

# 稳定表达hACE2的293T细胞系的建立及功能分析

黄楠<sup>1</sup> 郎巧利<sup>1</sup> 李莉萍<sup>1</sup> 杨希<sup>1</sup> 刘春麟<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; <sup>2</sup>重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

**摘要** 该研究旨在利用hACE2真核表达载体, 通过电转法获得具有新型冠状病毒易感性的稳定表达hACE2的293T细胞株。将线性表达质粒pCMV-hACE2电转至293T细胞, 经潮霉素B筛选后, 利用间接免疫荧光(IFA)、RT-PCR、Western blot、流式分析法鉴定hACE2的表达, S-RBD蛋白和SARS-CoV-2假病毒分析细胞功能活性。利用250 µg/mL潮霉素B筛选获得了稳定高表达hACE2的细胞系293T-hACE2-D4。在该细胞中, RT-PCR检测到了大量hACE2基因的mRNA, Western blot、间接免疫荧光和流式分析法检测细胞表面hACE2蛋白表达情况(阳性细胞率为86.86%)。功能分析中, 293T-hACE2-27-D4细胞不仅能够与SARS-CoV-2 S-RBD蛋白相结合(结合率达84.26%), 并且能够成功感染新型冠状病毒假病毒。该研究构建的稳定表达hACE2的293T细胞不仅能与S-RBD蛋白结合, 还对新冠假病毒具有易感性, 是探究病毒感染机制的有利工具。

**关键词** hACE2; 稳定转染; 293T细胞; 新型冠状病毒

## Establishment and Functional Analysis of 293T Cell Lines Stably Expressing Human ACE2

HUANG Nan<sup>1</sup>, LANG Qiaoli<sup>1</sup>, LI Liping<sup>1</sup>, YANG Xi<sup>1</sup>, LIU Chunlin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract** The aim of this study was to generate a 293T cell line stably expressing human ACE2 and analyze its function. Stably transfected cells were selected by Hygromycin B resistance, and expression of hACE2 in them was determined by IFA (indirect immunofluorescence), RT-PCR, Western blot and FACS (flow cytometry). SARS-CoV-2-S-RBD protein and SARS-CoV-2 S pseudovirus were used to analyze stably transfected function of cell lines. A 293T cell line stably expressing human ACE2 (named as 293T-hACE2-D4) was generated in this study. The mRNA of hACE2 was expressed in 293T-hACE2-27-D4 cells. Human ACE2 protein was highly expressed on surface of 293T-hACE2-27-D4 cells by flow cytometry (the rate of ACE2-positive cells was 86.86%). Furthermore, most 293T-hACE2-27-D4 cells (the binding rate was 84.26%) showed high binding activity with SARS-CoV-2 S-RBD protein by FACS analysis. Results of pseudovirus infection showed that SARS-CoV-2 S pseudovirus could successfully infect 293T-hACE2-27-D4 cells, but not infect 293T cells. This study provides a useful tool for exploring the mechanism of SARS-CoV-2 virus infection.

**Keywords** human ACE2; stable transfection; 293T cells; SARS-CoV-2

收稿日期: 2021-11-23

接受日期: 2021-12-28

重庆市自然科学基金面上项目(批准号: cstc2021jcyj-msxmX0876、cstc2020jcyj-msxmX0776)、重庆市科研机构绩效激励引导专项(批准号: cstc2021jxj10017)和国家自然科学基金(批准号: 32000130)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13618268962, E-mail: 570037067@qq.com

Received: November 23, 2021 Accepted: December 28, 2021

This work was supported by the General Project of Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2021jcyj-msxmX0876, cstc2020jcyj-msxmX0776), the Chongqing Special Fund for Performance Incentive Guide (Grant No.cstc2021jxj10017) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32000130)

\*Corresponding author. Tel: +86-13618268962, E-mail: 570037067@qq.com

新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19, 简称新冠肺炎)是由新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)引起的急性感染性肺炎。鉴于SARS-CoV-2感染能力之强, 传播速度之快, COVID-19被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)定义为“大流行”<sup>[1-2]</sup>。此次“大流行”给人类的健康及生活带来了极大危害。尽管目前已有多款疫苗能够显著降低COVID-19感染死亡率<sup>[3]</sup>, 但每天仍有数十万的人被感染, 诸多患者感染后遗留的症状将长期甚至终身影响其生活质量<sup>[4]</sup>。因此, 攻克COVID-19不能止步于疫苗, 需要开展更多的研究, 共同解决这一人类的难题。

SARS-CoV-2是 $\beta$ 冠状病毒属的一种, 为正义单链RNA病毒<sup>[5]</sup>。其中, 引起机体免疫反应的主要蛋白为病毒表面刺突糖蛋白(spike protein, S蛋白), 它在病毒感染机体过程中起着至关重要的作用。其中, S蛋白的S1亚基包含受体结合区域(receptor-binding domain, RBD), 其能够与宿主细胞的血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)等受体结合, 从而促进S2亚基介导病毒和细胞的膜融合过程, 进而介导病毒侵入靶细胞<sup>[6-7]</sup>。因此, S蛋白是疫苗设计、抗体和诊断试剂开发等的关键靶标<sup>[7-10]</sup>。

ACE2是一种I型膜结合糖蛋白, 位于多种细胞表面, 其生理功能是将血管紧张素II转化为血管紧张素1-7<sup>[11-13]</sup>, 参与血管收缩、增殖、纤维化、炎症调节等多个生理过程, 是肾素-血管紧张素(renin-angiotensin system, RAS)体液调节系统中的关键酶<sup>[14-16]</sup>。早在非典时期, ACE2已被证实是SARS-CoV-1入侵细胞的关键受体<sup>[17]</sup>, 在肺部表现为高表达<sup>[18]</sup>。近两年, 人们对于SARS-CoV-2入侵宿主细胞的相关机制研究成果颇丰。在针对SARS-CoV-2的研究中发现, 其与SARS-CoV-1有同样的细胞受体即ACE2<sup>[19]</sup>, 且通过解析RBD与ACE2复合物的晶体结构发现, SARS-CoV-2与ACE2受体的亲和力是SARS-CoV-1的10~20倍<sup>[20]</sup>。另有研究表明, 感染SARS-CoV-2还会导致ACE2表达下调<sup>[21]</sup>, 但ACE2表达上调或下调与新冠肺炎易感性之间的关系尚未有明确的结论。

为了更好地探索研究SARS-CoV-2侵入细胞的机制, 本研究拟构建一种稳定的过表达人ACE2的293T细胞系, 通过研究其与S蛋白的相互作用以及感染新型冠状病毒假病毒(简称新冠假病毒)的活性,

评价获得的细胞系的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 293T细胞、Huh-7细胞、DMEM培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 真核表达质粒pCMV-hACE2购自北京义翘神州生物科技股份有限公司; 青-链霉素、限制性内切酶Sal I、anti-mouse IgG购自Thermo Fisher Scientific公司; 胎牛血清购自Biological Industries公司; 潮霉素B(Hygromycin B)、萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; DMSO购自Sigma-Aldrich公司; Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V购自Lonza公司; 质粒提取试剂盒购自Omega公司; anti-ACE2-FITC购自金斯瑞生物科技有限公司; RT-PCR Kit购自TaKaRa公司; RNA提取试剂盒购自Qiagen公司; SARS-CoV-2-S-RBD购自近岸生物技术有限公司; SARS-CoV-2 SARS-CoV-2 Spike Pseudotyped Virus(GFP-Luciferase)由吉满生物科技(上海)有限公司友情赠送。

### 1.2 方法

1.2.1 线性化真核表达质粒pCMV-hACE2的获得 将质粒穿刺菌划线并活化后进行质粒抽提, 通过限制性内切酶Sal I将质粒酶切并进行琼脂糖凝胶电泳, 通过胶回收获得线性化的pCMV-hACE2表达质粒。

1.2.2 293T细胞Hygromycin B筛选浓度的确定 293T细胞培养至对数生长期, 收集细胞并计数, 以 $5 \times 10^5$ 个/孔的密度接种至24孔板, 将Hygromycin B浓度设置如下梯度: 0、50、150、250、350、450、550、650、750、850、950、1 050  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对293T细胞进行加压筛选, 每2天换1次液, 并观察细胞状态, 选择14天后全部死亡的最低Hygromycin B浓度为最佳筛选浓度。

1.2.3 293T细胞转染及稳定表达株的筛选 将293T细胞培养至对数生长期(汇合度达50%~70%), 收集细胞并计数, 以 $1 \times 10^6$ 个/管分装至离心管中, 根据Amaxa™ Cell Line Nucleofector™ Kit V(Lonza)说明书向重悬后的细胞中加入1  $\mu\text{g}$ 质粒混匀, 转入转染瓶中, 电击10 s, 向电转后的细胞中加入0.5 mL预热的培养基并混匀, 将转染瓶中混合液转移到24孔板培养, 设置未转染的293T细胞作对照。转染48 h后更换含有250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hygromycin B的培养液进行

培养。每隔2天更换1次筛选培养液,培养7天后,得到含Hygromycin B抗性的阳性细胞,将细胞扩大培养,扩大培养后均使用含125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hygromycin B培养液维持筛选。

**1.2.4 RT-PCR检测转染后pCMV-hACE2的表达** 分别提取野生型293T细胞与转染后阳性细胞的总RNA,利用反转录试剂盒(TaKaRa)将两种细胞的总RNA分别反转录为cDNA,以0.5  $\mu\text{g}$  cDNA为模板,利用hACE2基因引物(上游引物为5'-GAG GAT CGA ACC CTT GAA TTA TGT CAA GCT CTT CCT GGC T-3',下游引物为5'-AGG GAT CGA ACC CTT AAG CTT TTA AAA GGA GGT CTG AAC ATC AT-3')进行PCR,以GAPDH基因(上游引物为5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3',下游引物为5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3')作为内参。反应程序:98  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min,将产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.2.5 293T-hACE2稳定转染细胞系阳性克隆初筛** 为了筛选阳性细胞,每种细胞取部分细胞用间接免疫荧光法(IFA)分析hACE2的表达,步骤如下:将293T-hACE2细胞与293T细胞以 $2\times 10^4$ 个细胞的量分别同时接种至96孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,加入4%多聚甲醛,室温固定细胞1 h, PBST洗2次,将SARS-CoV-2-S-RBD-FITC以稀释为4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的量加入96孔板中与细胞4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,弃去上清,加入100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的PBS,利用荧光显微镜DMi8观察荧光情况。选取阳性率高的细胞克隆,利用有限稀释法将生长状态良好的293T-hACE2细胞(细胞存活率 $>90\%$ )进行单克隆,将细胞稀释至密度为0.5个/100  $\mu\text{L}$ 后铺至96孔板中37  $^{\circ}\text{C}$ 培养12天,其间使用CloneSelect<sup>TM</sup> Imager分别在培养第0、1、2、12天对克隆进行细胞成像记录,当细胞培养12天后,分析克隆生长监测成像数据,筛选出单克隆,将单克隆细胞扩大培养。

**1.2.6 Western blot检测293T-hACE2稳定转染细胞系ACE2蛋白的表达情况** 分别取 $1\times 10^6$ 个未转染的293T细胞与293T-hACE2细胞进行裂解,加入150  $\mu\text{L}$ 细胞裂解液以及终浓度为1 mmol/L PMSF裂解细胞,12 000  $\times\text{g}$ 离心5 min,收集上清,测定裂解液中总蛋白的浓度,取30  $\mu\text{L}$ 上清液加入4 $\times$  SDS上样缓冲液(loading buffer),10 $\times$ 还原剂,80  $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min。将

制备好的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳及转膜,将PVDF膜用5%脱脂奶粉进行封闭,anti-ACE2抗体(1:200)和内参抗体GAPDH Rabbit mAb(1:1 000)分别作为一抗进行4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, PBST洗3次,加入二抗anti-mouse IgG(1:5 000),室温孵育1 h,利用Odyssey-CLX进行成像。

**1.2.7 流式分析293T-hACE2稳定转染细胞系ACE2蛋白的表达** 将未转染的293T细胞与转染后阳性细胞分别以 $1\times 10^5$ 个细胞的量与anti-ACE2-FITC或S-RBD-FITC避光孵育30 min,1 000 r/min离心3 min后,2% FBS洗2次,将细胞重悬至5 mL流式管中。利用BD FACS Vers<sup>TM</sup> Flow Cytometer分析293T-hACE2稳定转染细胞系中hACE2蛋白表达情况,以野生型的293T细胞作阴性对照。

**1.2.8 293T-hACE2稳定转染细胞系在假病毒感染实验中的应用** 将生长状态良好的293T-hACE2和293T细胞分别以 $2\times 10^4$ 个细胞的量接种至96孔板,37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,小心吸去上清。取假病毒(TCID<sub>50</sub>= $1\times 10^7$ ) 5  $\mu\text{L}$ 稀释至1 mL,将稀释后的假病毒以100  $\mu\text{L}$ 的量加入96孔板的细胞中,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育6 h后,弃去病毒并更换新鲜的DMEM完全培养基继续培养48 h。感染48 h后,通过荧光显微镜(DMi8)观察GFP荧光,消化细胞并计数活细胞数,向孔内加入100  $\mu\text{L}$ 细胞裂解液裂解细胞,收集细胞裂解液,12 000  $\times\text{g}$ 离心3 min,取70  $\mu\text{L}$ 上清至黑色的96孔板,加入萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂(碧云天),利用Biotek酶标仪检测发光情况。

**1.2.9 数据分析** 采用Graphpad 6.0软件对实验数据进行图表制作。

## 2 结果

### 2.1 hACE2表达盒的获得

为了获得线性化的hACE2表达盒,将真核表达质粒pCMV-hACE2由Sal I进行酶切(图1),获得两条大小分别为6 281 bp和2 185 bp的条带,将含有hACE2表达盒的目的片段(6 281 bp)进行切胶及回收,获得线性化的hACE2表达盒DNA。

### 2.2 293T细胞Hygromycin B筛选浓度的确定

将293T细胞接种至24孔板里进行最佳Hygromycin B筛选浓度的测定。对照组中未添加Hygromycin B,细胞生长良好;实验组中,添加Hygromycin B后,细胞在第5天开始大量死亡,第7天时250  $\mu\text{g}/\text{mL}$

组中细胞死亡率已达90%, 在第14天时能全部杀死细胞的Hygromycin B最低浓度为250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 因此293T细胞的Hygromycin B最佳筛选浓度为250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图2)。

### 2.3 293T细胞的转染与293T-hACE2阳性细胞系初筛

将线性化后的hACE2表达盒DNA片段用电穿孔的方法转染293T细胞, 同时设置未转染细胞作对照, 在250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Hygromycin B抗性压力下, 经过14天的筛选, 共获得56个稳定转染细胞克隆。我们

利用IFA的方法初步筛选了阳性细胞克隆。在稳转后的细胞中有hACE2表达的荧光信号, 而野生型的293T几乎无荧光信号, 其中27号克隆荧光最强(图3A)。同时, 为了检测细胞中hACE2基因的mRNA表达情况, 本实验分别提取了293T-hACE2-27细胞株和野生型293T细胞的RNA并将其反转录为cDNA, 通过PCR检测了hACE2的mRNA表达情况。结果显示, 293T-hACE2-27细胞株hACE2基因条带大小为2 459 bp, 与预期符合, 而野生型293T细胞hACE2基因条带非常弱, 几乎看不见, 说明hACE2基

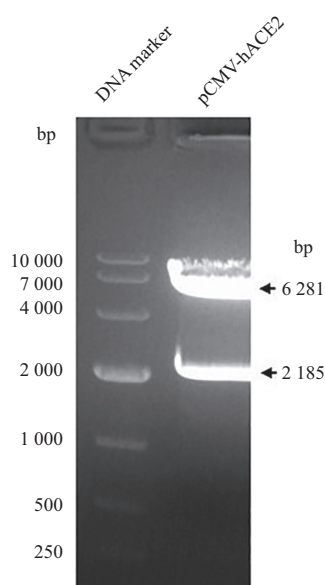


图1 pCMV-hACE2的Sal I酶切图

Fig.1 The graph of pCMV-hACE2 digested by Sal I

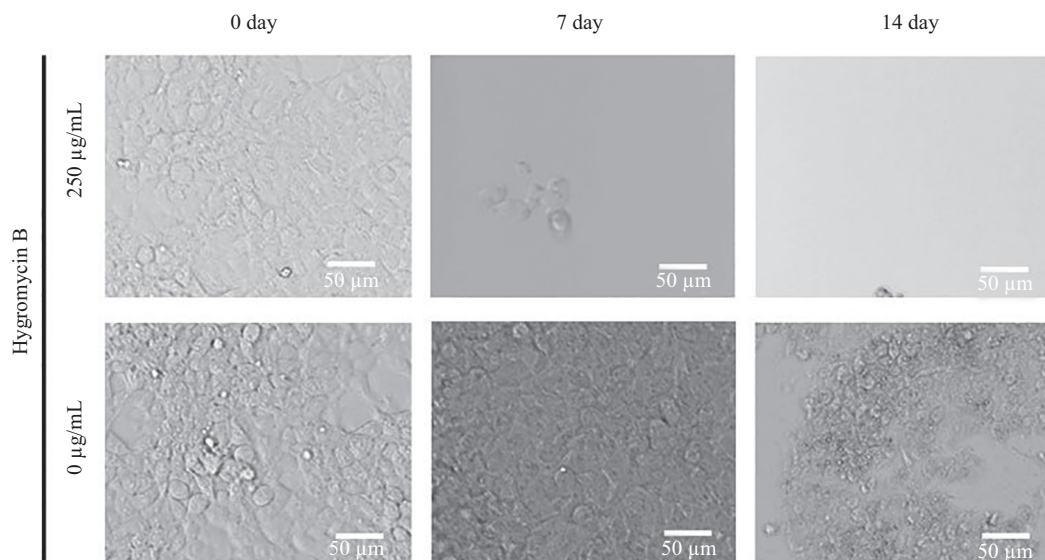


图2 Hygromycin B筛选浓度确定

Fig.2 Determination of the Hygromycin B screening concentration

因已成功转入293T-hACE2-27细胞株(图3B)。

进一步,我们将27号克隆进行了单克隆化,用IFA法检测细胞表面hACE2蛋白的表达,选取荧光最强的单克隆细胞进行连续传代20代以上,获得一株稳定表达hACE2的细胞,将其命名为293T-hACE2-D4(图3A)。

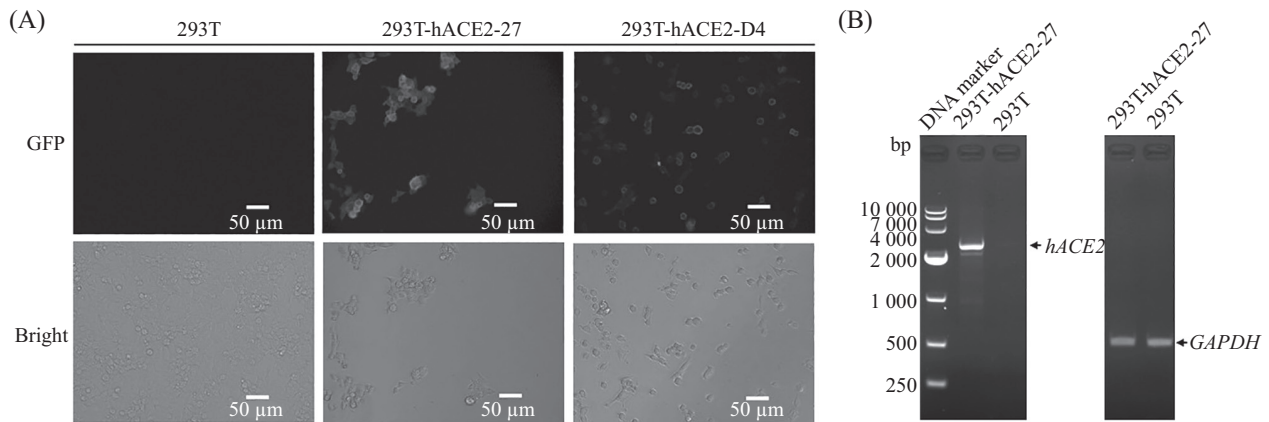
## 2.4 293T-hACE2稳定转染细胞表面hACE2的表达及鉴定

为检测hACE2蛋白在稳定转染细胞表面的表达情况,本研究利用Western blot和流式分析分别从蛋白水平和细胞水平对hACE2蛋白的表达进行了

鉴定。Western blot结果显示, hACE2蛋白在 293T-hACE2-D4细胞中高表达, 蛋白大小为92.48 kDa, 在 293T细胞中未能检测到清晰条带(图4)。流式分析结果显示, 与293T野生型细胞相比, 293T-hACE2-D4细胞中的hACE2蛋白表达量明显提高, 细胞阳性率为86.86%(图5)。

## 2.5 293T-hACE2稳定转染细胞系的功能分析

SARS-CoV-2 S-RBD蛋白是体外研究病毒侵入的关键蛋白。为了检测获得的293T-hACE2-D4稳定转染细胞系在体外与SARS-CoV-2 S-RBD蛋白的结合活性, 本研究利用SARS-CoV-2 S-RBD-FITC分别与



A: 间接免疫荧光法筛选阳性克隆; B: RT-PCR验证阳性克隆中hACE2基因的表达。

A: screening of positive clones was detected by indirect immunofluorescence; B: verification of *hACE2* gene expression in positive clones was detected by RT-PCR.

图3 293T-hACE2阳性细胞的筛选与鉴定

Fig.3 Screening and identification of 293T-hACE2 positive cells

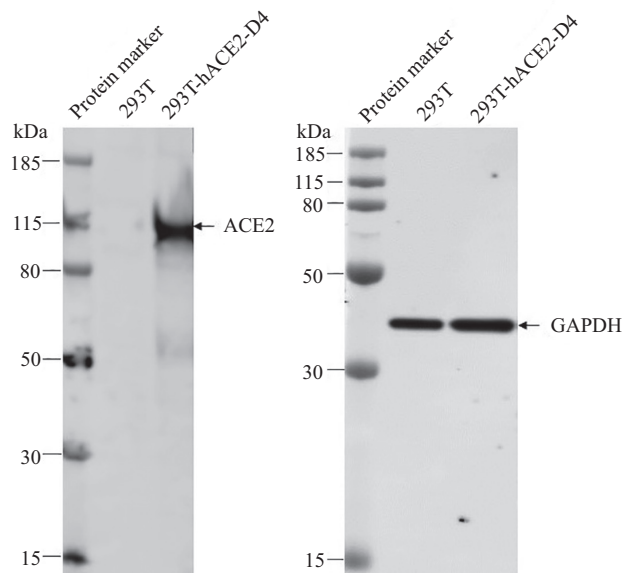


图4 Western blot鉴定293T-hACE2-D4细胞中hACE2的表达

Fig.4 Western blot analysis of hACE2 protein expression level in 293T-hACE2-D4 cells

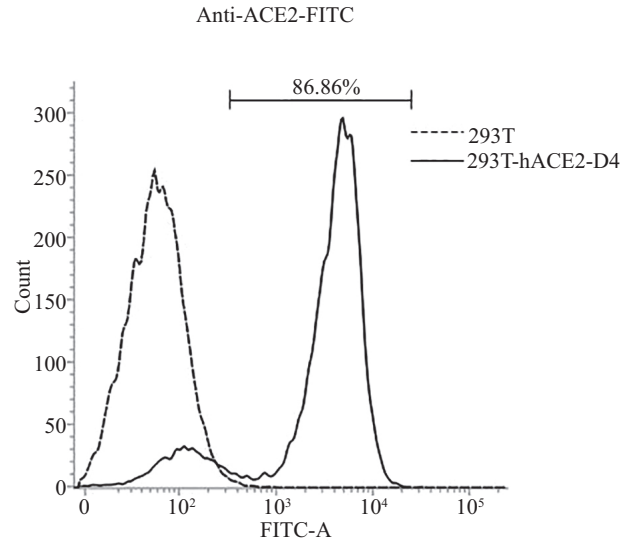


图5 流式分析293T-hACE2-D4细胞表面hACE2的表达

Fig.5 Flow cytometry analysis of the expression level of hACE2 on the surface of 293T-hACE2-D4 cells

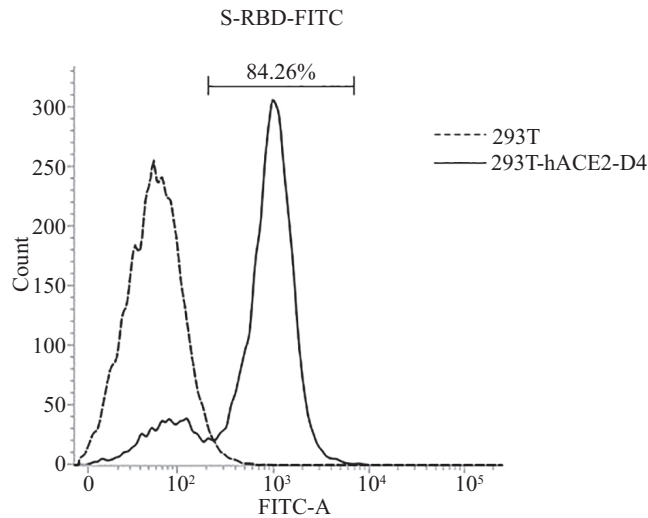


图6 293T-hACE2-D4细胞与S-RBD蛋白的结合作用

Fig.6 Binding activity analysis of 293T-hACE2-D4 cells and S-RBD protein

野生型293T细胞和293T-hACE2-D4细胞孵育后进行流式分析。结果显示, 稳定转染细胞株293T-hACE2-D4与SARS-CoV-2 S-RBD-FITC蛋白结合活性显著高于野生型293T细胞, 其阳性率为84.26%(图6)。

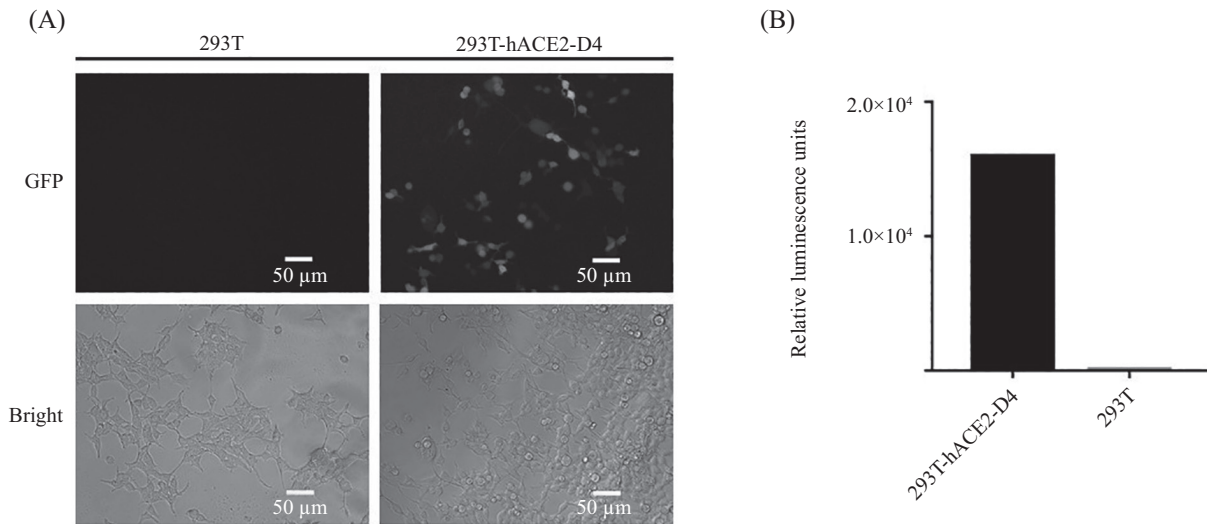
为了检测293T-hACE2-D4细胞对新型冠状病毒假病毒的感染活性, 本研究将293T-hACE2-D4与野生型293T同时感染SARS-CoV-2(2019-nCoV) S蛋白假病毒, 该假病毒同时携带GFP荧光和Luciferase荧光素酶报告基因。荧光检测结果显示, 293T细胞几乎不被假病毒感染, 而293T-hACE2-D4细胞株能够被感染(图7A); 荧光素酶报告基因检测结果表明, 293T-hACE2-D4细胞株的RLU值是野生型293T细胞

的146倍(图7B)。

### 3 讨论

新型冠状病毒引起的肺炎大流行席卷全球, 对人类的生活带了巨大的危害。SARS-CoV-2的S蛋白是SARS-CoV-2侵入细胞的主要蛋白。S蛋白可以以高亲和力结合细胞表面hACE2蛋白<sup>[22]</sup>, 从而促使病毒完成侵入靶细胞的过程<sup>[18,23-24]</sup>。为了更好地探索研究SARS-CoV-2侵入细胞的机制, 本研究拟构建一种稳定高表达hACE2的293T细胞系, 并对其功能进行评价。

研究表明, 分子量较小的线性DNA比环状质粒



A: 免疫荧光验证293T-hACE2-D4对新型冠状病毒假病毒的易感性; B: 萤火虫荧光素报告酶实验验证293T-hACE2-D4对新型冠状病毒假病毒的易感性。

A: Immunofluorescence verified the susceptibility of 293T-hACE2-D4 to SARS-CoV-2 pseudovirus; B: firefly luciferase reporter experiment verified the susceptibility of 293T-hACE2-D4 to SARS-CoV-2 pseudovirus.

图7 293T-hACE2-D4细胞对SARS-CoV-2假病毒易感性的分析

Fig.7 Analysis of the susceptibility of 293T-hACE2-D4 cells to SARS-CoV-2 pseudovirus

DNA更容易且更稳固地插入到细胞基因中<sup>[25]</sup>。本研究为了获得能够稳定传代的转染细胞系,选择利用限制性内切酶Sal I酶切获得hACE2线性表达盒DNA(图1),再通过电转的方法转入293T细胞中。转染后细胞用Hygromycin B进行稳定转染细胞系筛选后获得56个克隆,IFA方法检测发现第27号克隆表面ACE2检测荧光最亮(图3A),因此选择该克隆进一步做单克隆化。最终获得了稳定表达ACE2的单克隆细胞株293T-hACE2-D4。我们利用Western blot分析发现,该细胞表面能够高表达hACE2蛋白(图4),野生型293T细胞中本身也有极少量hACE2表达,但本实验中Western blot结果中未能检测到清晰条带,可能是由于细胞量上样较少的原因,但同时也说明了293T-hACE2-D4细胞能够高表达ACE2蛋白。流式分析结果显示,虽然293T-hACE2-D4是由一个细胞生长而获得的,但流式分析结果中293T-hACE2-D4细胞与anti-ACE2抗体结合的细胞阳性率为86.86%(图5),阳性率不能完全达到100%,这可能是由于在传代过程中,某些细胞hACE2基因丢失造成的,因此该细胞株培养时仍然需要加压培养。而过高的压力会导致细胞形态差,无法正常生长。因此为了即保证细胞的阳性率,又保证细胞生长正常,本研究选择125 μg/mL Hygromycin B压力下培养。结果显示,获得的稳定转染细胞293T-hACE2-D4连续传20代后,仍然能保

持80%以上细胞的阳性率。

为了验证293T-hACE2-D4细胞株的功能,本研究检测293T-hACE2-D4细胞与S-RBD蛋白的结合活性,结合率为84.26%(图6),同时,通过利用anti-ACE2-FITC抗体对293T-hACE2-D4细胞进行流式分析可知,该细胞与hACE2抗体结果的阳性率为86.86%。因此,计算可得293T-hACE2-D4细胞表面的hACE2与S-RBD蛋白的结合率为97%(84.26%/86.86%),这表明细胞表面hACE2几乎都具有S-RBD的结合活性,该细胞株能够用于相关的研究。

进一步,本研究还利用293T-hACE2-D4细胞株感染SARS-CoV-2(2019-nCoV) S蛋白假病毒。结果显示,293T-hACE2-D4能很好地感染该假病毒。在细胞荧光结果中,有部分细胞未能感染病毒,这可能是由于所用的假病毒本身滴度较低的原因(图7A)。荧光素报告酶检测结果中,293T-hACE2-D4细胞株是野生型293T细胞株RLU值的146倍(图7B),这一结果的差异水平说明该细胞株能够用于SARS-CoV-2中和抗体评价等相关研究。

综上所述,本研究成功构建了稳定表达hACE2的293T细胞系,功能验证结果表明该细胞株不仅可以用于hACE2与新型冠状病毒S蛋白的相互作用相关研究,也可作为靶细胞在体外开展新型冠状病毒侵入过程的相关研究,为进一步探究新冠病毒感染

机制等研究奠定坚实的实验基础。

### 参考文献 (References)

- [1] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [2] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-33.
- [3] 王杨, 薛亚娟, 符兆英. 严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)入胞机制及基于刺突蛋白的疫苗研制策略[J]. *细胞与分子免疫学杂志*(WANG Y, XUE Y J, FU Z Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) cellular invasion mechanism and based on spike protein vaccine development strategy [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*), 2021, 37(2): 178-84.
- [4] SIGFRID L, DRAKE T M, PAULEY E, et al. Long covid in adults discharged from UK hospitals after COVID-19: a prospective, multicentre cohort study using the ISARIC WHO clinical characterisation protocol [J]. *Lancet Reg Health Eur*, 2021, 8: 100186.
- [5] WANG M Y, ZHAO R, GAO L J, et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 587269.
- [6] LI F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3(1): 237-61.
- [7] WALLS A C, PARK Y J, TOPTRICI M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 281-92, e6.
- [8] WANG C, LI W, DRABEK D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2251.
- [9] ZHANG L, LIN D, SUN X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved alpha-ketoamide inhibitors [J]. *Science*, 2020, 368(6489): 409-12.
- [10] JACKSON L A, ANDERSON E J, ROUPHAEL N G, et al. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2-preliminary report [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(20): 1920-31.
- [11] FLEMING I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme [J]. *Circ Res*, 2006, 98(7): 887-96.
- [12] GHEBLAWI M, WANG K, VIVEROS A, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2 [J]. *Circ Res*, 2020, 126(10): 1456-74.
- [13] RODRIGUS PRESTES T R, ROCHA N P, MIRANDA A S, et al. The anti-inflammatory potential of ACE2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis: evidence from basic and clinical research [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(11): 1301-13.
- [14] DANG Z, SU S, JIN G, et al. Tsantan Sumtang attenuated chronic hypoxia-induced right ventricular structure remodeling and fibrosis by equilibrating local ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang1-7-Mas axis in rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 25(250): 112470.
- [15] RAMCHAND J, PATEL S K, KEARNEY L G, et al. Plasma ACE2 activity predicts mortality in aortic stenosis and is associated with severe myocardial fibrosis [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2020, 13(3): 655-64.
- [16] PAZ OCRANZA M, RIQUELME J A, GARCIA L, et al. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(2): 116-29.
- [17] KUHN J H, LI W, CHOE H, et al. Angiotensin-converting enzyme 2: a functional receptor for SARS coronavirus [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(21): 2738-43.
- [18] IMAI Y, KUBA K, RAO S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436: 112-6.
- [19] HOFFMAM 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): 271-80, e8.
- [20] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-3.
- [21] CIULLA M M. SARS-CoV-2 downregulation of ACE2 and pleiotropic effects of ACEIs/ARBs [J]. *Hypert Res*, 2020, 43(9): 1-2.
- [22] YUAN M, LIU H, WU N C, et al. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2020, 369(6507): 1119-23.
- [23] WANG Q, ZHANG Y, WU L, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2 [J]. *Cell*, 2020, 181(4): 894-904, e9.
- [24] MERCURIO I, TRAGNI V, BUSTO F, et al. Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing antibodies [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1501-22.
- [25] DALY R, HEARN M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119-38.