

· 综述 ·

## 重组凝血因子Ⅶ表达和合成机制的研究进展

彭 林<sup>1</sup>, 于 笑<sup>2</sup>, 蔡燕飞<sup>2</sup>, 金 坚<sup>2\*</sup>, 李华钟<sup>1\*\*</sup>(江南大学<sup>1</sup>生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室;<sup>2</sup>药学院药物设计及药理学实验室, 无锡 214122)

**摘 要** 血友病是由于人体内缺乏相应凝血因子造成的凝血障碍, 目前主要利用基因重组技术在不同细胞中表达重组凝血因子Ⅶ(Ⅶ因子)从而对血友患者出血进行治疗。为有效提高重组Ⅶ因子的产量及活性, 已有研究者尝试利用不同真核表达系统合成重组Ⅶ因子, 如 BHK 细胞、CHO 细胞、昆虫细胞和鱼胚胎等。同时, 不同外源功能性基因对重组Ⅶ因子活性和翻译后修饰对表达产量的影响也通过不同方法进行探究。本文从Ⅶ因子在凝血途径中的作用、重组表达重组Ⅶ因子和翻译后修饰对合成的影响 3 个方面对重组Ⅶ因子表达和合成机制研究进行了综述。

**关键词** 重组凝血因子Ⅶ; 血友病; 凝血机制; 哺乳动物细胞; 翻译后修饰

**中图分类号** Q78; R554 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)05-0623-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150518

## Research advances of recombinant coagulation factor VII expression and synthesizing mechanism

PENG Lin<sup>1</sup>, YU Xiao<sup>2</sup>, CAI Yanfei<sup>2</sup>, JIN Jian<sup>2\*</sup>, LI Huazhong<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology; <sup>2</sup>Laboratory of Drug Design and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract** Haemophilia is caused by lack of coagulation factor VIII or IX in patients' blood with inadequate hemostasis. Currently recombinant coagulation factor VII (rFVII) produced in different cells is used against clinical bleeding of haemophilia patients. To enhance the production and activity of rFVII, some eukaryotic cells such as baby hamster kidney (BHK), Chinese hamster ovary (CHO), insect cell and fish embryo, were used to express rFVII. Meanwhile, the effect of functional gene on the activity of rFVII and the limitation of rFVII production caused by post-translational modification were investigated by different methods. The role of rFVII in hemostasis, synthesis of rFVII in different eukaryotic cells and impact on production of post-translational modification are reviewed in this article.

**Key words** recombinant coagulation factor VII; hemophilia; hemostasis mechanism; mammalian cell; post-translational modification

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021003)

血友病(hemophilia)是一种遗传性凝血功能障碍的出血性疾病,患者由于凝血因子基因突变而导致凝血因子浓度下降或缺乏,从而造成凝血时间延长、轻微创伤后有出血倾向性。临床上根据缺乏凝

血因子的种类将血友病分为血友病 A(凝血因子Ⅷ缺乏症)和血友病 B(凝血因子Ⅸ缺乏症),由于凝血因子Ⅷ(Ⅷ因子)和凝血因子Ⅸ(Ⅸ因子)的编码基因位于 X 染色体上,因此大多数血友病患者分

收稿日期 2015-03-31 通信作者 \* Tel:0510-85918219 E-mail:jnjin31@163.com

\*\* Tel:0510-85913536 E-mail:hzhli@jiangnan.edu.cn

基金项目 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No. 2014AA021003)

布于男性,男性人群中血友病 A 和 B 的发病率分别为 1/5 000 和 1/30 000。对于血友病患者除利用患者缺少的凝血因子进行治疗外,凝血因子 VII (VII 因子) 也被证明可有效治疗血友病患者的出血等症状。VII 因子不但可以治疗血友病,同时还对临床中急性创伤及出血和 VII 因子缺乏症等具有良好的治疗效果,因此在世界市场中的价格和销售份额居高不下。目前国内所需 VII 因子皆需从国外进口,由于生产和制备 VII 因子具有较高的经济价值,因此国内已开展重组生产 VII 因子的相关研究,但目前国内的相关研究仍处于初步阶段,因此本文对近年来国际重组表达 VII 因子的研究工作进行综合。

## 1 VII 因子的凝血机制及其应用

### 1.1 传统的凝血机制

血液凝固是指血液由流动状态转变为凝固状态的过程,此过程的发生是由一系列被激活的凝血因子催化,形成凝血酶使血液中的纤维蛋白原形成纤维蛋白,最终使血液形成血凝块达到止血的目的。最早在 20 世纪 60 年代,凝血过程被认为是一个通过依次激活不同酶原凝结因子最终形成具有催化活性的凝血酶的机制<sup>[1]</sup>。但后来发现之前认为是酶的凝血因子其实是辅酶因子(如 V 因子是 X 因子的辅酶因子),并且 VI 因子本身是活化的 V 因子,因此依据起始点的不同形成了内源性和外源性两种凝血途径。内源性和外源性凝血途径共有活化 X 因子催化凝血酶原形成凝血酶并最终凝血的途径,但在之前激活 X 因子的途径上有所不同。内源性凝血途径包含了所有血液中循环的凝血因子,由 XII 因子在激肽释放酶原和高分子量激肽原的催化下转化为活化状态而开启凝血级联反应,通过依次激活 XI 因子、IX 因子和 VIII 因子,最后由活化的 IX 因子和 VIII 因子的结合物激活 X 因子。外源性途径由暴露于血液中的组织因子与 VII 因子结合形成复合物,催化 X 因子转化为活性形式的 X 因子,因此在较长时间内认为 VII 因子开启的外源性途径可以部分替代内源性途径达到治疗血友病患者出血的目的。

### 1.2 修订的凝血机制

随着近年来对凝血过程研究的不断深入,一些实验结果对内源性和外源性凝血途径提出了质疑,如内源性途径中重要的 XII 因子、PK 和 HMK 的缺

乏并不会导致患者的出血倾向,VIII 因子和 IX 因子与 VII 因子的缺乏不能由外源性或内源性途径所补充<sup>[2]</sup>。目前,体外模型实验和对组织因子的深入研究更新了人们对凝血机制的认识,发现 VII 因子和组织因子对整个凝血过程有着重要的作用<sup>[3-4]</sup>。在新的凝血机制中,凝血过程初期主要发生在组织因子生成细胞上,内皮损伤后组织因子暴露于血液中,与活化的 VII 因子结合形成复合物激活 X 因子,活化的 X 因子激活 V 因子并与活化的 V 因子形成 Xa/Va 复合物,最终在初期将少量的凝血酶原(II 因子)转化为凝血酶。初期形成的活化凝血因子和凝血酶分布于组织因子生成细胞周围,由于形成的凝血酶较少,并不参与凝血过程中纤维蛋白原转化为纤维蛋白,而是激活大量血小板,同时激活 V、VIII 和 XI 因子。凝血的第 2 个阶段发生在血小板表面,作为辅酶的活化的 V 因子和 VIII 因子结合于血小板表面并分别与活化的 X 因子和 IX 因子结合,活化的 XI 因子可以激活大量的 IX 因子以形成 VIIIa/IXa 复合物,从而激活大量的活化 X 因子形成更多的 Xa/Va 复合物即凝血酶原酶,该酶催化凝血酶原形成充足的凝血酶使纤维蛋白原转化为纤维蛋白,从而形成血栓而达到凝血的目的。

### 1.3 VII 因子对血友病的治疗

血友病是由于缺少 VIII 因子或 XI 因子基因所造成的凝血性障碍,根据体内 VIII 因子和 IX 因子的不同浓度,将血友病分为不同级别:低于 1 IU/dL 为重度血友病,1~5 IU/dL 之间和高于 5 IU/dL 分别为中度和轻度血友病<sup>[5]</sup>。早期血友病的治疗通过提取浓缩血液中的 VIII 因子或 XI 因子,但会造成部分血友病患者体内产生抗体抑制剂,引起浓缩剂部分或全部失效,导致严重的并发症<sup>[6-7]</sup>。对于体内含有抗体性抑制剂的血友病患者,可采用提高浓缩剂的剂量或吸附去除抗体抑制剂的方法,但仍具有较大的局限性<sup>[8]</sup>。在利用活化凝血酶原复合物浓缩剂(APCC)治疗血友病取得良好效果的基础上,对其起主要凝血作用的物质进行分析后发现 VII 因子起重要作用<sup>[9-11]</sup>。在后来的临床试验中发现,无论对于是否体内含有抗体抑制剂的血友病患者,VII 因子都取得了良好的治疗效果<sup>[12-13]</sup>。

在考察 VII 因子对血友病患者凝血机制的体外试验中发现,体外注射的活化的 VII 因子直接与凝血初期形成的激活的血小板结合,在缺乏 VIII/IX 复合

物的情况下,活化的Ⅶ因子仍可在血小板表面激活生成少量的Xa因子从而生成大量的凝血酶<sup>[14-16]</sup>,同时通过增加激活凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)或恢复纤维蛋白渗透性,延长凝块溶解时间达到凝血的目的<sup>[17-18]</sup>。因此活化的Ⅶ因子对血友病的治疗,主要是通过血小板表面催化形成Xa因子,同时激活TAFI和形成紧密的纤维蛋白栓子<sup>[15]</sup>。

## 2 重组Ⅶ因子的表达

### 2.1 早期重组Ⅶ因子表达的研究

由于Ⅶ因子对血友病及急性出血具有良好的治疗效果,因此如何有效大规模生产Ⅶ因子成为学者研究的热点。传统Ⅶ因子制剂是从血浆中提取,但由于血液中Ⅶ因子浓度较低(0.5~2.0 μg/mL),并且血液制品会带来多种病症的交叉感染,因此利用基因技术大量生产重组Ⅶ因子成为可靠的选择。1986年,Hagen等<sup>[19]</sup>从人肝脏细胞和HepG2细胞中分别得到Ⅶ因子的编码基因,并对Ⅶ因子的结构、性质和翻译后修饰等方面进行了研究,加深了对Ⅶ因子的认识。同年,在冷泉港会议中Berkner等<sup>[20]</sup>报告了在BHK细胞中表达人源Ⅶ因子的工作,从而建立了利用哺乳动物细胞生产Ⅶ因子的方法,对重组Ⅶ因子和血浆来源Ⅶ因子的结构进行比较分析后发现,仅在翻译后修饰中的γ羧基化修饰和N糖基化糖链组成有微小差异,这种差异并不影响其功能的发挥<sup>[21]</sup>。在体外模型中比较激活的血浆来源Ⅶ因子与重组Ⅶ因子对血浆的凝血效果后发现,两者都可以缩短体外血友病血浆的APTT,同时对未携带及携带有抑制剂的血友病患者都具有治疗作用,这些结果使激活的重组Ⅶ因子用于临床治疗成为可能<sup>[22]</sup>。

### 2.2 具有活性的重组Ⅶ因子的表达

早期成功在BHK细胞中表达重组Ⅶ因子后,近年来研究者尝试了多种其他表达体系,其中CHO细胞(Chinese hamster ovary cell)是其中重要的表达细胞。CHO细胞在药物蛋白的表达方面受到越来越多的关注,主要是由于它具有诸多优点:CHO细胞具有安全性和易于发酵控制;易于适应无血清悬浮培养;对药物蛋白的翻译后修饰可用于人体;细胞高密度发酵技术成熟,蛋白表达量较高等<sup>[23-24]</sup>。由于CHO具有上述优点,因此Berkner

等<sup>[25]</sup>在之后的研究中尝试在CHO中表达重组Ⅶ因子。在CHO中表达外源蛋白主要通过插入*neo*抗性基因或利用二氢叶酸脱氢酶(DHFR)缺陷型进行筛选,Kemball-Cook等<sup>[26]</sup>构建了同时具有*neo*抗性和DHFR缺陷型的质粒在CHO细胞中表达重组Ⅶ因子,无血清培养基中发酵后得到的重组Ⅶ因子,经过分析后证实得到了具有生物活性的重组Ⅶ因子。一般细胞表达得到的重组Ⅶ因子是以酶原形式存在的,在制成制剂前需要通过激活的X因子将重组Ⅶ因子激活,因此目前研究者不仅仅关注于重组Ⅶ因子的产量,还在表达Ⅶ因子的同时共表达其他蛋白,直接得到具有活性的Ⅶ因子。Hepsin是一种跨膜丝氨酸蛋白酶,在体内多种器官如肝脏、肾脏和胰腺等中都有表达,Kazama等<sup>[27]</sup>在BHK细胞表面表达Hepsin后分别与多种凝血相关蛋白,如Ⅶ因子、Ⅸ因子、X因子、凝血酶原等一起培养,发现其中仅有Ⅶ因子被激活,当BHK中缺少Hepsin表达基因时Ⅶ因子未被激活。由于Hepsin对Ⅶ因子专一的激活特性,因此有研究者将Hepsin与Ⅶ因子共同在CHO细胞中表达,使分泌到培养基中的Ⅶ因子经Hepsin激活后直接得到活化的Ⅶ因子,免疫印迹结果显示发酵液中同时存在活化和未活化的Ⅶ因子<sup>[28]</sup>。近年来,中国国内学者也开始研究表达Ⅶ因子的工作,林方昭等<sup>[29-30]</sup>在CHO细胞中表达并得到重组Ⅶ因子,产量达到0.3 μg/mL。

### 2.3 CHO细胞外重组Ⅶ因子表达体系

除CHO细胞外,研究者还尝试其他细胞和方法表达重组Ⅶ因子。在Ⅶ因子合成过程中,需要对其Gla区中的10个谷氨酸进行γ羧基化,不完全的γ羧基化会直接影响表达的重组Ⅶ因子的活性,因此有研究者将Ⅶ因子与催化γ羧基化相关的VKORC1共同在HEK 293细胞中表达,同时利用RNA干扰技术沉默抑制γ羧基化酶活性的蛋白calumenin,将修饰完全的重组Ⅶ因子表达量由9%提高至68%<sup>[31]</sup>。Mirzaahmadi等<sup>[32]</sup>在蜥蜴*Leishmania*细胞中表达重组Ⅶ因子并检测其活性,证实昆虫细胞中具有表达重组Ⅶ因子的可行性。然而昆虫细胞与哺乳动物细胞具有一定的差异,因此在表达外源蛋白时还需考察细胞对蛋白翻译后修饰的影响。昆虫细胞*Spodoptera frugiperda*缺乏表达γ羧基化酶的能力,而维生素K依赖蛋白需要γ

羧基化酶完成  $\gamma$  羧基化使其具有生物活性, 因此研究人员通过与重组 VII 因子共表达人  $\gamma$  羧基化酶来解决这一问题, 最终得到了具有生物活性的重组 VII 因子<sup>[33]</sup>。除了利用多种细胞表达重组 VII 因子外, 还有研究尝试在转基因动物中进行表达, Hwang 等<sup>[34]</sup> 利用基因微注射技术将含有 VII 因子编码基因的质粒注入至斑马鱼、非洲鲶鱼和罗非鱼的成熟鱼卵中, 多种检测方法结果表明在所有实验的鱼胚胎中都有重组 VII 因子的表达, 其中罗非鱼胚胎中得到的重组 VII 因子平均浓度达到 214.7 ng/mL, 此研究为表达重组 VII 因子提供了其他选择。

### 3 重组 VII 因子在 CHO 细胞中合成的机制

经过多年的研究, 人们已对 VII 因子的结构有深入的了解, VII 因子由 406 个氨基酸组成, 可在蛋白酶的催化下在 152 ~ 153 位点切为轻链和重链, 两条链由 135 ~ 262 之间的二硫键连接, 轻链中包括富含  $\gamma$  羧基化位点的 Gla 区、与上皮生长因子相似的 EGF1 和 EGF2 区和 CR 区, 重链主要为 VII 因子的催化区域。VII 因子的分子修饰包括  $\gamma$  羧基化和 N、O 糖基化, Gla 区包含 10 个  $\gamma$  羧基化位点, N 糖基化位点为 CR 区的 N145 和重链上的 N322, 而 O 糖基化位点为 EGF1 区的 Ser52 和 Ser60。由于上述修饰对 VII 因子活性有重要的影响, 因此有诸多学者针对合成过程中修饰对合成的影响展开了研究。

#### 3.1 重组 VII 因子中 N-糖基化的差异

脉冲追踪技术可以分析和检测分子在细胞内的合成过程, 诺和诺德公司的研究人员利用该技术研究了 VII 因子在 CHO 细胞中的合成过程, 并对合成过程中分子的修饰情况进行了阐述。Bolt 等<sup>[35]</sup> 在研究 VII 因子的 N 糖基化发现 N145 和 N322 位点的糖基化方式不同, 胞内合成的 VII 因子显示为两条相对分子质量不同的条带, 经蛋白糖苷酶 PNGase F 处理形成相对分子质量低于上述两条带的单一条带, 同时随着时间变化两条条带合并为同一条带, 表明两条条带是由 VII 因子蛋白糖基化修饰水平不同引起的。为研究 N145 和 N322 位点的糖基化方式, 在 CHO 中表达的 VII 因子中的 N145 和 N322 分别替换为谷氨酰胺, 发现仅缺少 N145 的 VII 因子在胞内形成两条相对分子质量不同的条带, 但未见于缺少 N322 的 VII 因子中, 因此认为 VII 因子中 N145 位点的糖基化是伴随翻译过程进行, 而 N322 则是

在 ER 上翻译后修饰后完成的。之所以 N322 糖基化相比 N145 要缓慢的多, 可能是因为翻译后形成的重组 VII 因子蛋白构象并不适于 N322 的糖基化, 因此需要改变构象使 N322 糖基化位点更适于寡糖转移酶的催化。

#### 3.2 翻译后修饰对重组 VII 因子表达的影响

为研究 VII 因子糖基化和蛋白前肽对合成的影响, Bolt 等<sup>[36]</sup> 将 VII 因子中的 N 和 O 糖基化位点氨基酸分别替换为谷氨酰胺和丙氨酸, 结果发现分别替换 N 或 O 糖基化位点氨基酸会导致 VII 因子表达水平下降 80%, 同时替换 N 和 O 糖基化位点氨基酸会下降 96.7% 左右, 并且 4 个糖基化位点氨基酸中任何一个氨基酸的替换都会导致不同程度的 VII 因子表达水平下降和降解。表达 VII 因子的 CHO 细胞在经华法令和缺少维生素 K 条件下阻断  $\gamma$  羧基化的进行后发现, 未完成的  $\gamma$  羧基化会导致胞内 VII 因子的减少和胞外分泌 VII 因子比例失衡, 经添加胞内蛋白酶体和溶酶体抑制剂后增加了胞内检测到的 VII 因子, 表明  $\gamma$  羧基化的阻断会导致未完成  $\gamma$  羧基化的 VII 因子胞内的降解, 同时引起胞外分泌水平的降低, 此结果说明了  $\gamma$  羧基化对 VII 因子合成的重要性。与此相对的是, 前肽对 VII 因子表达并无明显影响, 通过加入 VII 因子前肽切除蛋白 furin 的抑制剂使合成的 VII 因子保留前肽, 发现无论是胞内还是胞外, 与未添加 furin 抑制剂的结果无明显差异。

#### 3.3 限制重组 VII 因子表达量提高的因素

Bolt 等<sup>[37]</sup> 为研究限制 VII 因子重组表达的瓶颈, 在对 VII 因子合成过程进行分析后发现, VII 因子中 N322 糖基化是在内质网中完成, 同时分子伴侣 GRP78 参与蛋白折叠。在之前的研究中作者已经推测 N322 的糖基化与蛋白的折叠可能是同时进行<sup>[35]</sup>, 因此 N322 糖基化速度较慢成为限制 VII 因子的合成速度。除糖基化外,  $\gamma$  羧基化是 VII 因子的另一个重要修饰, 经脉冲追踪和免疫沉淀分析发现, 胞外分泌得到的 VII 因子蛋白皆为糖基化和  $\gamma$  羧基化修饰完全, 阻断  $\gamma$  羧基化后形成的大量未修饰蛋白积累于胞内并被降解并有少部分被分泌于胞外, 而 VII 因子在胞内内质网中完成  $\gamma$  羧基化大约需要 3 h 以上, 因此是否完成  $\gamma$  羧基化是 VII 因子转运出 ER 的重要条件, 也是 VII 因子合成的主要限速步骤<sup>[37]</sup>。此外, 在胞内发现了单一 N 糖基化修饰

的Ⅶ因子蛋白,说明 N322 糖基化是否完成并非Ⅶ因子  $\gamma$  羧基化的前提条件,因此  $\gamma$  羧基化过程缓慢主要是增加Ⅶ因子在 ER 中的停留时间,以使其更加充分的折叠和 N322 糖基化,未完成修饰的蛋白随即在胞内降解以保证分泌于胞外的蛋白皆修饰完全。在分析 N322 糖基化时发现,胞内合成的Ⅶ因子可被 Endo H 去除 N 糖基化的糖链,但分泌于胞外的Ⅶ因子对 Endo H 具有抗性,这是由于Ⅶ因子在转运出 ER 后进入高尔基体进行添加其他糖链的修饰,因此蛋白具有 Endo H 抗性,在胞内进行柠檬酸钡沉淀时发现,所有完成  $\gamma$  羧基化的Ⅶ因子蛋白都具有 Endo H 抗性,表明Ⅶ因子在  $\gamma$  羧基化完成后立即进入高尔基体,因此在Ⅶ因子合成过程中至少存在 N 糖基化修饰与蛋白折叠和  $\gamma$  羧基化两个瓶颈。

#### 4 结 语

随着研究者对重组Ⅶ因子研究的不断深入,该药物除应用于血友病治疗之外,已在临床中有了更为广泛的应用。作为一种生物药剂,重组Ⅶ因子合成过程的深入研究,有助于开发相应的策略和技术手段降低生产成本,有效降低治疗病人所需费用,使其拥有更为广泛的应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting[J]. *Science*, 1964, **145**(3638):1310-1312.
- [2] Hoffman M, Pawlinski R. Hemostasis: old system, new players, new directions[J]. *Thromb Res*, 2014, **133**(Suppl 1):S1-S2.
- [3] Repke D, Gemmell CH, Guha A, et al. Hemophilia as a defect of the tissue factor pathway of blood coagulation: effect of factors VIII and IX on factor X activation in a continuous-flow reactor[J]. *PNAS*, 1990, **87**(19):7623-7627.
- [4] Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis-implications for therapy[J]. *Anesthesiology*, 2004, **100**(3):722-730.
- [5] Dijk K, Fischer K, Bom JG, et al. Variability in clinical phenotype of severe haemophilia: the role of the first joint bleed[J]. *Haemophilia*, 2005, **11**(5):438-443.
- [6] Hedner U, Lee C. First 20 years with recombinant FVIIa (NovoSeven)[J]. *Haemophilia*, 2011, **17**(1):172-182.
- [7] Coppola A, Di Capua M, Di Minno MND, et al. Treatment of hemophilia: a review of current advances and ongoing issues[J]. *J Blood Med*, 2010, **1**:183-195.
- [8] Nilsson I, Hedner U, Björln G. Suppression of factor IX antibody in hemophilia B by factor IX and cyclophosphamide[J]. *Ann Intern Med*, 1973, **78**(1):91-95.
- [9] Hedner U, Nilsson I, Bergentz S. Various prothrombin complex concentrates and their effect on coagulation and fibrinolysis in vivo[J]. *Thromb Haemost*, 1976, **35**(2):386-395.
- [10] Hedner U, Nilsson I, Bergentz S. Studies on the thrombogenic activities in two prothrombin complex concentrates[J]. *Thromb Haemost*, 1979, **42**(3):1022-1032.
- [11] Osterud B, Miller-Andersson M, Abildgaard U, et al. The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation factors VII, IX and X[J]. *Thromb Haemost*, 1976, **35**(2):295-304.
- [12] Hedner U, Glazer S, Pingel K, et al. Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe haemophilia A during synovectomy[J]. *Lancet*, 1988, **2**(8621):1193.
- [13] Lusher J, Ingerslev J, Roberts H, et al. Clinical experience with recombinant factor VIIa[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998, **9**(2):119-128.
- [14] Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, et al. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor[J]. *Br J Haematol*, 1997, **99**(3):542-547.
- [15] Hedner U. Factor VIIa and its potential therapeutic use in bleeding-associated pathologies[J]. *Thromb Haemost*, 2008, **100**(4):557-562.
- [16] Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa[J]. *Blood Rev*, 2003, **17**(Suppl 1):S1-S5.
- [17] Lisman T, Mosnier LO, Lambert T, et al. Inhibition of fibrinolysis by recombinant factor VIIa in plasma from patients with severe hemophilia A[J]. *Blood*, 2002, **99**(1):175-179.
- [18] He S, Blomback M, Ekman BG, et al. The role of recombinant factor VIIa(FVIIa) in fibrin structure in the absence of FVIII/FIX[J]. *J Thromb Haemost*, 2003, **1**(6):1215-1219.
- [19] Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII[J]. *PNAS*, 1986, **83**(8):2412-2416.
- [20] Berkner K, Busby S, Davie E, et al. Isolation and expression of cDNAs encoding human factor VII[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1986, **51**:531-541.
- [21] Jurlander B, Thim L, Klausen NK, et al. Recombinant activated factor VII (rFVIIa): characterization, manufacturing, and clinical development[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2001, **27**(4):373-383.
- [22] Hedner U, Ljungberg J, Lund-Hansen T. Comparison of the effect of plasma-derived and recombinant human FVIIa in vitro and in a rabbit model[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1990, **1**(2):145-151.
- [23] Omasa T, Onitsuka M, Kim WD. Cell engineering and cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, **11**(3):233-240.
- [24] Kim JY, Kim YG, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further poten-

tial[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*,2012,**93**(3):917-930.

[25] Berkner KL. Expression of recombinant vitamin-k-dependent proteins in mammalian-cells factor-IX and factor-VII[J]. *Methods Enzymol*,1993,**222**:450-477.

[26] Kemball-Cook G, Garner I, Imanaka Y, *et al*. High-level production of human blood-coagulation factor-VII and factor-XI using a new mammalian expression vector[J]. *Gene*,1994,**139**(2):275-279.

[27] Kazama Y, Hamamoto T, Foster DC, *et al*. Hepsin, a putative membrane-associated serine-protease, activates human factor-VII and initiates a pathway of blood-coagulation on the cell-surface leading to thrombin formation[J]. *J Biol Chem*,1995,**270**(1):66-72.

[28] Halabian R, Roudkenar MH, Esmacili NS, *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):309-315.

[29] Xiao W, Li F, Li C, *et al*. Construction of the expression vector for recombinant human coagulation factor VII[J]. *Vox Sang*,2012,**103**(Suppl 1):145-145.

[30] Xiao W, Li CQ, Xiao XP, *et al*. Expression and fast preparation of biologically active recombinant human coagulation factor VII in CHO-K1 cells[J]. *Genet Mol Res*,2013,**12**(4):6813-6824.

[31] Wajih N, Owen J, Wallin R. Enhanced functional recombinant factor VII production by HEK 293 cells stably transfected with VKORC1 where the gamma-carboxylase inhibitor calumenin is stably suppressed by shRNA transfection[J]. *Thromb Res*,2008,**122**(3):405-410.

[32] Mirzaahmadi S, Asaadi-Tehrani G, Bandehpour M, *et al*. Expression of recombinant human coagulation factor VII by the lizard *Leishmania* expression system[J]. *J Biomed Biotechnol*,2011,**2011**:873-874.

[33] Masroori N, Halabian R, Mohammadipour M, *et al*. High-level expression of functional recombinant human coagulation factor VII in insect cells[J]. *Biotechnol Lett*,2010,**32**(6):803-809.

[34] Hwang GL, Muller F, Rahman MA, *et al*. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos[J]. *Mar Biotechnol*,2004,**6**(5):485-492.

[35] Bolt G, Kristensen C, Steenstrup TD. Posttranslational N-glycosylation takes place during the normal processing of human coagulation factor VII[J]. *Glycobiology*,2005,**15**(5):541-547.

[36] Bolt G, Steenstrup TD, Kristensen C. All post-translational modifications except propeptide cleavage are required for optimal secretion of coagulation factor VII[J]. *Thromb Haemost*,2007,**98**(5):988-997.

[37] Bolt G, Kristensen C, Steenstrup TD. More than one intracellular processing bottleneck delays the secretion of coagulation factor VII[J]. *Thromb Haemost*,2008,**100**(2):204-210.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》入选中国药学双核心期刊方阵

近期,本刊连续收到北京大学《中文核心期刊要目总览》(2014年版)编委会和中国科学引文数据库(CSCD)(核心库)的通知,《中国药科大学学报》先后被这两个核心库收录,在《中文核心期刊要目总览》中位列药理学类核心期刊第5名,全国仅9家药学期刊同时入围。

表1 中国中文核心期刊(北京大学)和CSCD核心库药学期刊名单(9种)

期刊名称	ISSN	出版地
药物分析杂志	0254-1793	北京
药学报	0513-4870	北京
中国临床药理学杂志	1001-6821	北京
中国新药与临床杂志	1007-7669	上海
中国药科大学学报	1000-5048	南京
中国药理学通报	1001-1978	合肥
中国药理学与毒理学杂志	1000-3002	北京
中国药学杂志	1001-2494	北京
中国医药工业杂志	1001-8255	上海

(本刊讯)