

稳定表达人 ACE2 的 Huh-7 细胞系的建立及应用

郎巧利^{1,2}, 黄楠^{1,2}, 李莉萍^{1,2}, 杨希^{1,2}, 刘春麟^{3*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 中国重庆 402460; 2. 重庆市医用动物资源的开发与利用工程技术研究中心, 中国重庆 402460;
3. 重庆医科大学附属第二医院 眼科, 中国重庆 400010)

摘要: 为了构建稳定表达人血管紧张素转换酶 2 (human angiotensin converting enzyme 2, hACE2) 的 Huh-7 细胞系, 本研究构建了不带荧光的 pWPXL-neo-hACE2 慢病毒载体, 并利用 psPAX2 和 pMD2.G-VSVG 共同转染 HEK293T 细胞获得慢病毒; 将包装好的慢病毒感染 Huh-7 细胞后, 利用潮霉素 B 筛选获得可表达 hACE2 的 Huh-7 细胞; 通过间接免疫荧光法和蛋白质印迹法检测 Huh-7 细胞中 hACE2 蛋白的表达; 采用流式细胞术分析 Huh-7-hACE2 细胞与严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 刺突 (spike, S) 蛋白受体结合结构域 (receptor-binding domain, RBD) 的结合情况, 并用 SARS-CoV-2 假病毒进一步测定 Huh-7-hACE2 细胞对 SARS-CoV-2 的易感性, 最后利用鉴定过的 Huh-7-hACE2 细胞测定 SARS-CoV-2 中和抗体 REGN10987 对假病毒的中和效价。结果显示, hACE2 蛋白在 Huh-7 细胞中成功表达, 且表达的 hACE2 蛋白能与 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 结合; 相较于 Huh-7 细胞, Huh-7-hACE2 细胞对假病毒的易感性显著提高, 且假病毒中和效价测定结果与文献报道的真病毒中和效价相似。总之, 本研究成功构建了稳定表达 hACE2 的 Huh-7 细胞系, 并且其能应用于新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 治疗性单抗的活性评价, 是研究 SARS-CoV-2 的致病机制、开发抗病毒药物及疫苗的有利工具。

关键词: 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2); 人血管紧张素转换酶 2 (hACE2); Huh-7 细胞; 慢病毒感染; 稳定转染细胞系; 治疗性抗体

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0189-07

Establishment and Application of Huh-7 Cell Line with Stable Expression of Human ACE2

LANG Qiaoli^{1,2}, HUANG Nan^{1,2}, LI Liping^{1,2}, YANG Xi^{1,2}, LIU Chunlin^{3*}

(1. Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China; 2. Chongqing Research Center for the Development and Utilization of Medical Animal Resources, Chongqing 402460, China; 3. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: To construct Huh-7 cell line stably expressing human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2), the pWPXL-neo-hACE2 lentiviral vector without a fluorescent protein gene was constructed and co-transfected into HEK293T cells with psPAX2 and pMD2.G-VSVG to generate lentivirus. The obtained lentivirus particles were used to infect Huh-7 cells, and the cells that could stably express hACE2 protein were selected with hygromycin B. The expression of hACE2 in Huh-7 cells was detected by indirect immunofluorescence assay and Western-blot. Furthermore, the binding activity of Huh-7-hACE2 cells to the receptor-binding domain (RBD) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike (S) protein was analyzed by flow cytometry, and the susceptibility of Huh-7-hACE2 cells to SARS-CoV-2 was further determined with SARS-CoV-2 pseudovirus. The identified Huh-7-hACE2 cells were finally used in

收稿日期: 2022-07-22; 修回日期: 2022-11-28; 网络首发日期: 2023-03-06

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2021jcyj-msxmX0881); 畜禽养殖关键技术与示范推广项目 (22509C, 22503C, 22513C, 21504); 重庆市科研机构绩效激励引导专项项目 (cstc2021jxjl0017, cstc2021jxjl80009); 国家自然科学基金资助项目 (32000130)

作者简介: 郎巧利 (1991—), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生; * 通信作者: 刘春麟 (1982—), 女, 重庆人, 主要从事重大传染病与护理研究, E-mail: 570037067@qq.com。

evaluating the neutralizing capacity of SARS-CoV-2 neutralizing antibody REGN10987 against pseudovirus. The results showed that the hACE2 protein was successfully expressed in Huh-7 cells, and the expressed hACE2 protein could bind to SARS-CoV-2 S protein RBD. Compared with Huh-7 cells, Huh-7-hACE2 cells were more susceptible to SARS-CoV-2 pseudovirus infection, and the neutralizing activity evaluated with pseudovirus was similar to that with SARS-CoV-2 reported in the literature. In conclusion, the study demonstrated that the Huh-7 cell line stably expressing hACE2 was successfully established, and could be used to evaluate the activity of corona virus disease 2019 (COVID-19) therapeutic monoclonal antibody. The established cell line is a useful tool to study the pathogenesis of SARS-CoV-2 and develop antiviral drugs and vaccines.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2); Huh-7 cell; lentiviral infection; stably transfected cell line; therapeutic antibody
(*Life Science Research*, 2023, 27(3): 189-195)

自 2019 年以来, 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 在全球迅速传播, 导致了新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 的全球大流行^[1-2]。目前, SARS-CoV-2 的传播、感染和发病仍无法控制, 截至 2022 年 11 月, 全球 COVID-19 确诊病例已经超过 6 亿, 累计病死病例超过 600 万 (<https://covid19.who.int/>, 2022-11-28), 其对人类的健康、经济和社会发展都造成了严重的危害。SARS-CoV-2 是单链正义 RNA 病毒, 基因组长度约 30 kb, 结构蛋白包括核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)、膜蛋白 (membrane protein, M)、包膜蛋白 (envelope protein, E) 和刺突蛋白 (spike protein, S), S 蛋白包含两个功能性亚基 S1 和 S2, 其中 S1 负责与宿主细胞受体结合, S2 负责病毒膜和细胞膜融合。S1 由 N 端结构域 (N-terminal domain, NTD) 和受体结合结构域 (receptor-binding domain, RBD) 组成, 对决定组织嗜性和宿主范围至关重要^[3]。

血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 是 I 型膜结合糖蛋白, 大小约 92.5 kD, 是介导 SARS-CoV-2 进入细胞的关键受体, 其通过与 SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD 结合, 介导病毒进入宿主细胞^[4-7]。多项研究将 ACE2 蛋白过表达至 HEK293T、BHK21、HeLa、A549 等细胞表面, 以增加细胞对 SARS-CoV-2 的易感性, 进而开展病毒感染机制及治疗性单抗的研究^[8-12]。

Huh-7 是人肝癌细胞系, 于 1982 年从一名 57 岁日本男性肝癌患者的肝癌组织中分离获得, 可作为体外模型对多种病毒进行药物筛查。在 SARS-CoV-2 抗病毒药物和感染机制的研究中,

Huh-7 细胞系也是理想的体外模型^[13-19]。但目前罕见 ACE2 蛋白过表达 Huh-7 细胞系构建的报道, 本研究前期发现 Huh-7 细胞系本身的 ACE2 蛋白表达量不高, 对 SARS-CoV-2 假病毒的感染活性也不高。因此, 构建稳定表达人 ACE2 (human ACE2, hACE2) 的 Huh-7 细胞系可提升其对 SARS-CoV-2 的易感性, 可为研究 SARS-CoV-2 的致病机制、开发抗病毒药物及疫苗等提供有利工具。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293T 细胞株和 Huh-7 细胞株均购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 大肠杆菌 JM109 感受态细胞购自日本 Takara 公司。

其他主要实验材料包括: PrimeSTAR 酶、BamH I 和 EcoR I 限制性内切酶、无缝连接试剂盒 (Takara 公司, 日本); 胰酶、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、DMEM 培养基 (武汉普诺赛生命科技有限公司); 胎牛血清 (BI 公司, 以色列); 潮霉素 B、萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); pCMV3-hACE2 质粒、anti-hACE2-FITC 抗体、anti-GAPDH 抗体 (北京义翘神州科技股份有限公司); pWPXL-EF1-EGFP 质粒、psPAX2 质粒、pMD2.G-VSVG 质粒 (上海海吉浩格生物科技有限公司); Lipofectamine 3000 转染试剂、P3000TM 增强剂、Opti-MEM 培养、anti-mouse IgG 荧光二抗 (Thermo Fisher 公司, 美国); SARS-CoV-2 S-RBD 蛋白 (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司); REGN10987 新冠中和抗体 (武汉普健生物科技有限公司)。

1.2 pWPXL-neo-hACE2 重组质粒的构建及鉴定

以购自北京义翘神州科技股份有限公司的 pCMV3-hACE2 质粒为模板,用上游引物 5'-AG-GTTTAAACTACGGGATCCGCCACCATGTCAAGC-TCTTCCTGGCT-3'和下游引物 5'-ATGACTAGT-CCCGGAATTCGTCGACGGTATACAGACATGATAAGATACATTG-3'扩增 *hACE2-neo* 片段。反应条件: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。*hACE2-neo* 片段经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,并切胶回收。将 pWPXL-EF1-EGFP 质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,切除含增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)编码基因的 DNA 片段,回收载体片段。利用无缝连接酶将 *hACE2-neo* 片段和载体片段在 56 °C 连接 15 min,转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞,获得 pWPXL-neo-hACE2 阳性菌,送至北京擎科生物科技股份有限公司重庆分公司测序。

1.3 pWPXL-neo-hACE2 慢病毒的包装

选取生长状态良好的 HEK293T 细胞,以 1×10^9 L⁻¹ 接种至 6 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,当汇合度约 50% 时开始转染。转染复合物的准备:取 2 μg 慢病毒重组质粒 pWPXL-neo-hACE2、1.5 μg 辅助质粒 psPAX2、0.5 μg 辅助质粒 pMD2.G-VSVG、8 μL P3000™ 增强剂加入 250 μL Opti-MEM 培养基中,另取一管 250 μL Opti-MEM 培养基,加入 7 μL Lipofectamine 3000 转染试剂,将两管溶液轻柔混合均匀后室温静置 10~15 min。将转染复合物加入细胞中轻轻混匀,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 12~16 h 后,更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。48 h 后在 4 °C 条件下 2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞上清,0.45 μm 滤膜过滤后-80 °C 保存备用。

1.4 稳定过表达 *hACE2* 基因的 Huh-7 细胞的筛选和建立

利用包装的 pWPXL-neo-hACE2 慢病毒感染 Huh-7 细胞。感染前 1 d,取生长状态良好的 Huh-7 细胞,以 2×10^8 L⁻¹ 接种于 24 孔板,待细胞生长至汇合度为 50%~60%,加入 200 μL 慢病毒原液进行感染,并设置不加慢病毒的对照组。感染后 12~16 h 更换为 DMEM 完全培养基,感染后 48 h 将 Huh-7 细胞以 1×10^8 L⁻¹ 传至 24 孔板,培养 24 h

后更换为含 800 mg/L 潮霉素 B 的 DMEM 完全培养基,继续培养 7~14 d,期间每两天更换含潮霉素 B 的新鲜培养基,直至对照组全部死亡,而慢病毒感染组长出可见抗性克隆。用无菌克隆环挑取单细胞形成的克隆,消化传代直至细胞稳定生长,收集细胞进行后续实验。

1.5 间接免疫荧光法鉴定 Huh-7 细胞中 *hACE2* 蛋白的表达

将 Huh-7 未转染细胞和 Huh-7-hACE2 细胞分别以 5×10^7 L⁻¹ 接种至 96 孔板,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。弃上清,加入 4% 多聚甲醛,室温固定 1 h。PBS 清洗 3 次,加入 anti-hACE2-FITC 抗体并于 37 °C 孵育 1 h, PBS 再次清洗 3 次后于徕卡 DMi8 倒置显微镜下观察荧光情况。

1.6 蛋白质印迹法检测 Huh-7 细胞中 *hACE2* 蛋白的表达

分别收集 1×10^6 个 Huh-7 未转染细胞和 Huh-7-hACE2 细胞制备蛋白质样品,并按照 BCA 蛋白质定量试剂盒测定总蛋白质浓度。取 30 μg 蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,电泳后将蛋白质转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,再分别加入 anti-hACE2-FITC 抗体和 anti-GAPDH 抗体,4 °C 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次,加入 anti-mouse IgG 荧光二抗,室温避光孵育 1 h; PBST 洗膜 3 次,于 Odyssey CLx 双色红外激光成像系统中扫描成像。

1.7 Huh-7-hACE2 细胞与 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 的结合活性分析

分别收集 5×10^4 个 Huh-7 未转染细胞和 Huh-7-hACE2 细胞,1 500 r/min 离心 3 min,收集细胞沉淀,用含 2% 胎牛血清的 PBS 清洗 1 次。用 S-RBD-FITC 在 4 °C 条件下避光孵育 30 min,1 500 r/min 离心 3 min 后收集细胞沉淀,用含 2% 胎牛血清的 PBS 清洗两次。将细胞重悬至 400 μL 含 2% 胎牛血清的 PBS 中,利用 BD FACSVerser™ 流式细胞仪分析 Huh-7-hACE2 细胞系与 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 的结合活性。

1.8 SARS-CoV-2 假病毒感染实验

将 Huh-7 未转染细胞和 Huh-7-hACE2 细胞分别以 1×10^8 L⁻¹ 接种至 96 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h; 待细胞长至单层,按 50 μL/孔分别加入实验室自制的 SARS-CoV-2 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)假病毒(B.1.1.7)和 SARS-CoV-2 荧光素酶假病毒(B.1.1.7),并按

50 μL 孔补入 DMEM 完全培养基; 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中感染 12~16 h 后, 更换为 DMEM 完全培养基; 继续感染 48 h 后, 利用徠卡 DMi8 倒置显微镜观察 GFP 假病毒感染情况, 并裂解荧光素酶假病毒感染细胞, 12 000 r/min 离心 3 min, 收集裂解液, 加入萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂, 于 Synergy H1 多功能酶标仪中读取各孔相对光单位(relative light unit, RLU)值(R)。

1.9 Huh-7-hACE2 细胞系在假病毒中和实验中的应用

取 96 孔细胞培养板, 用 DMEM 完全培养基将 REGN10987 新冠中和抗体分别稀释为 100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L 和 0.001 mg/L, 每个抗体稀释度设置 3 个重复, 每个孔的终体积为 100 μL 。同时, 设置细胞对照和病毒对照孔, 对照不参与倍比稀释。用 DMEM 完全培养基稀释 SARS-CoV-2 荧光素酶假病毒(B.1.1.7), 使病毒对照孔荧光素酶报告基因的 RLU 读值($R_{\text{假病毒对照}}$)控制在 200 000~400 000; 除细胞对照孔外, 其余孔每孔加入 50 μL 的 DMEM 完全培养基。将 96 孔细胞培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。取 Huh-7-hACE2 细胞进行消化、计数, 按 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 将细胞接种至孵育后的细胞培养板, 加入细胞体积为 50 μL 。至此, 每个孔的总体积为 200 μL 。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中感染 12~16 h 后, 更换为 DMEM 完全培养基(100 μL /孔)。继续感染 48 h 后, 加入细胞裂解液裂解细胞, 12 000 r/min 离心 3 min, 收集裂解液, 加入萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂, 于 Synergy H1 多功能酶标仪中读取各孔 RLU 值(R)。计算中和百分率($P_{\text{中和}}$), 绘制中和曲线, 并将中和 50% SARS-CoV-2 假病毒的最高抗体稀释度作为抗体的假病毒中和效价。假病毒中和百分率($P_{\text{假病毒中和}}$)的计算公式为: $P_{\text{假病毒中和}} = (R_{\text{假病毒对照}} - R_{\text{实验}}) / (R_{\text{假病毒对照}} - R_{\text{细胞对照}}) \times 100\%$ 。

1.10 统计学分析

用 GraphPad Prism 6.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组样本间的平均数比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pWPXL-neo-hACE2 慢病毒载体

为了构建 pWPXL-neo-hACE2 慢病毒载体, 以 pCMV3-hACE2 质粒为模板, 扩增 *hACE2-neo*

目的片段, 结果获得大小约 5 300 bp 的条带, 与预期的大小一致(图 1A)。将 pWPXL-EF1-EGFP 质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切, 切除含 *EGFP* 荧光基因的片段, 结果获得大小约 9 600 bp 的条带, 与预期的大小一致(图 1B)。将两个片段无缝连接, 获得 pWPXL-neo-ACE2 载体, 经测序比对证明载体构建成功(图 1C)。

2.2 成功构建 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系

利用 anti-hACE2-FITC 抗体, 通过间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)鉴定 Huh-7-hACE2 细胞中 hACE2 的表达, 结果显示, Huh-7-hACE2 细胞的荧光显著强于对照组 Huh-7 细胞(图 2A)。进一步通过蛋白质印迹法(Western-blot)鉴定 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系中 hACE2 的表达, 结果显示, 在 Huh-7-hACE2 细胞中检测到与 hACE2 预期大小(约 92 kD)一致的条带, 而 Huh-7 对照组细胞中未能检测到清晰条带, 证明 hACE2 蛋白在 Huh-7-hACE2 细胞中高表达(图 2B)。综上可知, 本研究成功构建了稳定表达 hACE2 蛋白的 Huh-7 细胞系。

2.3 Huh-7-hACE2 细胞系可与 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 高效结合

SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 是与 ACE2 蛋白结合并介导病毒进入宿主细胞的主要作用区域, 为检测 Huh-7-hACE2 细胞系中过表达的 hACE2 蛋白的生物活性, 本研究利用流式细胞术鉴定 Huh-7-hACE2 细胞与硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的 S-RBD 蛋白的结合活性。结果显示, Huh-7-hACE2 细胞的荧光强度显著高于 Huh-7 对照组细胞, 其阳性率约 77.05%, 证明 Huh-7-hACE2 细胞与 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 的结合活性显著高于 Huh-7 对照组细胞(图 3)。

2.4 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系在假病毒感染实验中的应用

为了验证 Huh-7-hACE2 细胞对 SARS-CoV-2 假病毒的易感性, 本研究将 Huh-7-hACE2 细胞和 Huh-7 对照细胞同时感染 SARS-CoV-2 GFP 假病毒(携带 GFP 荧光)和 SARS-CoV-2 荧光素酶假病毒(携带荧光素酶)。荧光显微镜的观察结果显示, Huh-7-hACE2 细胞能感染 SARS-CoV-2 GFP 假病毒, 而 Huh-7 对照细胞基本不能感染(图 4A)。荧光素酶报告基因的检测结果显示, 与 Huh-7 对照细胞相比, Huh-7-hACE2 细胞对 SARS-CoV-2 荧光素酶假病毒的易感性显著提高(图 4B)。进一

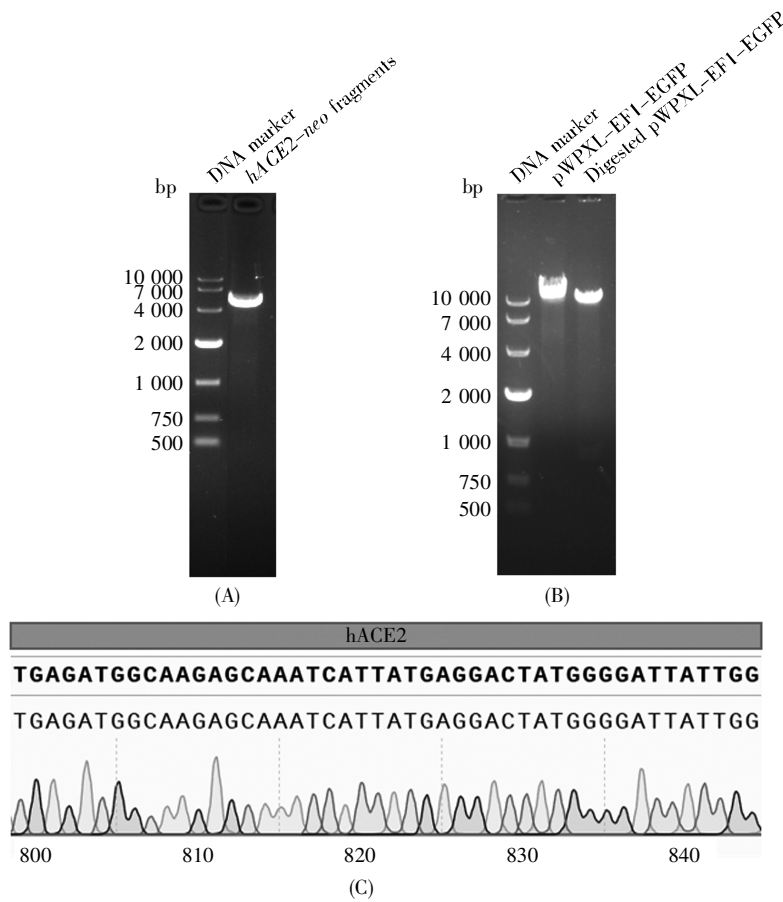


图 1 pWPXL-neo-hACE2 载体的构建及鉴定

(A) *hACE2-neo* 片段的 PCR 扩增; (B) *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 pWPXL-EF1-EGFP 载体; (C) 部分 pWPXL-neo-hACE2 载体测序及与 *hACE2* 基因比对结果。

Fig.1 Construction and identification of pWPXL-neo-hACE2 vector

(A) PCR amplification of *hACE2-neo* fragment; (B) pWPXL-EF1-EGFP digested by *Bam*H I/*Eco*R I; (C) Partial sequencing of pWPXL-neo-hACE2 vector and sequence alignment with the *hACE2* gene.

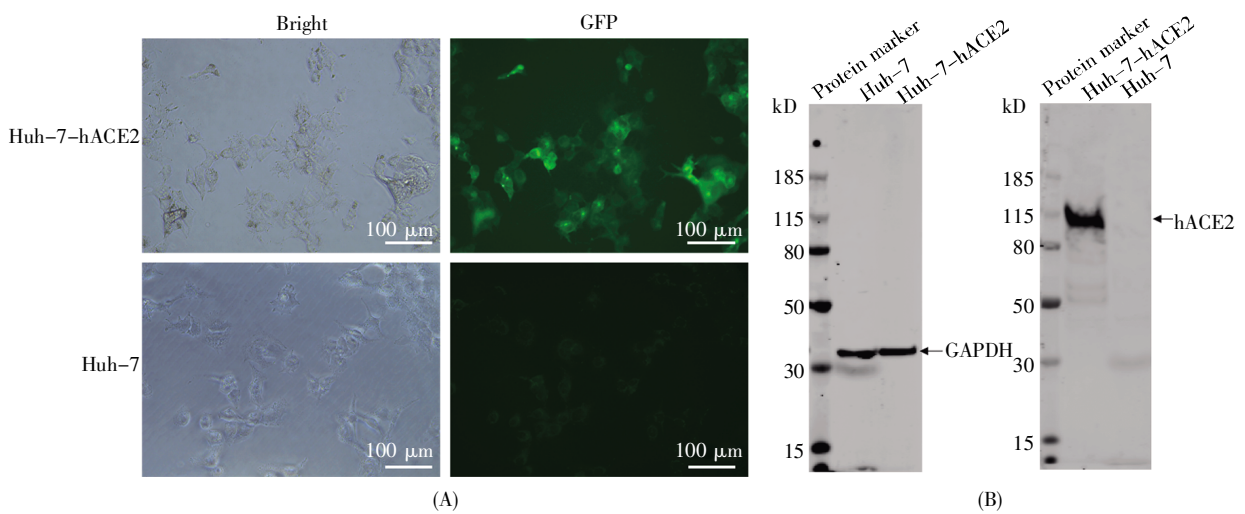


图 2 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系中 hACE2 蛋白的表达鉴定

(A) 间接免疫荧光法鉴定 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系中 hACE2 蛋白的表达; (B) 蛋白质印迹法鉴定 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系中 hACE2 蛋白的表达。

Fig.2 Identification of the expression level of hACE2 protein in Huh-7-hACE2 cells

(A) Identification of the expression level of hACE2 protein in Huh-7-hACE2 cells by IFA; (B) Identification of the expression level of hACE2 protein in Huh-7-hACE2 cells by Western-blot.

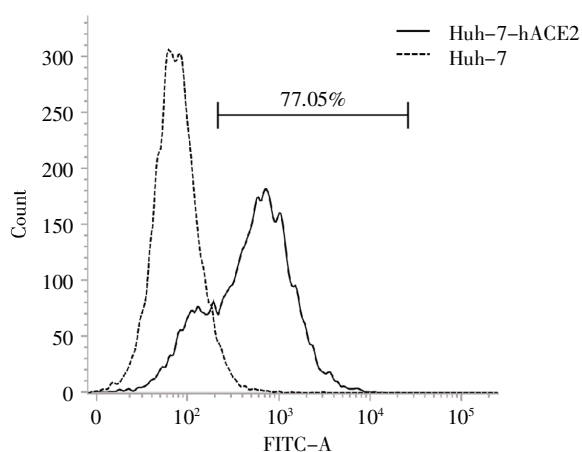


图3 流式细胞术鉴定 Huh-7-hACE2 细胞与 S 蛋白 RBD 的结合活性

Fig.3 Identification of the binding activity of Huh-7-hACE2 cells with S protein RBD by flow cytometry

步将获得的 Huh-7-hACE2 细胞应用于 SARS-CoV-2 中和抗体 REGN10987 的假病毒中和效价检测,结果显示,REGN10987 抗体的假病毒(B.1.1.7)

中和效价为 35.13 $\mu\text{g/L}$ (图 4C), 与 REGN10987 抗体对 SARS-CoV-2 B.1.1.7 真病毒的中和效价^[20-21]相似,表明 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系可应用于 SARS-CoV-2 的中和效价检测。

3 讨论

研究发现, SARS-CoV-2 是通过 S 蛋白 RBD 与 ACE2 蛋白结合后,由 ACE2 蛋白介导进入的宿主细胞^[4-7]。多项研究表明,将 ACE2 蛋白过表达至细胞表面,可以增加细胞对 SARS-CoV-2 的易感性, hACE2 过表达细胞系可以应用于病毒感染机制及治疗性单抗等研究。Shang 等^[8]构建了稳定表达 hACE2 的 HEK293T 细胞系,并建立了一种无病毒的体外系统,以研究 SARS-CoV-2 的 S 蛋白与宿主细胞之间的相互作用。黄楠等^[9]构建了稳定表达 hACE2 的 HEK293T 细胞系,该细胞能够有效感染 SARS-CoV-2 假病毒,可作为探究病毒感染机制的有利工具。Xiong 等^[10]构建了稳定表达

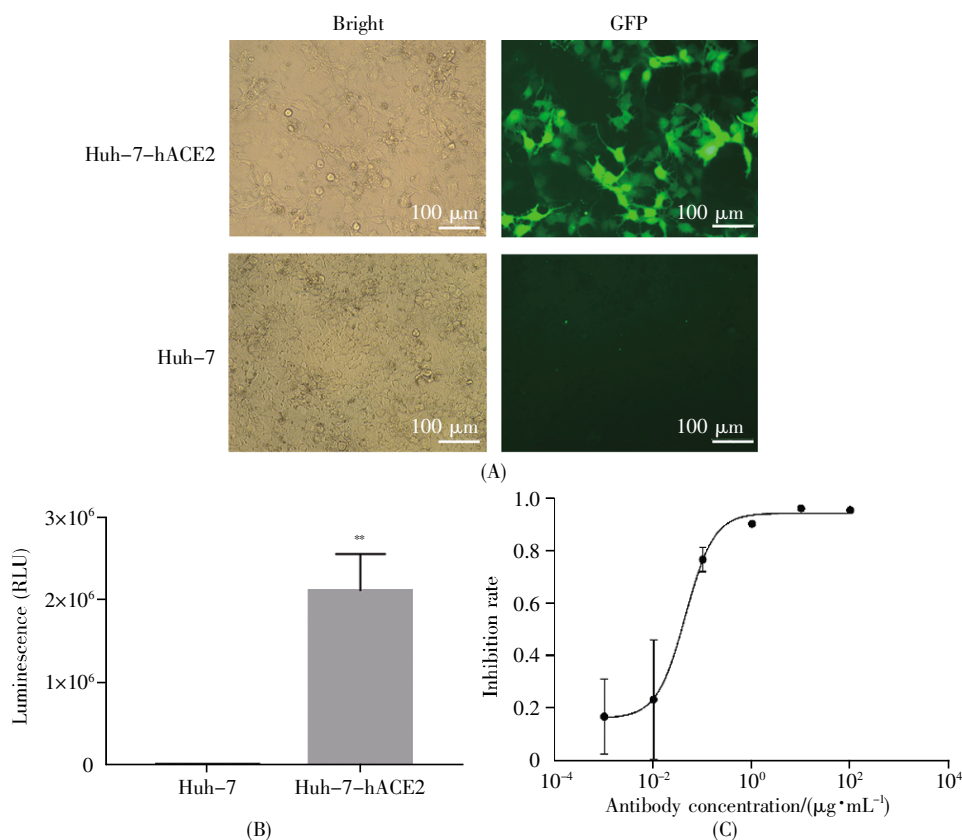


图4 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系在假病毒感染实验中的应用

(A) Huh-7-hACE2 细胞对 SARS-CoV-2 GFP 假病毒的易感性验证; (B) Huh-7-hACE2 细胞对 SARS-CoV-2 荧光素酶假病毒的易感性验证, **: $P < 0.01$; (C) Huh-7-hACE2 细胞在假病毒中和实验中的应用。

Fig.4 Application of Huh-7-hACE2 stably transfected cell line in pseudoviral infection experiments

(A) Verification of the susceptibility of Huh-7-hACE2 cells to SARS-CoV-2 GFP pseudoviruses; (B) Verification of the susceptibility of Huh-7-hACE2 cells to SARS-CoV-2 luciferase pseudoviruses, **: $P < 0.01$; (C) Application of Huh-7-hACE2 cells in pseudovirus neutralization assay.

hACE2 的 BHK21-hACE2 细胞系, 并以此建立了高效可靠的 VSV-SARS-CoV-2-Sdel18 假病毒中和检测模型。Zhou 等^[11]通过构建稳定表达 ACE2 的 HeLa 细胞系, 证实 SARS-CoV-2 是通过与 SARS-CoV 相同的 ACE2 受体进入细胞。Puhl 等^[12]构建了稳定表达 hACE2 的 A549 细胞系, 并利用其测试了埃博拉和马尔堡病毒的 3 种药物。

Huh-7 细胞系在 SARS-CoV-2 药物和疫苗的研究中是理想的体外模型, 已经被用于瑞德西韦、氯喹、连花清瘟等多种抗病毒药物的治疗潜力验证^[13-15]。同时, Huh-7 细胞系也被广泛应用于 SARS-CoV-2 的易感性研究、发病和传播机制研究等^[16-19]。但本研究发现, Huh-7 细胞系本身的 ACE2 蛋白表达量不高, 对 SARS-CoV-2 假病毒的感染活性也不高(图 4A~B)。若转入 ACE2 蛋白, 构建稳定表达 hACE2 的 Huh-7 细胞系, 则可提升 Huh-7 细胞对 SARS-CoV-2 的易感性(图 4A~B), 更利于进行病毒感染机制及治疗性单抗研究。

慢病毒转染法可以将外源基因随机整合进基因组, 相比磷酸钙转染法和脂质体转染法等, 其外源基因整合入基因组的效率更高, 是构建稳定表达细胞系的最优方法。因此, 本研究首先构建了无荧光慢病毒载体 pWPXL-neo-hACE2 (图 1), 并将其成功包装成慢病毒感染 Huh-7 细胞, 获得稳定过表达 hACE2 蛋白的 Huh-7 细胞系(图 2)。随后, 通过流式细胞术验证了过表达的 hACE2 蛋白与 SARS-CoV-2 S 蛋白的 RBD 具有结合活性(图 3), 并利用 Huh-7-hACE2 稳定转染细胞系成功测定了 SARS-CoV-2 中和抗体 REGN10987 的假病毒中和效价, 其结果(图 4)与真病毒的中和效价基本一致。

综上所述, 本研究建立了 hACE2 的慢病毒转染方法, 成功构建了稳定表达 hACE2 的 Huh-7 细胞系, 且该细胞系能应用于 COVID-19 治疗性单抗的活性评价, 为今后 SARS-CoV-2 的致病机制研究, 以及抗病毒药物和疫苗的开发等提供了有利的工具。

参考文献(References):

- [1] ZHU N, ZHANG D Y, WANG W L, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(8): 727-733.
- [2] HUANG C L, WANG Y M, LI X W, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [3] WANG M Y, ZHAO R, GAO L J, *et al.* SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 587269.
- [4] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.e8.
- [5] SAPONARO F, RUTIGLIANO G, SESTITO S, *et al.* ACE2 in the era of SARS-CoV-2: controversies and novel perspectives[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7: 588618.
- [6] BASU A, SARKAR A, MAULIK U. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 17699.
- [7] BENTON D J, WROBEL A G, XU P Q, *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion[J]. *Nature*, 2020, 588(7837): 327-330.
- [8] SHANG Y N, CHEN F X, LI S S, *et al.* Investigation of interaction between the spike protein of SARS-CoV-2 and ACE2-expressing cells using an in vitro cell capturing system[J]. *Biological Procedures Online*, 2021, 23(1): 16.
- [9] 黄楠, 郎巧利, 李莉萍, 等. 稳定表达 hACE2 的 293T 细胞系的建立及功能分析[J]. *中国细胞生物学学报*(HUANG Nan, LANG Qiaoli, LI Liping, *et al.* Establishment and functional analysis of 293T cell lines stably expressing human ACE2[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(2): 306-313.
- [10] XIONG H L, WU Y T, CAO J L, *et al.* Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-protein-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressing BHK21 cells[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 2105-2113.
- [11] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [12] PUHL A C, FRITCH E J, LANE T R, *et al.* Repurposing the Ebola and Marburg virus inhibitors tilorone, quinacrine and pyronaridine: *in vitro* activity against SARS-CoV-2 and potential mechanisms[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(11): 7454-7468.
- [13] LI R F, HOU Y L, HUANG J C, *et al.* Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2)[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 156: 104761.
- [14] TAO S, ZANDI K, BASSIT L, *et al.* Comparison of anti-SARS-CoV-2 activity and intracellular metabolism of remdesivir and its parent nucleoside[J]. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 2021, 2: 100045.
- [15] SHANG C, ZHUANG X Y, ZHANG H, *et al.* Inhibitors of endosomal acidification suppress SARS-CoV-2 replication and relieve viral pneumonia in hACE2 transgenic mice[J]. *Virology Journal*, 2021, 18: 46.
- [16] FENG X L, YU D D, ZHANG M, *et al.* Characteristics of replication and pathogenicity of SARS-CoV-2 Alpha and Delta isolates[J]. *Virologica Sinica*, 2022, 37(6): 804-812.
- [17] ZHOU Y Q, WANG K, WANG X Y, *et al.* SARS-CoV-2 pseudovirus enters the host cells through spike protein-CD147 in an Arf6-dependent manner[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1135-1144.
- [18] FONNESU R, THUNUGUNTLA V B S C, VEERAMACHANENI G K, *et al.* Palmitoylethanolamide (PEA) inhibits SARS-CoV-2 entry by interacting with S protein and ACE-2 receptor[J]. *Viruses*, 2022, 14(5): 1080.
- [19] SAIZ M L, DEDIEGO M L, LOPEZ-GARCIA D, *et al.* Epigenetic targeting of the ACE2 and NRP1 viral receptors limits SARS-CoV-2 infectivity[J]. *Clinical Epigenetics*, 2021, 13: 187.
- [20] WANG P F, NAIR M S, LIU L H, *et al.* Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7[J]. *Nature*, 2021, 593(7857): 130-135.
- [21] TADA T, DCOSTA B M, ZHOU H, *et al.* Decreased neutralization of SARS-CoV-2 global variants by therapeutic anti-spike protein monoclonal antibodies[J]. *bioRxiv*, 2021 [2022-11-28]. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.02.18.431897>.