转染后细胞呈现显著增强的贴壁特性,并维持4~5 d的持续蛋白分泌期,这一现象不仅提升了培养体系的稳定性,更为后续稳定转染株的筛选建立了有利基础。

瞬时转染技术能够快速实现高效蛋白表达,在蛋白表达条件优化中具有显著时效优势。

相较于稳定表达体系，该技术虽能大幅压缩研发周期，但存在表达丰度受限及批次间异质性的固有缺陷，需通过建立单克隆稳定转染细胞株实现生产均一化。既往文献报道 rhFVII表达量普遍较低：Abbasi-Malati et al^[12]采用 Nrf2 工程化的 HEK293 细胞仅获得 315 ng/mL 的 rhFVII；Halabian et al 分别运用 pcDNA3.1 载体（CHO 细胞系，425 ng/mL）^[13]与 PDEST26 载体（CHO 细胞系，500 ng/mL）^[14]表达量仍未突破毫克级瓶颈。本研究利用 HEK293 细胞获得 rhFVII表达量达 1.27 mg/L，较先前研究显著提高。

凝血酶原时间是评估外源性凝血途径功能的核心指标，其原理基于组织因子（tissue factor, TF）与 FVII的级联激活作用：TF 与 FVII结合形成 TF-FVIIa 复合物，该复合物在 Ca^{2+} 介导下催化凝血酶原转化为凝血酶，最终触发纤维蛋白原转化为纤维蛋白而实现血浆凝固。本研究通过将纯化 rhFVII添加至乏VII因子血浆检测促凝血时间。结果显示：筛选获得的单克隆稳定转染细胞株产生 rhFVII可使凝血时间较文献报道缩短 3 倍以上^[15]，促凝血活性最高达到 $(380.29 \pm 13.80) \%$ ，充分证实本研究制备的 rhFVII具备良好的凝血功能活性。

综上，本研究成功构建 HEK293 真核稳定转染平台，筛选获得具备高表达量与高凝血活性的单克隆稳定转染细胞株，为 rhFVII的大规模生产构建了关键性技术基础。后续研究将着力推进贴壁 HEK293 细胞的悬浮驯化、表达条件优化，建立高密度、可放大的 rhFVII生产体系，最终筛选获得符合 GMP 要求的悬浮单克隆稳定转染细胞株，为重组凝血因子药物的工业化生产提供标准化细胞工厂。

参考文献

- [1] 朱礼君, 郑昌成. 世界血友病同盟《全球血友病年度报告 2022》解读[J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(1): 40-5. doi:10.16150/j.1671-2870.2024.01.006.
Zhu L J, Zheng C C. Interpretation of the “2022 world hemophilia annual report” by the world federation of hemophilia[J]. J Diagn Concepts Pract, 2024, 23(1): 40-5. doi:10.16150/j.1671-2870.2024.01.006.
- [2] 王惠临, 周凯强, 朱红雨, 等. 凝血因子VII及其重组表达新进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(S1): 129-37. doi:10.13523/j.cb.2010035.
- [2] Wang H L, Zhou K Q, Zhu H Y, et al. Research progress of human coagulation factor VII and the recombinant expression systems[J]. China Biotechnol, 2021, 41(S1): 129-37. doi:10.13523/j.cb.2010035.
- [3] Shima M. Current status and future prospects of activated recombinant coagulation factor VIIa,

NovoSeven®, in the treatment of haemophilia and rare bleeding disorders[J]. Ann Hematol, 2024, 103(8): 2647-58. doi:10.1007/s00277-023-05287-2.

[4] Pipe S W, Dunn A L, Young G. Efficacy and safety evaluation of eptacog beta (coagulation factor VIIa [recombinant]-jncw) for the treatment of hemophilia A and B with inhibitors[J]. Expert Rev Hematol, 2023, 16(10): 715-29. doi:10.1080/17474086.2023.2248385.

[5] Montacir O, Montacir H, Eravci M, et al. Bioengineering of rFVIIa biopharmaceutical and structure characterization for biosimilarity assessment[J]. Bioengineering, 2018, 5(1): 7. doi:10.3390/bioengineering5010007.

[6] 冯佳宁, 邹森, 赵泽林, 等. 重组人凝血因子X在HEK293细胞中的表达及活性检测[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(9): 1583-90. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.003.

[6] Feng J N, Zou S, Zhao Z L, et al. Expression and optimization of recombinant human coagulation factor X in HEK293 cells[J]. Acta Univ Med Anhui, 2025, 60(9): 1583-90. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.003.

[7] 国家药典委员会. 人凝血因子VII效价测定法(一期法) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 622.

[7] Committee N P. Human coagulation factor VII potency assay (Phase I method) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 622.

[8] Wang H, Wang L, Li S, et al. N-Glycan-calnexin interactions in human factor VII secretion and deficiency[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 113: 67-74. doi:10.1016/j.biocel.2019.05.017.

[9] 龚丽, 米紫玥, 孔玉洁, 等. 保存期间血小板中外泌体浓度变化及其对凝血功能的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(8): 1283-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.020.

[9] Gong L, Mi Z Y, Kong Y J, et al. Changes of exosomal concentration during platelet storage and the effects on coagulation function[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(8): 1283-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.020.

[10] Tan E, Chin C S H, Lim Z F S, et al. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 796991. doi:10.3389/fbioe.2021.796991.

[11] Qian J, Wang P, Zhang Y, et al. Production and antigenicity analysis of a recombinant insulinoma associated protein-2 in HEK293 cells[J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2023,

39(10): 4246-57. doi:10.13345/j.cjb.230087.

[12] Abbasi-Malati Z, Amiri F, Mohammadipour M, et al. HEK293 cells overexpressing nuclear factor E2-related factor-2 improve expression of recombinant coagulation factor VII[J]. Mol Biotechnol, 2019, 61(5): 317-24. doi:10.1007/s12033-019-00160-y.

[13] Halabian R, Roudkenar M H, Esmaeili N S, et al. Establishment of a cell line expressing recombinant factor VII and its subsequent conversion to active form FVIIa through hepsin by genetic engineering method[J]. Vox Sang, 2009, 96(4): 309-15. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01158.x.

[14] Halabian R, Fathabad M E, Masroori N, et al. Expression and purification of recombinant human coagulation factor VII fused to a histidine tag using Gateway technology[J]. Blood Transfus, 2009, 7(4): 305-12. doi:10.2450/2009.0081-08.

[15] 肖 薇, 赵 睿, 李长清, 等. 人凝血因子VII在 CHO-K1 细胞中的表达与鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(6): 822-4. doi:10.13200/j.cjb.2013.06.83.xiaow.031.

[15] Xiao W, Zhao R, Li C Q, et al. Expression and identification of human coagulation factor VII in CHO-K1 cells [J]. Chin J Biol, 2013, 26(6): 822-4. doi:10.13200/j.cjb.2013.06.83.xiaow.031.