

网络出版时间: 2021-05-17 10:25 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1450.029.html>

ACE2、TMPRSS2 表达与小鼠 COVID-19 易感年龄及潜在靶器官关系的探讨

喻博识^{1,2}, 陈文娟², 陈小慧², 王星云², 余章斌², 韩树萍²

摘要 目的 通过检测血管紧张素转换酶 2 (ACE2)、跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2) 在小鼠不同年龄阶段 (新生期、幼龄期、成年期和老龄期) 及不同组织 (肺、小肠和心脏) 中基因和蛋白的表达水平, 探讨小鼠新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的易感年龄与潜在靶器官。方法 借助生物信息学分析网站 (Uniprot) 分析 ACE2、TMPRSS2 在不同物种间保守性; RT-qPCR 检测小鼠不同年龄组 and 不同组织中 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平; Western blot 检测小鼠不同年龄组与不同组织中 ACE2、TMPRSS2 蛋白表达水平。结果 ①人、小鼠间 ACE2 同源性达 82.1%、TMPRSS2 同源性达 78.4%; ②与新生组比较, 幼龄组、成年组和老龄组小鼠肺和小肠组织中 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平均升高 ($P < 0.05$); 与新生组比较, 幼龄组和成年组小鼠心脏组织中 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), 而老龄组的表达水平下降 ($P < 0.05$); ③同龄组小鼠肺、小肠和心脏组织中 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在肺组织中表达水平最高; ④ACE2 与 TMPRSS2 蛋白表达水平变化与 mRNA 具有一致性。结论 随着年龄增长, 小鼠肺和小肠组织中 ACE2、TMPRSS2 表达也随之增加, 这可能意味着高龄是小鼠乃至人感染新型冠状病毒肺炎 (SARS-CoV-2) 的独立危险因素之一; 此外, 同一年龄组小鼠肺组织中 ACE2、TMPRSS2 的高表达提示了肺部可能是 SARS-CoV-2 入侵机体的主要靶器官。

关键词 新型冠状病毒; 血管紧张素转换酶 2; 跨膜丝氨酸蛋白酶 2; 肺; 肠道; 心脏

中图分类号 R 563.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0986-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.030

新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 对全球人类健康构成重大威胁。COVID-19 潜伏期平均 5~7 d, 因年龄及免疫状况差异,

患者从症状出现到死亡时间为 6~41 d, 70 岁以上患者重症率明显高于 70 岁以下^[1]; 轻、中症患者症状轻微, 以发热、乏力和干咳为主, 部分患者可出现呼吸困难、低氧血症和急性呼吸窘迫综合征, 发展为重症肺炎而危及生命^[2]; 住院患者中因感染导致的心肌损伤 (心肌炎、心肌缺血等) 发生率很高^[3], 此外恶心、呕吐和腹泻等胃肠道症状也较常见^[4]; COVID-19 由新型冠状病毒肺炎病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起, SARS-CoV-2 利用冠状病毒刺突糖蛋白 (S 蛋白) 与宿主血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 受体结合进入细胞^[5], 而 S 蛋白则需要跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2) 的启动激活, TMPRSS2-SARS-CoV-2 S 蛋白-ACE2 感染轴被认为是 SARS-CoV-2 感染宿主细胞的潜在入侵通路^[6]; SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 有 88% 的同源性, 但 SARS-CoV-2 S 蛋白与细胞表面 ACE2 受体的结合能力是 SARS-CoV S 蛋白的 10~20 倍, 表明 SARS-CoV-2 具有更强传染能力^[7], 这也是目前 COVID-19 全球大流行的原因之一。该研究拟检测 ACE2 与 TMPRSS2 在小鼠不同年龄、不同组织中基因和蛋白的表达, 揭示 COVID-19 的易感年龄与潜在靶器官。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 根据文献^[8]所述小鼠年龄分段标准, 于南京医科大学医药实验动物中心购买不同年龄雄性 C57BL/6 小鼠共 12 只, 均分为四组: 新生组, 1~3 日龄; 幼龄组, 1 月龄; 成年组, 3 月龄; 老龄组, 18 月龄。

1.1.2 主要试剂与仪器 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; 动物组织总 RNA 提取试剂盒购自北京天根公司; 逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 公司; ACE2、TMPRSS2 和 GAPDH 引物序列由查询基因序列网站 (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) 所得, 并委托南京锐真生物科技公

2021-03-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81901512)

作者单位: ¹ 南京医科大学儿科学院, 南京 210004

² 南京医科大学附属妇产医院 (南京市妇幼保健院), 南京 210004

作者简介: 喻博识, 男, 硕士研究生;

韩树萍, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shupinghan@njmu.edu.cn

司合成; Real-time PCR 仪(美国 UVP 公司产品); BCA 蛋白定量试剂盒(北京碧云天生物有限公司); ACE2 兔源抗体(稀释浓度为 1:1 000)、TMPRSS2 兔源抗体(稀释浓度为 1:1 000)、GAPDH 兔源抗体稀释浓度为 1:5 000)(美国 Affinity 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠和人的 ACE2、TMPRSS2 蛋白氨基酸序列保守性分析 通过氨基酸序列查询网站(<https://www.uniprot.org/>)对小鼠和人的 ACE2、TMPRSS2 蛋白进行 Protein BLAST 蛋白氨基酸序列保守性分析。

1.2.2 组织样品制备 将 12 只不同年龄小鼠麻醉(10% 水合氯醛腹腔注射 0.05 ml/10 g)后,分别取肺、小肠和心脏组织,每份不同组织来源样品又分为 3 份:1 份组织为 50 mg 用于总 RNA 提取及后续的 RT-qPCR 实验;1 份组织为 200 mg 用于组织蛋白提取;剩余组织置于 EP 管 -80 °C 冻存备份。

1.2.3 RT-qPCR 检测小鼠 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达量 小鼠 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达量采用 RT-qPCR 检测。① 总 RNA 提取:用 TRIzol 试剂从组织中分离总 RNA;② 逆转录:利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA;③ 扩增:用 PCR 的方法扩增 cDNA;④ 检测:实时检测和定量扩增的产物。扩增结束后所得 Ct 值采用相对定量法以 GAPDH 为内参基因计算目的基因表达量,读取目的基因及内参基因的循环阈值(Ct 值),并计算目的基因与内参基因 Ct 值差值(ΔCt),以 $2^{-\Delta Ct}$ 代表目的基因 mRNA 表达水平,所用引物序列见表 1。

1.2.4 Western blot 检测 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白表达量 应用 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂(100:1)提取组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度并调节蛋白浓度一致,加入蛋白上样缓冲液水浴煮沸,分装后 -80 °C 冰箱储存备用。蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离后常规湿转法转移蛋白至 PVDF 膜上,在 5% 脱脂奶粉溶液中封闭后与一抗孵育过夜。次日复温后 TBST 洗膜、二抗孵育、TBST 再次洗涤后加入化学发光液,凝胶电泳成像系统进行图像采集。

表 1 小鼠 ACE2、TMPRSS2 和 GAPDH 引物序列

引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
ACE2	GCGGACAGCAGACTACAA	GCCATCTCGTTTTCAGGACC
TMPRSS2	CAGTCTGAGCAGATCTGTCCT	CTCGGAGCATACTGAGGCA
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGATTTC	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行分析。实验定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,

多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠与人 ACE2、TMPRSS2 氨基酸序列保守性比较 保守性分析结果显示,小鼠与人 ACE2 序列一致性达 82.1%,TMPRSS2 序列一致性达 78.4%,结果提示小鼠和人 ACE2 与 TMPRSS2 高度同源。见图 1。



图 1 人和小鼠来源 ACE2、TMPRSS2 氨基酸序列同源性分析

2.2 不同年龄小鼠同组织间 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平 ACE2、TMPRSS2 mRNA 在肺组织中的表达结果显示:老龄组 > 成年组 > 幼龄组 > 新生组 ($F = 81.455, 42.144, P < 0.001, P < 0.05$),差异具有统计学意义; ACE2、TMPRSS2 mRNA 在肠道组织中的表达结果显示:老龄组 > 成年组 > 幼龄组 > 新生组 ($F = 113.187, 169.555, P < 0.001$),差异有统计学意义; ACE2、TMPRSS2 mRNA 在心脏组织中的表达结果提示:成年组 > 幼龄组 > 新生组 > 老龄组 ($F = 11.218, 159.535, P < 0.001$),差异有统计学意义。见图 2。

2.3 同龄小鼠肺、小肠和心脏组织 ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 表达水平 新生组小鼠肺组织 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达高于小肠和心脏组织 ($F = 172.185, 90.314, P < 0.001$);幼龄组小鼠肺组织 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达高于小肠和心脏组织 ($F = 211.336, 224.434, P < 0.001$);成年组小鼠肺组织 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达高于小肠和心脏组织 ($F = 377.493, 73.239, P < 0.001$);老龄组小鼠肺组织 ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 表达高于小肠和心脏组织 ($F = 136.343, 778.623, P < 0.05$)。见图 3。

2.4 不同年龄小鼠不同组织间 ACE2、TMPRSS2 蛋白表达水平 不同年龄组同组织水平,小鼠肺组织和小肠组织 ACE2、TMPRSS2 蛋白表达随年龄增长而逐渐增高,心脏组织幼年组和成年组表达水平逐渐升高,老龄组则表达下降;同年龄维度下,肺组

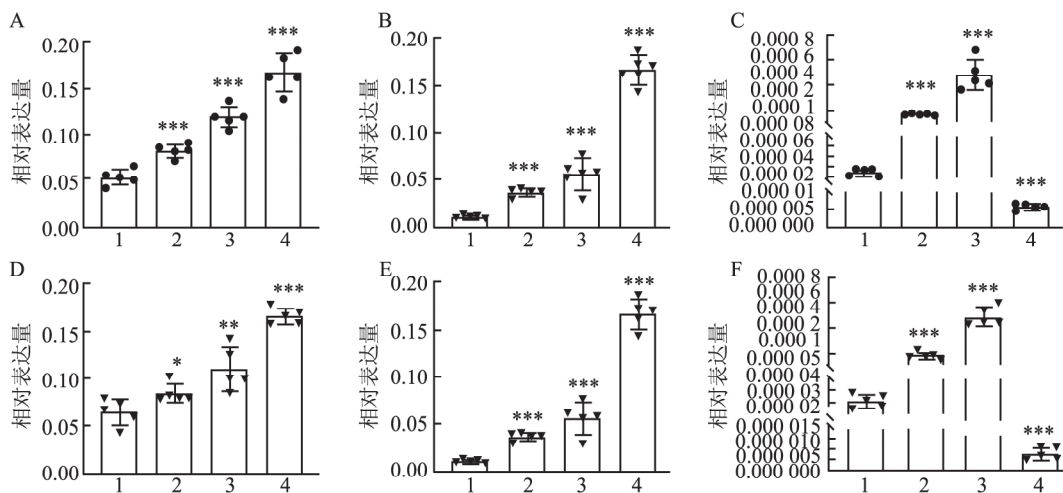


图2 不同年龄组小鼠相同组织间 ACE2、TMPRSS2 mRNA 表达水平差异

A: 肺 ACE2 mRNA 表达; B: 小肠 ACE2 mRNA 表达; C: 心脏 ACE2 mRNA 表达; D: 肺 TMPRSS2 mRNA 表达; E: 小肠 TMPRSS2 mRNA 表达; F: 心脏 TMPRSS2 mRNA 表达; 1: 新生组; 2: 幼年组; 3: 成年组; 4: 老年组; 与新生组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

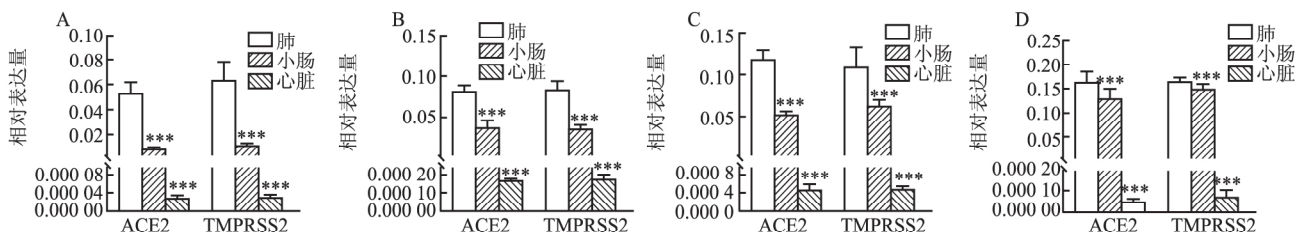


图3 同龄小鼠肺、小肠和心脏组织 ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 表达水平

A: 新生组; B: 幼年组; C: 成年组; D: 老年组; 与肺比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

织表达量较高, 小肠次之, 心脏最低, 趋势与基因水平一致。见图4。

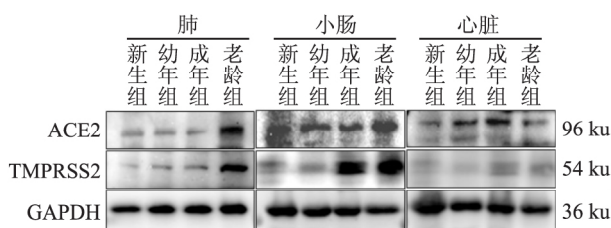


图4 不同年龄小鼠同组织间 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白表达水平以及同龄小鼠肺、小肠和心脏组织 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白表达水平

3 讨论

ACE2、TMPRSS2 在特定组织的同时高表达, 构成了 TMPRSS2-SARS-CoV-2 S 蛋白-ACE2 感染轴, 这是 SARS-CoV-2 的潜在感染途径^[6]。ACE2 是一种附着在肺、心脏、肾脏和肠道等细胞外表面(细胞膜)的酶, 属于血管紧张素转换酶家族; ACE2 在器官的特异性表达提示其可能在调节心血管和肾脏功

能以及生育方面发挥作用^[9]。此外, ACE2 作为一种跨膜蛋白, 是某些冠状病毒包括 HCoV-NL63、SARS-CoV(引起 SARS 的病毒)和 SARS-CoV-2(导致 COVID-19 的病毒)进入细胞的主要结合受体。具体而言, SARS-CoV-2 的 S 蛋白与细胞表面 ACE2 酶促结构域的结合会导致病毒被内吞和转运进入细胞, 这种进入过程还需要宿主 TMPRSS2 引发 S 蛋白的启动^[6], TMPRSS2 属于丝氨酸蛋白酶家族, 已有研究显示, S2 位点的第 2 个精氨酸可能是 TMPRSS2 激活中东呼吸综合征冠状病毒 S 蛋白所必需的^[10], TMPRSS2 激活 SARS-CoV-2 S 蛋白的具体机制, 则有待进一步研究。有研究^[11]显示, 雄激素受体拮抗药物可抑制 ACE2 和 TMPRSS2 的表达, 并抑制男性 COVID-19 患者过度的炎症反应, 此类抑制 ACE2 或 TMPRSS2 表达的药物或可治疗 COVID-19。

临床研究^[12]表明, 患者年龄与临床表现乃至预后存在确切相关性, 且肺、小肠和心脏均可能是 SARS-CoV-2 靶器官。相对成人而言, 大多数 SARS-CoV-2 感染患儿有更轻微的临床表现, 无症状感染

患儿也不少见。已有研究^[2]表明, COVID-19 主要影响呼吸功能, 绝大多数患者因呼吸衰竭死亡; 此外, 心脏损伤是 COVID-19 的一个显著特征, 通常意味着更差的预后^[3]。患者还出现恶心、呕吐和腹泻等胃肠道症状, 腹泻是儿童和成人最常见的胃肠道症状, 呕吐在儿童中更为突出^[4]。

小鼠、人 ACE2 和 TMPRSS2 氨基酸序列保守性分析结果显示, 小鼠源 ACE2 和 TMPRSS2 与人源 ACE2 和 TMPRSS2 具有高度相似性。有研究^[13]显示, ACE2 的 18 个氨基酸残基通过氢键、盐桥或多个范德华力与 SARS-CoV-2S 蛋白受体结合区域的 14 个氨基酸残基相互作用, 故检测小鼠水平 ACE2 与 TMPRSS2 表达对揭示人类 SARS-CoV-2 易感性的年龄差异与潜在靶标具有一定参考价值。

本研究检测不同年龄小鼠同组织间 ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平。实验结果表明: ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平在肺和小肠组织中, 随着年龄增长逐渐升高, 这与已有临床证据, 即相对成人而言, 大多数 SARS-CoV-2 感染患儿有更轻微的临床表现, 较小年龄与较低病死率存在相关性^[14]这一现象基本符合。同样, 检测同龄大鼠肺、小肠和心脏组织 ACE2 和 TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平, 实验结果表明: 肺组织表达量较高, 小肠次之, 心脏最低; 验证了肺是 SARS-CoV-2 最主要的靶器官, COVID-19 主要损害患者呼吸功能^[2]。

小鼠 ACE2、TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平的年龄差异一定程度解释了目前不同年龄人群对 COVID-19 的易感性差异及不同年龄患者的临床表现差异, 但尚有其它干扰因素需要考虑, 如一项前瞻性研究^[14]显示, 男性高龄患者, 伴有基础疾病等与 COVID-19 重症和死亡风险增加有关。小鼠 ACE2、TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平的组织差异解释了肺作为 SARS-CoV-2 入侵首要靶器官的原因。但 ACE2、TMPRSS2 mRNA 及蛋白表达水平高低与组织病变程度并不是绝对正相关, 如心脏相对肺部和小肠低表达, 而住院患者中 SARS-CoV-2 感染导致的心肌损伤(心肌炎/心肌缺血等)发生率很高。一项回顾性队列研究^[3]表明, 老年、炎症反应和潜在的心血管并发症和 SARS-CoV-2 感染导致的心肌损伤有关, 具体机制可能涉及感染后期的直接病毒损伤、炎性细胞因子/趋化因子介导的免疫损伤和细胞毒性免疫细胞反应, 这种机体过度免疫引起的炎症风暴不仅损伤心肌, 更可能导致重症患者出现多器官功能衰竭, 危及生命^[1]。最新研究^[15]显示, 这种

多系统炎症综合征若发生在儿童 COVID-19 患者, 会严重威胁儿童生命。

综上所述, 随着 C57BL/6 小鼠年龄的增长, 肺、小肠组织的 ACE2 和 TMPRSS2 基因及蛋白表达随之增加, 提示高龄可能是 SARS-CoV-2 感染的独立危险因素之一; 肺组织 ACE2、TMPRSS2 基因和蛋白相对于小肠和心脏等组织的高表达, 验证了肺是 SARS-CoV-2 入侵机体的首要靶器官。以上研究结果, 为 COVID-19 预防和治疗相关研究提供了新思路, ACE2 和 TMPRSS2 基因及蛋白在不同组织的表达差异, 有助提高临床医生诊断鉴别 COVID-19 相关并发症的敏感度, 也提醒临床医生注意出院患者的随访, 观察远期预后。同时住院患者中 SARS-CoV-2 感染导致心肌损伤的较高发生率以及儿童多系统炎症综合征等新情况的出现, 凸显了 COVID-19 及其病原体 SARS-CoV-2 的复杂性, 亟待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 497–506.
- [2] Zhang J J, Dong X, Cao Y Y, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China [J]. *Allergy* 2020, 75(7): 1730–41.
- [3] Shi S, Qin M, Cai Y, et al. Characteristics and clinical significance of myocardial injury in patients with severe coronavirus disease 2019 [J]. *Eur Heart J* 2020, 41(22): 2070–9.
- [4] Guan W, Ni Z, Hu Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China [J]. *N Engl J Med* 2020, 382(18): 1708–20.
- [5] Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(4): 562–9.
- [6] 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): 271–80. e8.
- [7] 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.
- [8] Dutta S, Sengupta P. Men and mice: relating their ages [J]. *Life Sci* 2016, 152: 244–8.
- [9] Hamming I, Timens W, Bulthuis M L C, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus: a first step in understanding SARS pathogenesis [J]. *J Pathol*, 2004, 203(2): 631–7.
- [10] Kleine-Weber H, Elzayat M T, Hoffmann M, et al. Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike

- protein[J]. *Sci Rep* 2018 ,8(1) : 16597.
- [11] Samuel R M , Majd H , Richter M N , et al. Androgen signaling regulates SARS-CoV-2 receptor levels and is associated with severe COVID-19 symptoms in men [J]. *Cell Stem Cell* 2020 ,27(6) : 876 – 89. e12.
- [12] Lu X , Zhang L , Du H , et al. SARS-CoV-2 infection in children [J]. *N Engl J Med* ,2020 ,382(17) : 1663 – 5.
- [13] 王 琼 李 丹 李金燕 等. 蝙蝠 SARS 样冠状病毒 WIV1 利用小鼠 ACE2 受体研究 [J]. *激光生物学报* 2020 ,29(2) ,120 – 7.
- [14] Williamson E J , Walker A J , Bhaskaran K , et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY [J]. *Nature* 2020 ,584(7821) : 430 – 6.
- [15] Goyena R , Fallis A. Pediatric crohn disease and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and COVID-19 treated with infliximab [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2020 ,71(2) : 153 – 5.

Study on the relationship between the expression of ACE2 and TMPRSS2 and the susceptible age and potential target organs of COVID-19 in mice

Yu Boshi^{1 2} , Chen Wenjuan² , Chen Xiaohui² , et al

(¹*School of Pediatrics , Nanjing Medical University Nanjing 210004*; ²*Women's Hospital of Nanjing Medical University , Maternity and Child Health Care Hospital Nanjing 210004*)

Abstract Objective In this study , we detected angiotensin-converting enzyme 2(ACE2) and transmembrane protease , serine 2(TMPRSS2) expression of different ages (newborn , juvenile stage , adulthood and aged mice) and different tissues (lung , heart and small intestine) in mice to reveal the potential age and target organ that were susceptible to corona virus disease 2019 (COVID-19) infection. **Methods** The conservatism of TMPRSS2 and ACE2 among different species was analyzed by online bioinformatics analysis website (Uniprot) . Real-time Quantitative PCR was used to analyze relative expression of ACE2 and TMPRSS2 mRNA at different ages and different tissues in mice. Western blot was used to analyze relative expression of ACE2 and TMPRSS2 protein at different ages and different tissues in mice. **Results** ①The homology of ACE2 between human and mice was 82. 1% , and the homology of TMPRSS2 was 78. 4%; ②Compared with 1 – 3 day old (newborn group) mice , the expression levels of ACE2 and TMPRSS2 mRNA in lung and small intestine tissues of 1-month old (young group) , 3-month old (adult group) and 18-month old (old group) mice increased ($P < 0.05$); compared with newborn mice , ACE2 and TMPRSS2 mRNA expression in heart tissues of young and adult mice increased ($P < 0.05$) , and TMPRSS2 and ACE2 mRNA expression in elderly group decreased ($P < 0.05$); ③Differences in ACE2 and TMPRSS2 mRNA expression levels in different tissues of mice of the same age group were statistically significant , and the highest expression levels were in lung tissue ($P < 0.05$); ④The tendency of ACE2 and TMPRSS2 protein and gene expression was consistent. **Conclusion** With the increase of age , the expression of ACE2 and TMPRSS2 in lung and small intestine of mice also increased , which may mean that advanced age is one of the independent risk factors for infection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2(SARS-CoV-2) in mice and even humans. In addition , the high expression of ACE2 and TMPRSS2 in the lung tissue of the same age mice group may suggest that the lung is the main target organ for SARS-CoV-2 invasion.

Key words SARS-CoV-2; ACE2; TMPRSS2; lung; small intestine; heart