

# 对人类伴生动物中新型冠状病毒受体 ACE2 的进化分析

阿里·马艳, 黄 鹰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 自从新型冠状病毒(SARS-CoV-2)引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)被发现并报道以来,来自世界各地的科学家付出了巨大的努力来研究和尝试控制这种疾病。先前的研究表明,某些野生动物可能是人类与新型冠状病毒起源之间的中间宿主,一些人类伴生动物也可能被新型冠状病毒感染,这引起了对新型冠状病毒交叉感染的兴趣。因此,选择了一些可能与人类接触的动物,通过对新型冠状病毒受体 ACE2 的进化分析来估计不同动物对新型冠状病毒的敏感性。结果表明,一些伴生动物如猫科动物具有更高的感染可能性,而啮齿目动物(如与人类密切接触的大鼠和小鼠)的结果则相反,这与最近的动物实验和研究一致。这些结果应该引起人们与伴生动物或可能与人类接触的动物之间交叉感染的担忧,即使在新型冠状病毒的传播得到控制后,这些动物也可能变成冠状病毒库,并引起第二波或更多波感染。结果的另一面是,生物信息学分析在某些方面可以与实验保持一致,这样就可以防止在未来的实验中过多地牺牲实验动物。

**[关键词]** COVID-19, ACE2, 交叉感染, 伴生动物

**[中图分类号]** Q931 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)04-0062-06

## Evolutionary Analysis of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Between Humans and Companion Animals

Ali Mayan, Huang Ying

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Since the COVID-19 caused by SARS-CoV-2 discovered and reported, scientists from all over the world have paid tremendous efforts to research and try to control the disease. Previous studies suggested that some of the wild animals could be intermediate hosts between humans and origination of SARS-CoV-2, and some companion animals of humans can be infected by SARS-CoV-2, which raised our curiosity about cross-infection of SARS-CoV-2 between animals and humans. Thus, the study select some kinds of animals that might have contacted with humans to estimate the susceptibility to SARS-CoV-2 in different animals by evolutionary analysis of their receptors for SARS-CoV-2. The results show that some companion animals of the Felidae family like the cat has a higher infection possibility while the species of the Rodent family like the rat and mouse having close contact with humans show an opposite result, which consist with recent animal experiments and researches. These should raise concerns about cross-infection between human and companion animals or animals having close contact with humans which might turn animals into depositaries of the coronavirus even after control of SARS-CoV-2 spreading and cause second or more waves of infections after social reopening. Another side of the results stands by the opinion that bioinformatic analysis can be consistent with experiments in some respects so that we can prevent unnecessary sacrifice of laboratory animals in future experiments.

**Key words:** COVID-19, ACE2, cross-infection, companion animals

由新型冠状病毒引起的全球范围内爆发的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)已蔓延到上百个国家/地区,感染人数几千万<sup>[1]</sup>,并吸引了越来越多的科学家关注。其他科学家已经反复陈述 COVID-19 的背景<sup>[2-3]</sup>,因此这里的研究无需过多赘述。

收稿日期:2020-06-23.

基金项目:国家自然科学基金项目(31770810,31470778).

通讯作者:黄鹰,博士,教授,研究方向:微生物,生物化学与分子生物学. E-mail:hy858717@163.com

像许多科学家想找出哪种物种将冠状病毒从最可能的原始病毒携带者转移给人类一样,本研究对新型冠状病毒的潜在中间宿主十分感兴趣. 由于先前的研究已经发现新型冠状病毒的 Spike 蛋白与人体蛋白 ACE2(血管紧张素转换酶 2)具有相互作用并最终引起冠状病毒的感染<sup>[4-6]</sup>. 因此构建了物种时间树并依据其 ACE2 蛋白序列构建了系统发育树,通过对不同物种 ACE2 的系统发育树和物种时间树的差异分析来探究不同物种对新型冠状病毒的敏感性,并以此推断可能与人发生交叉感染的物种.

## 1 方法

### 1.1 构建时间树与系统发育树

所有蛋白质序列均从 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载并使用 Aliview 软件进行分析<sup>[7]</sup>. 部分物种选自武汉华南海鲜市场出售的产品(附图),其他物种选自人类伴生动物或可能与人类接触的动物. 所有的物种如下: *Acinonyx jubatus*, *Anas platyrhynchos*, *Aotus nancymae*, *Balaenoptera acutorostrata scammoni*, *Bos taurus*, *Camelus dromedarius*, *Canis lupus familiaris*, *Capra hircus*, *Carlito syrichta*, *Chlorocebus aethiops*, *Cricetulus griseus*, *Crocota crocota*, *Equus caballus*, *Erinaceus europaeus*, *Felis catus*, *Gallus gallus*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Heterocephalus glaber*, *Homo sapiens*, *Ictidomys tridecemlineatus*, *Lynx canadensis*, *Lynx pardinus*, *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*, *Manis javanica*, *Marmota flaviventris*, *Mesocricetus auratus*, *Microtus ochrogaster*, *Mus musculus*, *Mus pahari*, *Myotis lucifugus*, *Nomascus leucogenys*, *Octodon degus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Ovis aries*, *Paguma larvata*, *Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Papio anubis*, *Physeter catodon*, *Ptilocolobus tephrosceles*, *Pongo abelii*, *Puma concolor*, *Rattus norvegicus*, *Rhinopithecus roxellana*, *Sapajus apella*, *Sus scrofa*, *Thamnomphus elegans*, *Theropithecus gelada*, *Urocitellus parryi*, *Ursus arctos horribilis*, *Vicugna pacos*, *Vulpes vulpes*.

时间树是由上面所列物种用在线服务器(<http://www.timetree.org>)构建的. 系统发育树(Neighbor-Joining Tree)是由 MegaX 软件<sup>[8]</sup>(所用参数: Poisson model, Uniform Rates, Pairwise deletion)使用上面所列的 ACE2 序列构建的. 两种树都是由 iTOL 在线服务器(<https://itol.embl.de>)绘制<sup>[9]</sup>.

### 1.2 TN 法分析物种时间树的进化距离和成对距离法分析与系统发育树的进化距离差异

TN 法用于量化不同物种在时间树上和人类的距离,具体方法是用不同物种距离人类的时间尺度(Time Period)与不同物种在时间树上距离人类分支节点数(Node)之和. 成对距离(Pairwise Distance)用于量化不同物种在系统发育树上和人类的距离,具体方法是用不同物种与人类 ACE2 蛋白氨基酸序列的一致性(Sequence Identity)差异百分比乘百分百即为成对距离. 分析后得分按 TN 距离(按降序)和成对距离(也按降序)对物种进行排序,然后按排名得分对它们进行比较,距离得分减去 TN 得分(从最小到最大)后进行排序. 最终结果的直方图使用 GraphPad Prism 7 软件绘制.

## 2 结果与讨论

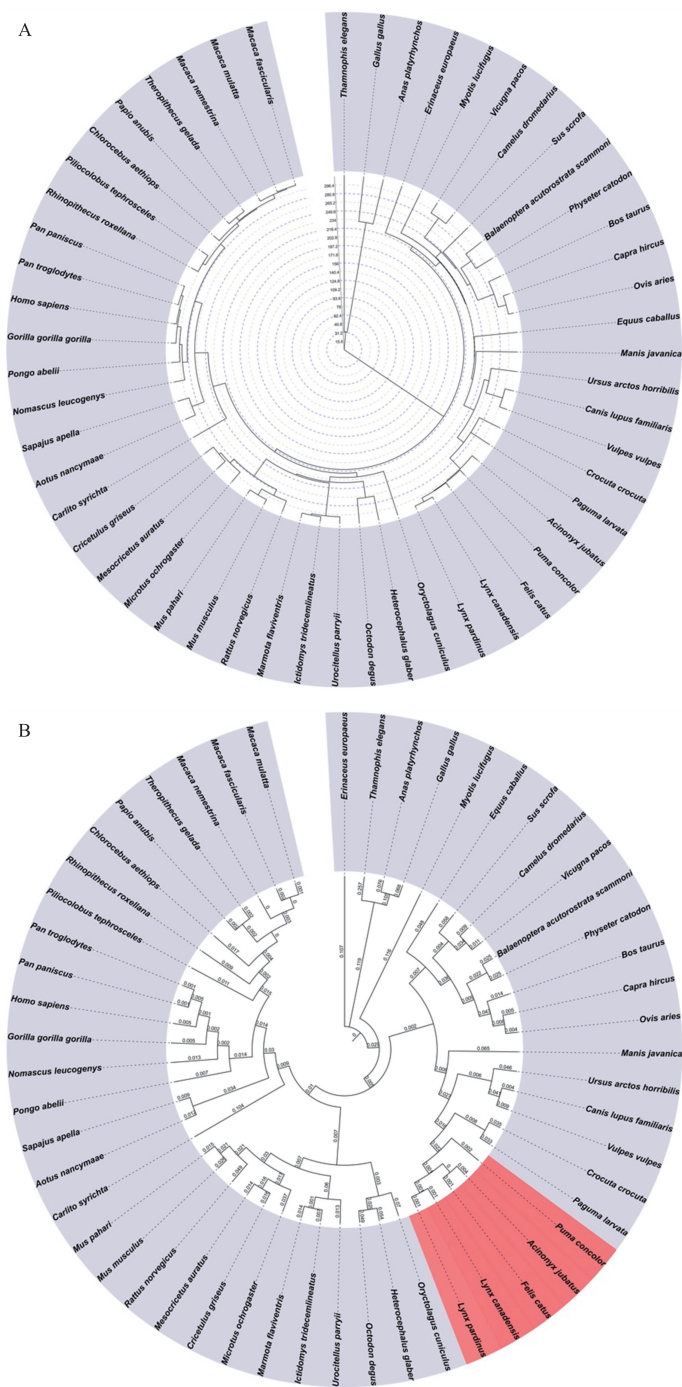
### 2.1 不同物种 ACE2 的系统发育树与时间树的构建

研究发现,由这些选定物种构建的系统发育树(图 1A)与时间树(图 1B)并不像预期的那样完全一致,尤其是当关注点在 *Homo sapiens* 时. 这种由不同的选择压力,进化速率的改变,或水平基因转移导致的差异已经被 Castresana, Haggerty, Ruvolo 和 Philippe 等解释<sup>[10-13]</sup>. 但是在本文中,对 ACE2 的系统发育树而不是时间树更感兴趣,因为据报道该病毒与 ACE2 相互作用<sup>[4-6]</sup>. 通常,如果冠状病毒仅在生物体中与 ACE2 相互作用而不与其他蛋白相互作用,则 ACE2 的系统发育树可以充分揭示物种对新型冠状病毒的敏感性.

### 2.2 不同物种 ACE2 的系统发育树和物种时间树的差异分析

众所周知,身体是一个庞大的系统,具有许多未知的信号转导途径,因此不能仅考虑 ACE2 的系统发育树,同时也应参考物种的时间树. 为了更好地评估这些物种在两种树之间的差异,使用 TN 法来量化不同物种在时间树上与人类的进化距离,然后用成对距离来量化不同物种在系统发育树上与人类的进化距离,并将同一物种中两者的打分排序相减来估算不同物种相比于人类对新型冠状病毒的敏感性.

首先推测中间宿主可能是与人类接触并偶然将病毒转移给人类的野生动物. 在所有选择的物种中,结果中将截止值设置为-5 和 5(图 2),这意味着得分低于-5 的物种很有可能是新型冠状病毒的中间宿主(与时间树相比,它们在系统发育树中与人类的距离更近),而得分高于 5 的物种则是相反的结果.



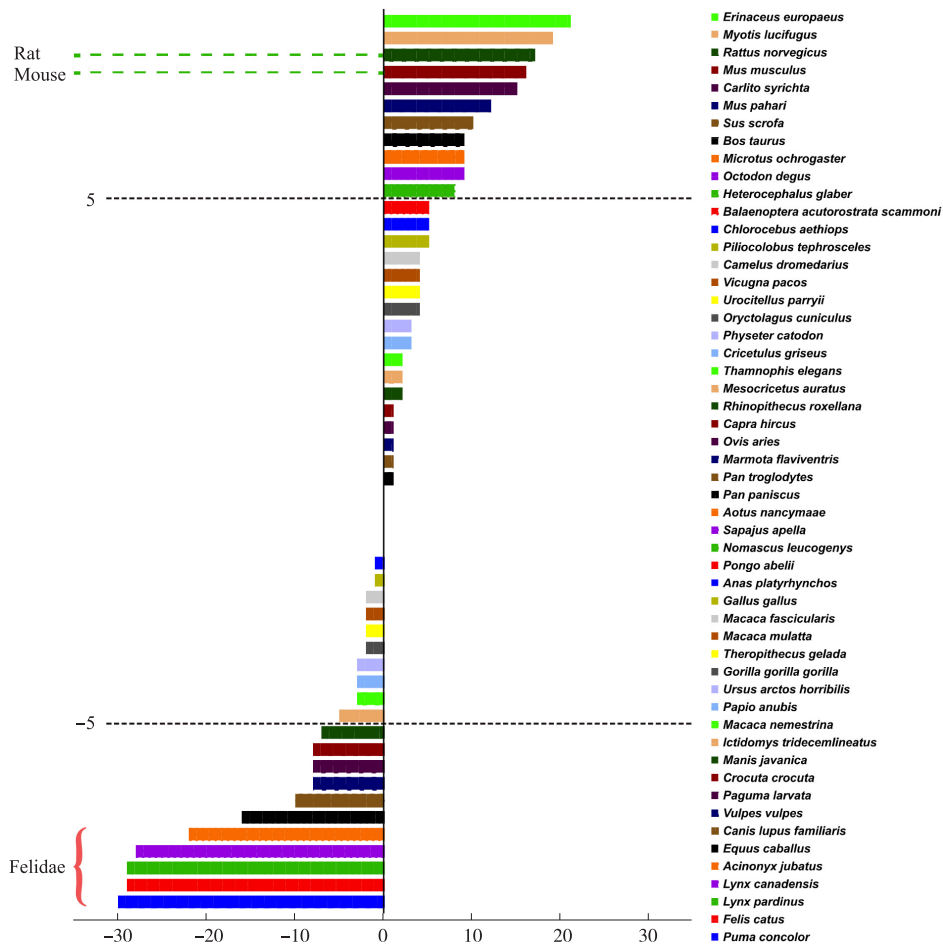
A. 选定物种的时间树. 虚线刻度表示这些物种的时间跨度(MYA/百万年前). B. ACE2 蛋白序列的系统发育树. 分支长度代表不同分支中氨基酸突变的百分比,猫科动物标记为红色.

图 1 选定物种的时间树和它们的 ACE2 蛋白的系统发育树

Fig. 1 Time Tree of selected species and Phylogenetic Tree( Neighbor-Joining Tree) of their ACE2

如图 2 所示,位于直方图底部的物种对新型冠状病毒的敏感性较高. 正如先前的研究报道,*Manis javanica*(穿山甲)可能是中间宿主<sup>[14]</sup>,研究发现穿山甲的得分较低(-7)(图 2),这意味着它可能是中间宿主,就像 Lam 等<sup>[14]</sup>指出,通过宏基因组学分析,穿山甲具有较高的病毒携带率. 穿山甲可能是一种同时与蝙蝠和人类接触的物种,因为尽管法律限制,中国仍有人食用穿山甲,因此他们可以将病毒通过这种方式传播给人类.

然后,当关注位于直方图底部或顶部的物种时,发现 Felidae 家族(猫科动物)聚集在直方图的底部(图 2),得分比其他任何物种都低(*Puma concolor*: -30, *Felis catus*: -29, *Lynx pardinus*: -29, *Lynx canadensis*: -26, *Acinonyx jubatus*: -19),这意味着猫科动物应比选择的其他物种对于新型冠状病毒更敏



红色括号表示位于直方图底部的猫科动物。截止值为-5 和 5

图 2 ACE2 的系统发育树和物种时间树与人类之间的距离差异

Fig. 2 Differences of distances against humans between Time Tree and Phylogenetic Tree of ACE2

感。但是,啮齿目动物却有相反的结果,尽管它们比猫科动物在时间树上更接近人类(图 1),但它们却以相对较高的分数(*Rattus norvegicus*:16,*Mus musculus*:16)位于直方图的顶部(图 2)。在实验室中,某些啮齿目动物(如大鼠和小鼠)被认为是最接近灵长类动物的模式生物,而这一次它们在分析中失去了应有的地位。

关于分析的上述两个结果最近在实验中得到了证实:Shi 等<sup>[15]</sup>报道新型冠状病毒在猫中大量复制,一些新闻还报道动物园老虎的 COVID-19 测试呈阳性,而 Zhou 等<sup>[4]</sup>则表明 nCoV-2019 无法感染表达小鼠 ACE2 的 Hela 细胞。先前的研究报告称,猫科动物在染色体水平上比啮齿目和灵长类更早分化<sup>[16]</sup>,而结果却发现猫与人的 ACE2 在序列上比啮齿动物更相似,因此冠状病毒可能更容易从人身上转移给猫。这也可以解释为什么一些早期研究发现,在新冠病毒流行区域的猫体内可以检测到新型冠状病毒抗体<sup>[17]</sup>,但不能在 *in vitro* 水平上感染转染小鼠 ACE2 的细胞<sup>[4]</sup>。Lynx (猯猯)是猫科动物的另一个亚科,尚未有感染 COVID-19 的报道,但据了解猯猯在某些国家也作为宠物饲养,仍认为它们可能很容易感染新型冠状病毒,因此这些猯猯的主人应该提前做好预防措施。

除了上面提到的物种之外,还有一些物种得分差异不是十分显著,但仍高于 5 或低于-5。得分较低的物种(低于-5)例如犬科的 *Canis lupus familiaris* 和 *Vulpes vulpes*(图 2),他们可能被新冠病毒感染,但不致命或只出现轻度症状。早期研究报告称,在狗中可能很少检测到新型冠状病毒<sup>[15]</sup>,但另一项新发表的研究报告说,在检测到 COVID-19 阳性后,有狗很快致命<sup>[18]</sup>。即便如此,有关宠物感染新冠病毒的研究和报道也大部分集中在猫身上,只有少量文献提及狗被新冠病毒感染。因此没有明显证据可以表明狗可以像猫一样将对新冠病毒易感并能传染给其他狗或人,这意味着狗的传染性可能比猫低。另外一种得分低于-5 的物种 *Paguma larvata*(果子狸)被认为另一种冠状病毒 SARS-COV(严重急性呼吸系统综合症冠状病毒)的中间宿主,它和新型冠状病毒具有约 80% 的序列一致性,因此果子狸也有可能被新型冠状病毒感染。而

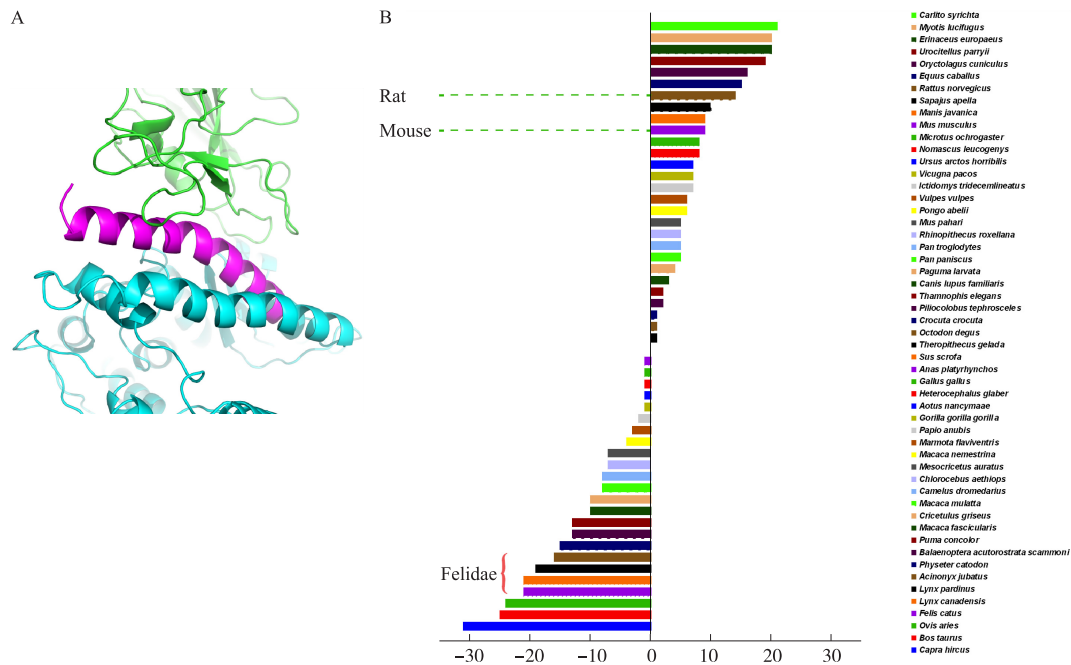


其他得分大于 5 的物种可能对新型冠状病毒的敏感性较低,例如猪<sup>[15]</sup>. 因此这些得分差异不是十分显著的物种并不能容易地定义他们对新冠病毒的敏感性.

2.3 ACE2 的  $\alpha$  螺旋氨基酸序列的系统发育树与物种时间树的差异分析

为了进一步研究新型冠状病毒及其受体 ACE2 之间的更多细节,选择了 ACE2 的一个  $\alpha$  螺旋并对其氨基酸序列进行了相同的系统发育分析. 该螺旋位于新型冠状病毒和 ACE2 复合物之间的界面,并作为 ACE2 的配体结合域的一部分起作用<sup>[19]</sup>(图 3A). 大多数结果与 ACE2 的全长序列结果一致,尤其是在猫科动物中,它们位于直方图的底部(图 3B),这意味着它们的  $\alpha$  螺旋氨基酸与人相似,因此它们在系统发育树上比时间树上离人类的距离更近. 并且发现属于反刍亚目的动物 *Capra hircus*, *Bos Taurus*, 和 *Ovis aries* 得分甚至比猫科动物还要低(图 3B). 因此,根据结果推测它们也可能对新型冠状病毒具有较高敏感性,因为它们在与新型冠状病毒结合处的  $\alpha$  螺旋序列与人的相似.

$\alpha$  螺旋的结果与 ACE2 完整序列分析部分一致,这可能是因为 ACE2 和新型冠状病毒的结合界面不仅包含选择的螺旋,而且还包含一些间断的氨基酸残基. 研究认为这些残基通过与新型冠状病毒相互作用而具有重要作用,因此仅选择一部分  $\alpha$  螺旋序列完整蛋白不能完全代表真实的相互作用序列. 尽管如此,单个  $\alpha$  螺旋分析也证实了上面的观点,提醒有关人与其他动物之间可能发生的交叉感染风险.



A. ACE2 和新型冠状病毒之间的界面中的  $\alpha$  螺旋图(Yan R 等)<sup>[19]</sup>. 新型冠状病毒的受体结合域,ACE2 和 ACE2 的  $\alpha$  螺旋分别为绿色、品红色和天蓝色. B. ACE2 特定的  $\alpha$  螺旋序列的系统发育树和物种时间树与人类之间的距离差异,红色括号表示位于直方图底部的猫科动物.

图 3 ACE2 特定的  $\alpha$  螺旋序列的系统发育树和物种时间树与人类之间的距离差异

Fig. 3 Differences of distances against humans between Time Tree and Phylogenetic Tree of the alpha helix

3 结论

在新冠病毒的全球传播期间,不仅宠物可以感染人类的冠状病毒,对冠状病毒高度敏感的某些物种也已被报道检测结果为阳性<sup>[15,17-18]</sup>. 这些物种在 ACE2 的系统发育树中与人类的距离相对更近,即使它们比时间树中的其他物种更早发散. 因此,冠状病毒可能会从其所有者或与人类接触后传播给这些易感物种. 冠状病毒向这些物种的传播引起了大家的关注,根据目前报道,只有部分动物被新冠病毒感染后发病,甚至有些物种被感染后不发病或者症状轻微,因为其他物种可能和人类的免疫系统的防御机制不尽相同,尽管如此,动物和人类之间交叉感染的可能性仍不能忽视.

从长远来看,不仅应该关心人与人之间的感染,并采取与社会隔离,而且还需要注意周围的动物是可能的病毒库,有潜在可能会在未来引起下一波感染. 为了防止潜在的病毒库引起的进一步感染,建议从预

防的角度采取以下措施:如果宠物经常在户外玩,请与宠物保持距离,或者减少将宠物带到户外的频率;政府或社区应采取行动,统一照顾新型冠状病毒感染者所拥有的宠物,而不是残忍地杀死它们;动物园或牲畜养殖场的负责人也应采取措施防止其动物受到感染。这些步骤可以避免在下一阶段的大流行中对个人或社会造成潜在损失。

生物信息学分析在某些方面可以与实验保持一致,并在进行详细研究之前指导这些实验,以防止在以后的实验中不必要地牺牲实验动物。

总而言之,研究发现某些物种比其他物种具有更高的易感性,并且有可能变成冠状病毒库,我们的目的并不是诱导人们杀害自己的宠物,而是提醒他们提前采取行动以防止潜在的风险。

**致谢:**十分感谢全球一线卫生工作者对抵抗 COVID-19 所做的无私奉献。

### [参考文献]

- [1] HARAPAN N I A Y, HAYPHENG T D M Z H, MUDATSIR M. Coronavirus disease 2019(COVID-19): a literature review[J]. *Journal of infection and public health*, 2020, 13(5): 667-673.
- [2] GONZALEZ R A S, HERNANDEZ M M, SULLIVAN M J, et al. Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in the New York City area[J]. *Science*, 2020, 369(6501): 297-301.
- [3] GORBALENYA A E, BAKER S C, BARIC R S, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2[J]. *Nature microbiology*, 2020, 5(5): 536-544.
- [4] ZHOU P, YANG X, WANG X, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [5] 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.
- [6] MARKUS H H K S S, SANDRA E T S S G, CHRISTIAN D A S P H. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(4): 271-280.
- [7] LARSSON A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(22): 3276-3278.
- [8] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular biology and evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [9] LETUNIC L, BORK P. Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(1): 127-128.
- [10] CASTRESANA J. Topological variation in single-gene phylogenetic trees[J]. *Genome biological*, 2007, 8(6): 216.
- [11] HAGGERTY L S, MARTIN F J, FITZPATRICK D A, et al. Gene and genome trees conflict at many levels[J]. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 2009, 364(1527): 2209-2219.
- [12] PHILIPPE H C A, ADOUTTE A. Can the Cambrian explosion be inferred through molecular phylogeny[J]. *Development*, 1994, 120(1): 15-25.
- [13] RUVOLO M. Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets[J]. *Molecular biology and evolution*, 1997, 14(3): 248-265.
- [14] LAM T T, JIA N, ZHANG Y, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins[J]. *Nature*, 2020, 583(7815): 282-285.
- [15] SHI J, WEN Z, ZHONG G, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2[J]. *Science*, 2020, 368(6494): 1016-1020.
- [16] PONTIUS J M J S D. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome[J]. *Genome research*, 2007, 17: 1675-1689.
- [17] ZHANG Q, ZHANG H, GAO J, et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan[J]. *Emerging microbes & infections*, 2020, 9(1): 2013-2019.
- [18] SIT T H C, BRACKMAN C J, IP S M, et al. Infection of dogs with SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2334-5.
- [19] YAN R, ZHANG Y, LI Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2[J]. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-1448.

[责任编辑:黄 敏]