# 重组人凝血因子IX在HEK293细胞中的稳定表达与功能鉴定

王 倩[1#], 邹 森[2#], 张甲年[1], 张子涛[1], 刘佳骏[1], 朱丽华[1*], 杨兆勇[2*]

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要**: 本研究为构建表达重组人凝血因子IX (recombinant human coagulation factor IX, rhFIX) 的人源胚胎肾上皮细胞293 (human embryonic kidney 293 cells, HEK293) 稳定细胞株, 并鉴定表达产物的促凝血生物学活性, 将重组质粒pcDNA3.1-FIX转染HEK293细胞, 经遗传霉素 (geneticin, G418) 压力筛选获得单克隆稳定转染细胞株。逆转录聚合酶链式反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 鉴定*F9*基因在单克隆稳定转染细胞株中是否发生转录表达, 十二烷基硫酸钠−聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 和Western blot鉴定rhFIX的表达; 二辛可宁酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA) 测定rhFIX的浓度, 活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 测定rhFIX的促凝血活性。结果表明, G418 (200 μg·mL$^{-1}$) 加压筛选后获得5株单克隆稳定细胞株能够正常转录, 且可通过转录翻译过程实现蛋白表达; 细胞上清液蛋白纯化后呈现rhFIX单一条带; rhFIX表达量最高达到 (1.58 ± 0.10) mg·L$^{-1}$, 凝血活性最高为 (66.8 ± 0.5)%。所建立的HEK293单克隆稳定转染细胞株能够高效、稳定地表达rhFIX, 且具有良好的促凝活性, 为推进rhFIX的成药性评价与临床前研究提供了细胞来源。

**关键词**: 血友病B; 重组人凝血因子IX; HEK293单克隆细胞株; 稳定表达; 凝血活性

**中图分类号**: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)05-1712-07

# Stable expression and functional identification of recombinant human coagulation factor IX in HEK293 cells

WANG Qian[1#], ZOU Sen[2#], ZHANG Jia-nian[1], ZHANG Zi-tao[1], LIU Jia-jun[1], ZHU Li-hua[1*], YANG Zhao-yong[2*]

(*1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China*)

**Abstract**: This study aimed to construct a stable cell line of human embryonic kidney epithelial cells 293 (HEK293) expressing recombinant human coagulation factor IX (rhFIX) and to identify the procoagulant biological activity of the expressed product. The recombinant plasmid pcDNA3.1-FIX was transfected into HEK293 cells, and a monoclonal stable transfection cell line was obtained through geneticin (G418) pressure screening. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to determine whether the FIX gene was transcribed and expressed in the monoclonal stable transfection cell line. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot were used to identify the expression of rhFIX; the concentration of rhFIX was determined by bicinchoninic acid assay (BCA), and the procoagulant activity of rhFIX was determined by activated partial thromboplastin time (APTT). The results showed that after G418

收稿日期: 2025-12-02; 修回日期: 2026-01-18.
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82301185).
#共同第一作者.
*通讯作者 Tel: 13932554697, E-mail: zhulihua1972@163.com;
Tel: 18513385316, E-mail: zhaoyongy@imb.pumc.edu.cn
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1434

(200 μg·mL$^{-1}$) pressure screening, 5 monoclonal stable cell lines could be normally transcribed, and the protein expression could be achieved through the transcription-translation process; the protein in the cell supernatant was purified and showed a single band of rhFIX; the expression level of rhFIX reached (1.58 ± 0.10) mg·L$^{-1}$, and the maximum procoagulant activity was (66.8 ± 0.5)%. The established HEK293 monoclonal stable transfection cell line can efficiently and stably express rhFIX and has good procoagulant activity, providing a cell source for promoting the pharmacological evaluation and preclinical research of rhFIX.

**Key words**: hemophilia B; recombinant human coagulation factor IX; HEK293 monoclonal cell line; stable expression; coagulation activity

血友病B, 即凝血因子IX (coagulation factor IX, FIX) 缺乏症, 是一种X连锁隐性疾病[1], 也是最常见的出血性疾病之一; 其临床特征是关节、肌肉和内脏自发性或长期出血。血友病B通常与关节反复出血引起的致残关节病有关[2], 有潜在的生命危险。该类患者根据患病程度分为三类, 即症状严重 (FIX活性 < 1%), 症状中等 (FIX活性在1%～5%之间) 和症状轻度 (FIX活性在5%～40%之间[3])。血友病B的临床治疗主要依靠新鲜血浆中的FIX, 但这些制剂中FIX的浓度较低, 无法满足临床需求[4]。

FIX是一种在肝脏合成的依赖维生素K的糖蛋白[5], 成熟过程需要多个复杂的翻译后修饰, 包括12个谷氨酸残基的γ-羧化、糖基化、残基的羟基化和磷酸化[6,7]。血浆中的成熟FIX蛋白是一种由415个氨基酸组成的单链蛋白质, 分子质量约为57 kDa。*F9*由多个结构域组成: N-末端GLA结构域、短疏水序列、两个EGF结构域、连接区、激活肽和C-末端丝氨酸蛋白酶结构域。钙离子对于GLA和EGF结构域的正确折叠是必不可少的, 其具有良好的钙结合位点[8,9]; 此外, 11个二硫键稳定了*F9*分子的整体结构[10]。

HEK293细胞来源于人类, 具有与人类合成自身蛋白类似的翻译后修饰程序, 是一种被授权用于生产治疗性重组蛋白的细胞系[11]。基于高转染效率及良好的瞬时表达特性, HEK293细胞系被普遍应用于治疗性蛋白的快速筛选与表达工艺开发[12], 加之能够适应无血清悬浮培养[13], 该细胞已成为大规模生产人重组蛋白的关键宿主。本研究选择HEK293细胞作为rhFIX的表达宿主, 聚焦于pcDNA3.1-FIX重组载体的构建, 筛选稳定表达rhFIX的HEK293单克隆细胞株, 对其表达水平及促凝血功能进行系统性评价, 为推进该蛋白的后续药物开发奠定基础。

## 材料与方法

**质粒及细胞**　pcDNA3.1-FIX质粒和pcDNA3.1-EGFP-FIX质粒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细胞购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

**主要试剂**　Eagle必需培养基 (Eagle's minimum essential medium, EMEM, 批号: 80203251) 购自美国ATCC; 0.25%胰蛋白酶 (批号: 3066349)、胎牛血清 (批号: N2785574P) 均购自美国Gibco公司; 聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine, PEI, 批号: 543794) 转染试剂购自美国MCE公司; PVDF膜 (批号: FFP32)、G418 (批号: A315250901)、BCA蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (批号: A224250708) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 小鼠抗6×His Tag单克隆抗体 (批号: L123AA2022)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG (批号: K603AA035) 均购自上海生工生命科学有限公司; One Step SuperRT-PCR Mix Kit (批号: 14231222001)、总RNA提取试剂盒 (Solarbio, 批号: 240006003) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 无内毒素质粒小提中量快速提取试剂盒 (批号: B0821B) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 考马斯亮蓝快速染液 (批号: 039C1196) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; TBST速溶颗粒 (批号: 7209030551) 购自北京兰博利德商贸有限公司; APTT试剂盒 (批号: 325032) 购自武汉中太生物技术有限公司; 标准血浆 (批号: NP703-2)、乏IX因子血浆 (批号: DPF09-12) 均购自上海船夫生物技术有限公司; DNA测序、基因和引物合成均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

**HEK293细胞培养及pcDNA3.1-EGFP-FIX转染**　HEK293细胞在37 ℃、5% $CO_2$的培养箱中贴壁培养。细胞融合度达到约90%时, 进行传代: 0.25%胰酶消化3 min, 完全培养基 (含10%胎牛血清的EMEM基础培养基) 终止反应, 1 200 r·min$^{-1}$离心3 min收集细胞。重悬离心后的细胞沉淀, 调整每毫升细胞为$10^6$个后接种至新培养瓶。细胞生长至对数生长期进行转染: 转染前2 h, 将培养基更换为无血清的EMEM基础培养基; 取10 μg经0.22 μm滤膜除菌的pcDNA3.1-EGFP-FIX质粒, 与1 mL EMEM培养基轻柔混匀; 另取25 μL PEI, 与1 mL EMEM培养基振荡混匀。将上

述两种溶液等体积混合, 室温孵育 30 min 以形成 DNA-PEI 复合物。将 2 mL 复合物逐滴加入细胞培养瓶, 置于 37 ℃、5% $CO_2$ 条件下继续培养。以转染 pcDNA3.1-FIX 质粒的细胞为阴性对照, 转染流程同实验组, 转染后 72 h 观察并记录细胞荧光强度。

**pcDNA3.1-FIX 稳定转染及单克隆细胞株筛选** EMEM 完全培养基重悬 HEK293 细胞, 以每毫升 $10^4$ 个细胞将 HEK293 细胞接种于 24 孔板。24 h 后, 更换含不同 G418 浓度梯度 (0、100、200、300、400、500、600、700 和 800 μg·mL$^{-1}$) 的完全培养基, 每个梯度重复 3 个复孔; 将 14 天左右能够杀死所有 HEK293 细胞的最小 G418 浓度作为最适宜的筛选浓度。

pcDNA3.1-FIX 转染 HEK293 细胞 48 h 后, 更换为含有 G418 (筛选浓度为 200 μg·mL$^{-1}$) 的 EMEM 完全培养基, 继续培养 14 天获得抗性菌落, 期间 2～3 天更换新鲜培养基。抗性细胞株经 0.25% 胰酶消化后进行细胞计数, 调整细胞浓度为每毫升 960 个并定容至 96 mL, 以每孔 100 μL 的体系接种 96 孔板。将孔板置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中过夜培养; 24 h 后于倒置显微镜下观察, 标记仅含单个细胞的孔。后续每 3 天更换含 G418 的新鲜 EMEM 完全培养基, 待孔内单细胞增殖形成克隆且细胞密度达孔底 80% 时, 依次将细胞传代至 24 孔板、6 孔板、25 cm$^2$ 培养瓶及 75 cm$^2$ 培养瓶, 后续培养、传代及冻存操作同常规 HEK293 细胞。筛选 5 株促凝血活性较好的单克隆稳定转染细胞株, 进行扩大培养与连续传代。

**rhFIX 单克隆稳定转染细胞株的鉴定及活力检测** 提取单克隆稳定转染细胞株总 RNA 为模板, 按照 RT-PCR 试剂盒说明书扩增 *F9* 基因。单克隆稳转株活力检测: 选取上述 5 株单克隆稳定转染细胞株经传代后进行增殖分析: 培养的第 1～6 日内每日计数, 并检测细胞活率, 以培养时间和细胞数量/细胞活率为变量绘制生长曲线。

**rhFIX 蛋白纯化、SDS-PAGE 和 Western blot 检测** His Tag Ni-NTA 树脂亲和层析法纯化 rhFIX。首先以低浓度咪唑 (50 mmol·L$^{-1}$ $NaH_2PO_4$、300 mmol·L$^{-1}$ NaCl、10 mmol·L$^{-1}$ 咪唑、10% 甘油, pH 8.0) 缓冲液平衡树脂, 将细胞上清与含蛋白酶抑制剂的同类缓冲液共孵育 2 h 后上柱, 依次采用中、高浓度咪唑 (50 mmol·L$^{-1}$ $NaH_2PO_4$、300 mmol·L$^{-1}$ NaCl、20 mmol·L$^{-1}$ 咪唑、10% 甘油, pH 8.0; 50 mmol·L$^{-1}$ $NaH_2PO_4$、300 mmol·L$^{-1}$ NaCl、250 mmol·L$^{-1}$ 咪唑、10% 甘油, pH 8.0) 缓冲液进行洗涤和洗脱, 获得纯化蛋白。将纯化 rhFIX 样本与 5× loading buffer 按体积比 4∶1 混合, 煮沸 6 min。SDS-PAGE 电泳: 参数设置恒压 130 V, 时间 50 min, 使用考马斯亮蓝染液染色并凝胶分析。Western blot 检测: 转膜时参数设置恒流 350 mA, 90 min 快速转膜; 摇床上 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h; 一抗 4 ℃孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, 结束后立即显影。

**rhFIX 浓度检测** BCA 试剂盒测定蛋白浓度: 依试剂盒说明绘制标准曲线。分别收集连续传代 10 次细胞、冻存复苏细胞的培养上清液各 50 mL, 经浓缩纯化至 200 μL; 取 rhFIX 样品 20 μL 加入酶标孔, 添加 200 μL 工作液, 37 ℃孵育 30 min, 于 $A_{562\ nm}$ 波长读取吸光度值, 代入标准曲线计算蛋白浓度。重复独立制备 3 次单克隆稳转细胞株的 rhFIX 样本检测浓度。以转染 pcDNA3.1 空质粒的 HEK293 细胞上清为阴性对照。

**rhFIX 凝血生物活性检测** rhFIX 凝血生物活性的检测方法参照 2020 年版《中华人民共和国药典》[14] 进行。标准人血浆配制系列浓度标准品, 以凝血活性百分比的对数值为 *X* 轴, 相应凝固时间的对数值为 *Y* 轴, 绘制标准曲线。分别取 25 μL 上述纯化后的 rhFIX 样品及空白对照样本, 各与 25 μL 乏 FIX 血浆混匀; 加入 50 μL APTT 试剂后, 于半自动凝血分析仪 37 ℃孵育 3 min, 加入 50 μL 预热 $CaCl_2$ 试剂, 记录体系凝固时间。将凝血时间对数值代入标准曲线方程, 计算 rhFIX 相对标准血浆的百分比活性。以 pcDNA3.1 空载体质粒转染细胞的上清液作为阴性对照。

**统计学分析** 图表绘制和统计处理均由 GraphPad Prism 9.5.0 完成。呈正态分布的数据表示为 (均值 ± 标准差)。多组均值的差异性通过单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行判断, 并运用 Dunnett's 法对实验组与对照组做进一步比较。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 结果

### 1 pcDNA3.1-EGFP-FIX 质粒瞬时转染 HEK293 细胞

为验证真核蛋白表达系统的有效性, 本研究将 pcDNA3.1-EGFP-FIX 质粒转染至 HEK293 细胞, 转染 72 h 后进行荧光观察, 测得转染效率为 (41.7 ± 0.5)%。实验结果表明: 转染 pcDNA3.1-FIX 质粒的阴性对照组 (图 1A、B) 细胞无荧光信号检出, 转染组 (图 1C、D) 细胞可见显著绿色荧光, 表明 EGFP-FIX 融合蛋白成功表达。

### 2 pcDNA3.1-FIX 单克隆细胞株的筛选及鉴定

在本实验中, G418 筛选单克隆的最适宜浓度为 200 μg·mL$^{-1}$; 加压筛选获得 20 株单克隆稳定转染细胞株。依据上清中 rhFIX 蛋白的凝血时间 (图 2A), 挑选 5 株生长状态好、凝血活性高的单克隆稳定转染细胞

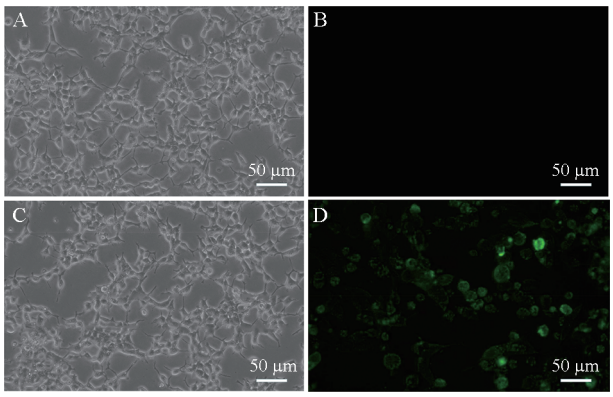



**Figure 1**　Transient transfection of HEK293 cells with pcDNA3.1-EGFP-FIX. A: The blank control group (pcDNA3.1-FIX) shows black and white color; B: Fluorescence color development in the blank control group; C: Black and white color development in the transient transfection group (pcDNA3.1-EGFP-FIX); D: Fluorescence coloration in the transient transfection group. Scale bar: 50 μm. FIX: Coagulation factor IX

株 (FIX-17、FIX-28、FIX-35、FIX-57、FIX-62) 继续扩大培养。提取单克隆稳定转染细胞株总 RNA, RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶, 目的片段位于 1 200 bp 附近 (图 2B), 提示 *F9* 基因在 HEK293 单克隆稳定株中能够正常转录, 且可通过转录翻译过程实现蛋白表达。

### 3　rhFIX 单克隆稳定转染细胞株的活力检测

为评估单克隆稳定转染细胞株的活力, 分别对传代后的 5 株单克隆稳定转染细胞株的生长速度和细胞活力进行检测。结果显示, 稳定转染株的增殖速率 (图 3A) 及其活率 (图 3B) 与正常 HEK293 细胞相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

### 4　rhFIX 蛋白纯化、SDS-PAGE 和 Western blot 检测

收集 5 株 rhFIX 单克隆稳定转染细胞株培养上清并经镍柱纯化, SDS-PAGE (图 4A) 和 Western blot (图 4B) 显示, 纯化后 Elution 中 rhFIX 均为特异性条带, 分子质量约为 57 kDa (与预期相符), 表明 rhFIX 蛋白成功表达。

### 5　单克隆稳定转染细胞株表达 rhFIX 的浓度检测

分别收集 5 株单克隆稳定转染细胞株连续传代 10 次及冻存复苏后的培养基上清, 进行 3 次独立重复实验测定 rhFIX 的表达浓度。依据 BCA 标准曲线 ($R^2 = 0.995\ 2$) (图 5A) 计算可得, 5 株连续传代后的单克隆稳定转染细胞株产生的 rhFIX 浓度分别为 (1.15 ± 0.05)、(1.47 ± 0.04)、(1.58 ± 0.10)、(0.95 ± 0.03) 和 (1.34 ± 0.04) mg·L$^{-1}$, 5 株单克隆稳定转染细胞株在续传代与冻存复苏后, 其 rhFIX 的表达量未呈现显著性差异 ($P > 0.05$) (图 5B)。

### 6　单克隆稳转细胞株表达 rhFIX 的促凝血活性测定

一期凝固法检测 rhFIX 的促凝血生物学活性。基于标准血浆的活性标准曲线 (图 6A) 测定 5 株单克隆稳定转染细胞株经连续传代 10 次细胞及冻存复苏后

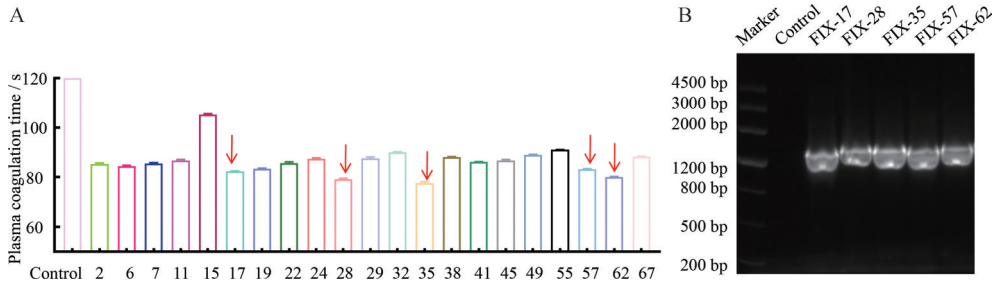



**Figure 2**　Screening and identification of monoclonal stably transfected cell lines. A: Detection of clotting time of rhFIX secreted by monoclonal stably transfected cell lines; B: Transcriptional expression identification of the *F9* gene in stably transfected monoclonal cell lines

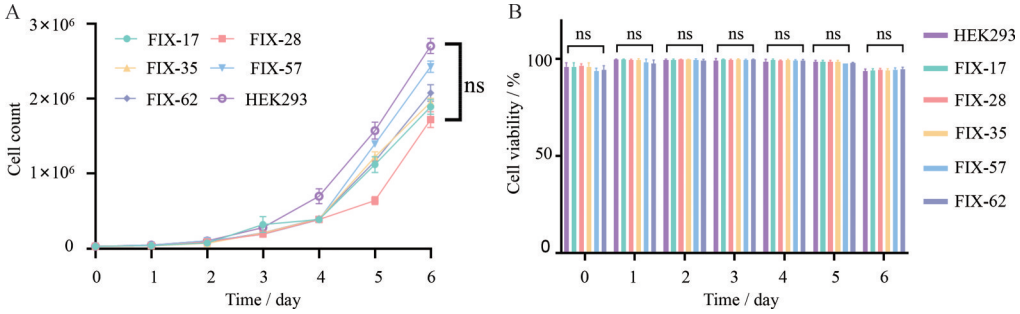



**Figure 3**　Viability detection of monoclonal stably transfected cell lines. A: Growth curves of normal HEK293 cells and monoclonal stably transfected cell lines; B: Cell viability of normal HEK293 cells and monoclonal stable transfected cell lines. ns: $P > 0.05$

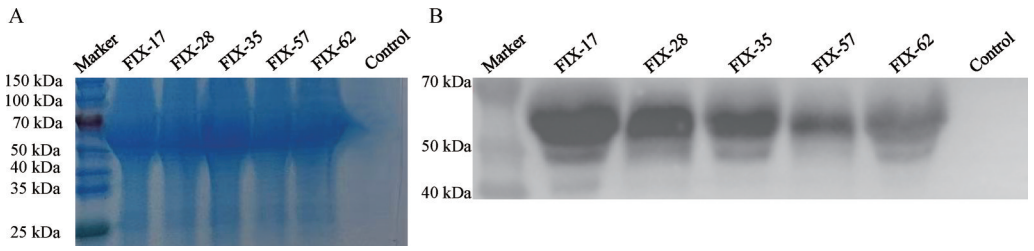



**Figure 4** Expression of the monoclonal stably transfected cell line rhFIX. A: SDS-PAGE identification of monoclonal stably transfected cells; B: Western blot identification of monoclonal stably transfected cells

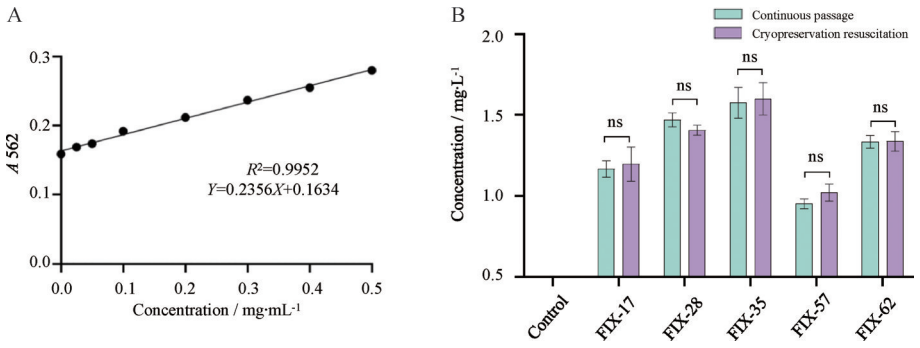



**Figure 5** Determination of rhFIX concentration in stably transfected monoclonal cells. A: Standard curve for BCA protein concentration determination; B: Determination of the secretion level of rhFIX in 5 stably transfected monoclonal cell lines after continuous passage and cryopreservation recovery treatment

的促凝血活性。结果显示, 对照组细胞上清促凝血时间大于 120 s (图 6B); 5 株单克隆稳定转染细胞株分泌的 rhFIX 较对照组促凝血时间显著缩短; 其中, FIX-35 促凝血时间最短 (77.8 ± 0.1) s, 对应的促凝血活性达到 (66.8 ± 0.5)% (图 6C)。此外, 连续传代与冻存复苏后, 各细胞株表达蛋白的促凝血活性未出现统计学差异, 表明 5 株单克隆稳定转染细胞株可稳定分泌具有高效促凝血活性的 rhFIX。

## 讨论

血友病 A 和 B 是由凝血因子 VIII (coagulation factor VIII, FVIII) 或 FIX 缺乏活性引起的 X 连锁遗传性出血性疾病[15]。迄今为止, 血友病的治疗主要采用血浆来源或重组 FVIII/FIX 浓缩物的替代疗法, 包括半衰期延长的替代疗法[16]。血源性 FIX 的应用面临多重固有局限。首要风险在于生物安全性, 难以完全规避已知病原体残留或未知新发病原体污染的理论可能。另一显著局限在于生产层面, 其供应高度依赖有限的人血浆资源; 此外, 复杂的纯化与病毒灭活工艺使得生产成本居高不下, 而终产品中残留的异源血浆蛋白还可能引入潜在的免疫原性风险。

目前已有 4 家企业的 rhFIX 上市[17], 包括辉瑞公司的 Bene hFIX、百健艾迪公司的 Alprolix、百特公司的 Rixubis 及诺和诺德公司的 Rebinyn, 其中 Bene hFIX、

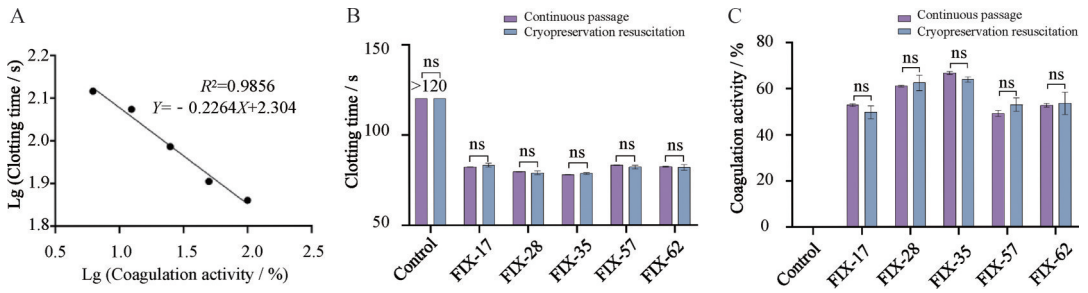



**Figure 6** The clotting time and clotting activity of the stably transfected monoclonal cell line expressing rhFIX. A: Normal reference plasma standard curve; B: Procoagulation time of rhFIX for 5 stably transfected monoclonal cell lines after continuous passage and cryopreservation recovery treatment; C: The procoagulant activity of rhFIX in 5 stably transfected monoclonal cell lines after continuous passage and cryopreservation recovery treatment

Rixubis 和 Rebinyn 均在中国仓鼠卵巢 (Chinese hamster ovary, CHO) 细胞中表达制备。治疗性重组蛋白药物领域在近年实现了高速发展, 其主流生产技术以哺乳动物细胞表达体系为主[18]。CHO 细胞可能产生非人源糖型 (如 $\alpha$-1,3-半乳糖苷酶), 该糖型易被人体免疫系统识别, 增加重组蛋白的免疫原性风险, 进而影响蛋白体内安全性与疗效稳定性; HEK293 细胞具有高密度培养易实现、转染效率优异、可高效表达并分泌重组蛋白, 且能完成与人类高度相似的翻译后修饰等优势, 因此被广泛应用于复杂重组蛋白的制备[11]。因此, 开发 HEK293 源性的 rhFIX 具有重要的意义。国内报道 rhFIX 的表达水平普遍不高: 研究者[19]在小鼠脂肪干细胞中测得 rhFIX 的表达量为 (21.33 ± 3.93) ng·($10^6$ 个细胞/24 h)$^{-1}$; 另有学者在小鼠脂肪干细胞中所获 rhFIX 的稳定表达量的最高值为 (81.62 ± 8.82) μg·L$^{-1}$[20], 均未能突破毫克级瓶颈。与之相比, 本研究采用 HEK293 细胞平台, 将 rhFIX 的表达量提升至 (1.58 ± 0.10) mg·L$^{-1}$, 较先前研究显著提高。

本研究基于 HEK293 系统, 通过 EGFP-FIX 融合蛋白确认其真核表达效能。所选 pcDNA3.1 表达载体含有 neoR 抗性筛选标签, pcDNA3.1-FIX 成功转染 HEK293 细胞后具有抗遗传霉素的抗性。稳定转染的细胞在含有 G418 的培养基中正常存活, 基因没有整合至细胞者则在筛选过程中死亡[21]。通过有限稀释法成功分离获得 20 株单克隆稳定转染细胞株, 并系统评估其 rhFIX 凝血功能活性及表达水平。各单克隆稳定转染细胞株间 rhFIX 表达水平与凝血活性呈非完全一致性相关, 可能与不同克隆稳定转染细胞株的翻译后修饰功能异质性有关。本实验采用经典有限稀释法进行阳性克隆筛选[22], 在维持操作简便性的同时确保单克隆来源可靠。

活化部分凝血活酶时间实验是评估 rhFIX 的凝血生物学活性的经典方法, 其原理基于在枸橼酸钠抗凝的血浆中, 先后加入部分凝血活酶 (提供磷脂表面) 和活化剂 (如白陶土, 激活内源性凝血因子), 经孵育后, 再加入钙离子启动被刻意中断的凝血过程。通过精确测定从加入钙离子到纤维蛋白凝块形成所需的时间, 来评估 FIX 的功能状态。本研究通过测定活化部分凝血活酶时间验证了 rhFIX 的功能活性及其治疗应用潜力。

本研究构建的单克隆稳定转染 HEK293 细胞株分泌的 rhFIX 可显著缩短凝血时间, 其凝血活性最高达 (66.8 ± 0.5)%, 相较于国内文献报道的 8.5% 活性水平[19]提升近 8 倍, 充分证实单克隆稳定转染细胞体系可有效增强 rhFIX 的凝血功能活性。然而, 该活性水平仍略低于已上市 rhFIX 产品, 这一差异可能与 HEK293 工程细胞的蛋白翻译后修饰效率、纯化过程中目标蛋白的构象稳定性以及体外活性检测体系的反应条件相关; 通过优化细胞培养工艺以提升蛋白表达质量、改进纯化流程减少活性损失、建立更贴近体内生理状态的活性评估模型等策略, 可进一步提高 rhFIX 的活性水平与产品应用潜力。

综上, 本研究成功建立了基于 HEK293 细胞的真核稳定转染平台, 通过系统性筛选获得了兼具高水平表达和高效凝血活性的单克隆细胞株, 为 rhFIX 的大规模制备奠定了关键技术基础。后续研究工作将重点开展贴壁 HEK293 细胞的悬浮适应性驯化, 并进一步优化表达条件, 旨在构建可规模化放大、适用于高密度培养的 rhFIX 生产体系。本研究的最终目标是获得符合药品生产质量管理规范要求的悬浮单克隆细胞株, 为重组凝血因子类药物的工业化生产提供标准化、质量可控的细胞工厂平台。

**作者贡献**: 王倩、邹森负责实验设计、实验开展、数据收集及文章撰写; 张甲年、张子涛、刘佳骏参与前期文献调研; 朱丽华、杨兆勇负责论文指导与技术支持, 统筹研究全过程。

**利益冲突**: 本研究不存在任何利益冲突。

## References

[1] Miller CH. The clinical genetics of hemophilia B (factor IX deficiency) [J]. Appl Clin Genet, 2021, 14: 445-454.

[2] Han JH, Dupervil B, Mahajerin A, et al. Clinical and treatment characteristics of infants and toddlers less than 2 years of age with hemophilia [J]. Blood Adv, 2024, 8: 2707-2717.

[3] Burke T, Asghar S, O'hara J, et al. Clinical, humanistic, and economic burden of severe haemophilia B in adults receiving factor IX prophylaxis: Findings from the Chess II Real-World Burden of Illness Study in Europe [J]. Orphanet J Rare Dis, 2021, 16: 521.

[4] Wu R, Wu X, Zhang N, et al. Joint disease status of severe and moderate haemophilia patients at the Beijing Children's Hospital: Early onset and rapid increasing severity of arthropathy in 90% of patients by 6 years of age [J]. Haemophilia, 2014, 20: e227-e230.

[5] Tatsumi K, Ohashi K, Mukobata S, et al. Hepatocyte is a sole cell type responsible for the production of coagulation factor IX *in vivo* [J]. Cell Med, 2012, 3: 25-31.

[6] Gao M, Chen L, Yang J, et al. Multimodal mechanisms of pathogenic variants in the signal peptide of FIX leading to hemophilia B [J]. Blood Adv, 2024, 8: 3893-3905.

[7] Shen G, Gao M, Cao Q, et al. The molecular basis of FIX deficiency in hemophilia B [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 2762.

[8] Stenflo J, Stenberg Y, Muranyi A. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: Function of the calcium ion

in module interactions [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1477: 51-63.

[9] Kolyadko VN, Layzer JM, Perry K, et al. An RNA aptamer exploits exosite-dependent allostery to achieve specific inhibition of coagulation factor IXa [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121: e2401136121.

[10] Ivanciu L, Camire RM. Blood coagulation factor IX: Structure, function, and regulation [J]. IUBMB Life, 2025, 77: e70024.

[11] Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, et al. HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 796991.

[12] Rong L, Chen D, Huang X, et al. Delivery of Cas9-guided ABE8e into stem cells using poly (*L*-lysine) polypeptides for correction of the hemophilia-associated FIX missense mutation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 628: 49-56.

[13] Yue XY, Ji WN, Zhou JY, et al. HEK293 cell suspension culture technology and its application research progress [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2025, 41: 82-91.

[14] Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume 3) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 622.

[15] Li RY, Liang L, Zhou RQ, et al. Advances in domestic and international research on gene therapy for hemophilia [J]. Guangzhou Med J (广州医药), 2024, 55: 331-341.

[16] Aledort L, Mannucci PM, Schramm W, et al. Factor VIII replacement is still the standard of care in haemophilia A [J]. Blood Transfus, 2019, 17: 479-486.

[17] Yan H, Zeng FY. Research status and progress of replacement therapy drugs for haemophilia B [J]. Chin J Biotechnol (生物工程学报), 2016, 32: 164-171.

[18] Cui Y, Bai Y, Cheng SY. Application status and evaluation considerations of selection markers in construction of mammalian cell lines for recombinant protein drug production [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2020, 55: 2989-2993.

[19] Wang X, Wang LH, Xie Y, et al. Adenovirus-mediated expression of human coagulation factor IX gene in mouse adipose-derived stem cells [J]. J Exp Hematol (中国实验血液学杂志), 2020, 28: 1718-1725.

[20] Li J, Xie YY, Wang X, et al. Stable expression of human coagulation factor IX gene in mouse adipose-derived stem cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2020, 28: 532-538.

[21] Chowdary P. Extended half-life recombinant products in haemophilia clinical practice-expectations, opportunities and challenges [J]. Thromb Res, 2020, 196: 609-617.

[22] Qi LQ, Zhao J, Wei W, et al. Evaluation considerations on monoclonality of cell banks for recombinant drug production [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2019, 54: 1325-1329.