

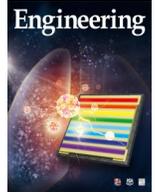


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Coronavirus Disease 2019—Article

单细胞转录组测序鉴定 COVID-19 外周血重症疾病特异性单核细胞

张研^{a, #}, 王淑婷^{a, #}, 夏鹤^{a, #}, 郭静^a, 何康信^a, 黄晨杰^a, 罗瑞^a, 陈燕飞^a, 徐凯进^a, 高海女^b, 盛吉芳^a, 李兰娟^{a, *}

^a State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Department of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

^b Shulan (Hangzhou) Hospital Affiliated to Zhejiang Shuren University Shulan International Medical College, Hangzhou 310022, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2021

Revised 7 May 2021

Accepted 17 May 2021

Available online 12 June 2021

关键词

COVID-19

重症感染

危重症

单核细胞

纤维化

摘要

了解重症新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 患者单核细胞的免疫学特征 (包括与纤维化相关的特征) 对了解疾病的重症化机制和阻止疾病恶化至关重要。本研究共纳入 7 名 COVID-19 患者 (包括 3 名重症/危重症患者和 4 名普通型患者) 和 6 名健康对照者。采集 7 名 COVID-19 患者不同疾病时期外周血样本, 包括重症/危重症时期血样 3 例, 轻症时期血样 4 例, 康复期血样 7 例。将以上血样和 6 例健康对照者血样进行单细胞转录组测序分析。本研究发现在 COVID-19 重症/危重症时期, 单核细胞发生显著变化。单核细胞在外周血单个核细胞中占比增加, 多样性却显著降低。同时本研究发现两个新的 COVID-19 重症疾病特异性单核细胞亚群: Mono 0 和 Mono 5。这两个亚群表达双调蛋白基因 (*AREG*)、表皮调节素基因 (*EREG*) 和细胞因子基因 *IL-18*, KEGG 分析显示富集的 *ErbB* 信号通路, 这两个亚群可能具有促纤维化和促炎的特征。进一步分析发现 Mono 0 和 Mono 5 发生代谢改变, 包括糖酵解/糖异生的增加和 HIF-1 信号通路的增加。本研究同时发现一个疾病重症前期取得的样本显示出与重症/危重症时期样本相似的单核细胞 UMAP 图谱。本研究发现了两种新的 COVID-19 重症疾病特异性单核细胞亚群, 可作为重症 COVID-19 的潜在预测因子和治疗靶点。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 背景

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 目前已迅速蔓延至世界各地, 成为全球大流行病。截至 2021 年 1 月末, 已感染 9000 多万人。在该疾病暴发初期, 有报道称大约 20% 的感染患者会发展为重症, 死亡率为 4% [1]。然而, 疾病重症化机制尚不完全清楚。因此, 迫切需要研究重症疾病相关特征及机制, 以降低死亡率并改善预后。

先天性和适应性免疫反应在 COVID-19 疾病进展中起到重要作用, 了解 COVID-19 重症或危重症患者的免疫特征至关重要。单核细胞是重要的先天免疫细胞群之一。在 COVID-19 重症或危重症患者中, 单核细胞和巨噬细胞过度增殖 [2], 可引起继发性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症 (sHLH) [3], 导致细胞因子风暴和致命后果 [3]。COVID-19 患者的病理亦发现大量单核细胞浸润至肺、心脏、淋巴结、脾脏、肾脏和其他器官中。此外, 单核细胞是诱

* Corresponding author.

E-mail address: ljl@zju.edu.cn (L. Li).

These authors contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 17(10): 161–169

引用本文: Yan Zhang, Shuting Wang, He Xia, Jing Guo, Kangxin He, Chenjie Huang, Rui Luo, Yanfei Chen, Kaijin Xu, Hainv Gao, Jifang Sheng, Lanjuan Li. Identification of Monocytes Associated with Severe COVID-19 in the PBMCs of Severely Infected Patients Through Single-Cell Transcriptome Sequencing. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.05.009>

导肺纤维化的主要细胞之一[4-5]。肺纤维化是 COVID-19 重症及危重症患者常见肺部表现[6]。截至 2021 年 1 月，没有大规模研究报告 COVID-19 幸存者的长期随访结果；然而，根据严重急性呼吸综合征（SARS）和中东呼吸综合征（MERS）的经验，预计许多 COVID-19 幸存者将遗留肺纤维化。肺纤维化导致肺功能下降，部分严重病例发展为不可逆的肺功能丧失，甚至需要肺移植[7]。COVID-19 引起的肺纤维化将是一个沉重的负担。因此，了解 COVID-19 重症及危重症患者中单核细胞的免疫学特征，探索单核细胞与肺纤维化是否相关对于了解致病机制、预防疾病重症化和开发有效治疗至关重要。

本研究应用单细胞 RNA 转录组测序（single-cell RNA sequencing, scRNA-Seq）对来自重症或危重症期、重症前期、轻症期、恢复期 COVID-19 患者和健康对照的外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cell, PBMC）中的单核细胞进行深入表型分析，以了解单核细胞的特定免疫特征，并探索单核细胞亚群在重症或危重症 COVID-19 中的作用。

2. 方法

2.1. 研究对象及临床特征

2020 年 2—4 月，在浙江大学医学院附属第一医院前瞻性纳入 7 例 COVID-19 实验室确诊患者及 6 例健康对照者。按照 COVID-19 指南分类（附录 A 中的表 S1），根据患者入组时的疾病严重程度，7 例患者中 3 例为重型或者

危重型，4 例为普通型。7 名患者入组时采集外周血，3 例重症/危重症患者（P01~P03）血标本为 S1、S2 和 S3，记为重症/危重症组，简称 S 组；4 例普通型患者（P04~P07）血标本记为 M1、M2、M3 和 M4，记为轻症组，简称 M 组。同时采集 7 名患者中部分患者恢复期的血标本（分别记为 R1~R7，记为恢复期组，简称 R 组）。图 1 所示为 7 名患者临床样本采样时间点。如表 1 所示，6 名健康对照者为 N01~N06，其血样标本记为 N1~N6，记为健康对照组，简称 N 组。追踪随访 7 名 COVID-19 患者病情变化，发现其中 1 例普通型患者 P05 在随访期间发展为重型患者，因此该患者在入组时采的血样 M2 亦被称为“重症前期”血样标本。综上所述，本研究共收集了 20 个 PBMC 样本，包括 14 个 COVID-19 患者的 PBMC 样本和 6 个健康对照的 PBMC 样本。

此外，本研究对 7 名患者的临床结局和肺纤维化情况进行了随访。在本研究中，所有 S 组患者和一名 M 组患者（P05，后期发展为重症）在随访期间发现有不同程度肺纤维化（图 2）。

2.2. PBMC 的制备和储存以及单细胞捕获和文库构建

采集 COVID-19 患者和健康对照者的外周静脉血。使用 Ficoll-Paque™ PREMIUM (GE Healthcare, 美国)，按步骤分离得到静脉血中 PBMC。将 PBMC 重悬于冷冻溶液 [10% 二甲基亚砷 (DMSO) 和 90% 非灭活胎牛血清 (FBS)]，以 $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率逐渐降低至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，并冷冻保存[8]。

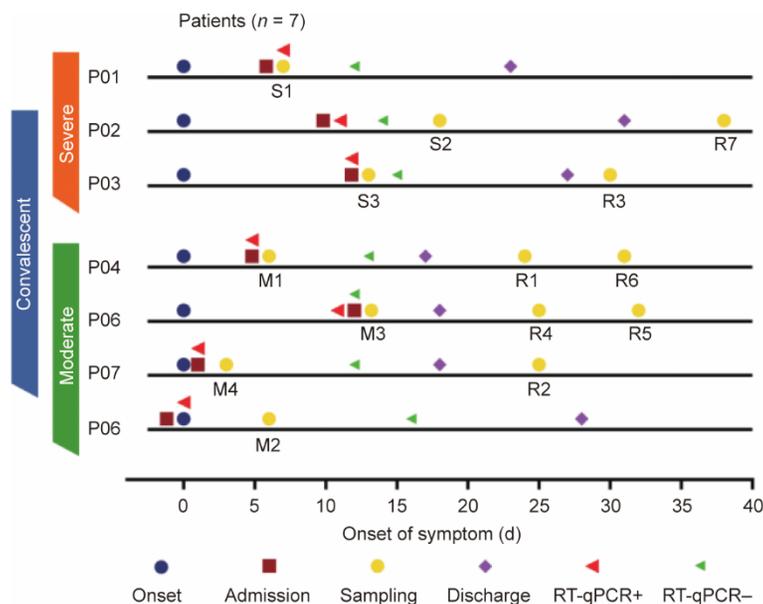


图 1. 本研究 7 名 COVID-19 患者的临床病程时间表。SARS-CoV-2 核酸检测采用逆转录定量实时聚合酶链反应（RT-qPCR）检测法。“RT-qPCR+”表明样本 SARS-CoV-2 核酸呈阳性。左侧的彩色条表示 7 例患者在入组时的疾病分型。患者 5（P05）在采集 M2 样本 4 天后发展为重症。

表 1 7 例新冠肺炎患者和对照组的临床特征

Patients	Sample	Sex	Age	Coexisting disease	Disease type when enrolled	Disease type when discharged	Antiviral therapy	Immunoglobulin therapy	Glucocorticoid therapy	Mechanical ventilation	ARDS when sampled	ARDS during whole disease period	ICU admission	Clinical outcome	Days from symptom onset
Patient 1	S1	Male	59	No	Severe	Severe	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Discharged home	7
Patient 2	S2	Female	66	Hypertension	Critical	Critical	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Discharged home	18
	R7														
Patient 3	S3	Male	53	Hypertension	Severe	Severe	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	No	Discharged home	13
	R3														30
Patient 4	M1	Female	59	Fatty liver	Moderate	Moderate	Yes	No	No	No	No	No	No	Discharged home	6
	R1														24
	R6														31
Patient 5	M2	Female	48	Fatty liver	Moderate	Severe	Yes	No	Yes	No	No	Yes (4 days after sampled)	No	Discharged home	6
Patient 6	M3	Male	66	No	Moderate	Moderate	Yes	No	No	No	No	No	No	Discharged home	13
	R4														25
	R5														32
Patient 7	M4	Male	62	Hepatitis B	Moderate	Moderate	Yes	No	No	No	No	No	No	Discharged home	3
	R2														25
Control 1	N1	Female	55	No											
Control 2	N2	Female	51	No											
Control 3	N3	Female	54	No											
Control 4	N4	Male	55	No											
Control 5	N5	Male	61	No											
Control 6	N6	Male	58	No											

S1–3: the severely infected or critically ill group. M1–4: the moderate group. R1–7: the convalescent/recovery group; N1–6: the control/normal group. ARDS: acute respiratory distress syndrome; ICU: intensive care unit.

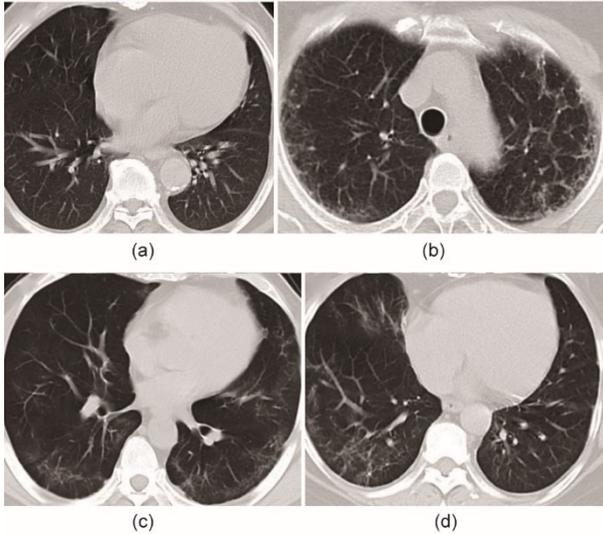


图2. 本研究中最终发展为重症的患者随访期间的胸部计算机断层扫描(CT)成像。(a) S1首次症状出现约6个月后胸部CT; (b) S2首次症状出现约6个月后胸部CT; (c) S3首次症状出现约两个月后胸部CT; (d) M2首次症状出现约两个月后胸部CT。

BD Rhapsody™单细胞分析系统(BD Biosciences, 美国)用于捕获单个PBMC的转录组数据。BD Rhapsody利用微孔分离单细胞,使细胞分布到微孔板(cartridge)的20万个微孔中完成单细胞捕获。加入磁珠(bead),磁珠上种有特定的逆转录引物,包括一个细胞条形码(cell barcode)、唯一的分子标识符(unique molecular identifier, UMI)和poly dT。细胞与磁珠匹配。加入裂解液使每个细胞裂解,mRNA被磁珠上的cell barcode序列捕获。对磁珠进行回收,发生逆转录反应完成cDNA合成。每一个cDNA 5'末端都带有UMI和cell barcode,以此来区分不同细胞类型。使用BD Rhapsody™全转录组分析(WTA)扩增试剂盒(BD Biosciences, 美国),包括随机启动和扩展(RPE)、RPE扩增聚合酶链反应(PCR)和WTA index PCR进行转录组文库的制备。使用高灵敏度DNA芯片(Agilent, 美国)和生物分析仪2200(Agilent, 美国),基于Qubit高灵敏度DNA检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)进行文库定量。

2.3. 单细胞转录组测序

使用Illumina测序仪(Illumina, 美国)进行测序。利用NovelBio Bio-Pharm技术,使用NovelBrain云平台[†]分析scRNA序列数据。UMI工具用于单细胞转录组RNA分析,以识别细胞条形码的白名单。使用UMI-tools测量本研究20个样本中每个细胞不同基因转录本的UMI

数量,进行数据过滤、细胞质量控制及绘图等。检测到的基因超过200个且线粒体UMI率低于30%的细胞被认为通过细胞质量控制。Seurat package 3.1[‡]用于之后的细胞标准化。随后,对数据进行主成分分析(PCA)以及t分布随机相邻嵌入(tSNE)构造、均匀流形近似和投影(UMAP)构造。

使用基于图的聚类技术(分辨率=0.8),根据PCA得出的前10个主成分获得细胞聚类结果。使用“FindAllMarkers”函数通过Wilcoxon秩和检验确定特征基因(In倍数变化>0.25, $p < 0.05$, min.pct>0.1)。对相同细胞类型的聚类进行重新tSNE分析、基于图的聚类和标记分析。

2.4. 拟时序分析

本研究使用拟时序分析(pseudo-time analysis)明确各单核细胞亚群之间的关系。使用具有DDR-Tree和默认参数的Monocle 2^{††}分析单细胞轨迹。在Monocle评估之前,本研究从Seurat聚类结果中选择标记基因,并确定通过筛选的细胞的原始表达计数。根据拟时序分析,进行分支表达式分析建模(BEAM)测试。然后,按照伪时间顺序构建多条轨迹评估分支和线性分化。从理论上讲,在轨迹图中驻留在相同分支上的细胞比位于相邻分支上的细胞更具有关联性。

2.5. 细胞间通讯分析

使用CellPhoneDB(一个公开的受体、配体及其相互作用的数据库),对细胞之间通讯分子进行系统评估。并注释在不同时间点聚类的膜蛋白簇、分泌的蛋白簇和外周蛋白簇。根据相互作用和通过Seurat标准化获得的标准化细胞矩阵,确定均值和细胞通讯意义($p < 0.05$)。

2.6. SCENIC分析

为了评估转录因子的调控强度,本研究应用单细胞调控网络推理和聚类的流程(pySCENIC, v0.9.5),使用RcisTarget和GRNboost的20 000-motif数据库,进行单细胞调节网络推理和聚类(SCENIC)分析[9]。

2.7. QuSAGE分析

基因表达定量集(QuSAGE)分析可以对不同的基因集进行富集度分析,比较不同群体之间差异。为了表征给定基因组的激活度,如通路激活,本研究进行了QuSAGE(2.16.1)分析。

[†] www.novelbrain.com.

[‡] https://satijalab.org/seurat/.

^{††} http://cole-trapnell-lab.github.io/monocle-release.

2.8. 共调控基因分析

为了确定基因共调控网络，本研究使用 Monocle 3 的“find_gene_modules”函数和默认参数，进行共调控基因分析（co-regulated gene analysis）。

2.9. 统计分析

统计方法的明确描述与相关结果见图中。

2.10. 伦理声明

本研究由浙江大学医学院附属第一医院伦理委员会（IIT20200148A）批准。

3. 实验结果

3.1. COVID-19 患者 PBMC 的单细胞转录组图谱

为研究 COVID-19 患者独特的外周免疫反应，本研究对来自 COVID-19 患者和健康对照组的共 20 个 PBMC 样本进行单细胞转录组测序分析。经过严格的质量控制和过滤，本研究共对 84 095 个外周血单核细胞进行测序，平均每个样品 4205 个细胞（附录 A 中的表 S2）。根据最显著差异表达基因（DEGs），上述细胞被聚集成 24 个亚群[图 3 (a) 和 (b)]，包括单核细胞（*SI100A9*、*HLA-DRA* 和 *CD14*）、CD4⁺ T 细胞（*CD3D*、*CD3E* 和 *CD4*）、CD8⁺ T 细胞（*CD3D*、*CD3E* 和 *CD8A*）、B 细胞（*MS4A1*、*CD19* 和 *CD79A*）、浆细胞（*TNFRSF17* 和 *CD79A*）、巨噬细胞（*ADGRE1*）、树突状细胞（*CD1C* 和 *HLA-DRA*）、自然杀伤细胞（*CD3D*、*CD3E*、*NKG7* 和 *GZMB*）、红细胞（*HBA1* 和 *HBB*）和巨核细胞（*PF4* 和 *ITGA2B*）等[图 3 (c)]。

与对照组相比，COVID-19 患者免疫细胞失调，尤其是在重症和危重症时期[图 3 (b) 和 (d)]。在不同分组中，免疫细胞比例差异大。单核细胞、CD8⁺ T 细胞和浆细胞占比在 COVID-19 患者与对照组之间存在显著性差异[图 3 (a)、(b)、(d)]。COVID-19 患者单核细胞的比例相较于对照组显著增加，并在恢复期下降，表明循环单核细胞可能在 COVID-19 发病机制中发挥重要作用。与对照组相比，COVID-19 患者 CD8⁺ T 细胞数量减少，尤其是在重症或危重症时期，表明 COVID-19 患者的免疫细胞耗竭可能和疾病严重程度相关。大多数免疫细胞在恢复期均恢复，说明 COVID-19 对免疫细胞的影响是可逆的。本研究中，重症/危重症组与轻症组在单核细胞数量上没有显著差异，但 UMAP 表明重症/危重症组单细胞发生显著改变[图 3 (a) 和 (b)]。

3.2. COVID-19 重症/危重症患者 PBMC 的单核细胞图谱

为了揭示 COVID-19 患者独特的单核细胞特征，本研究对单核细胞进行单独分析。使用 re-tSNE 法对单核细胞亚群进行可视化聚类分析，根据差异基因表达分为 12 个亚群，记为 Mono 0~Mono 11。这 12 个亚群根据最显著差异基因标记为 Mono 0 [双调蛋白基因（*AREG*）、表皮调节素基因（*EREG*）、抵抗素基因（*RETN*）、免疫球蛋白 κ 常数基因（*IGKC*）、细胞因子基因（*IL-18*）]、Mono 5 [*AREG*、*EREG*、*IGKC*、*IL-18*、干扰素 α 可诱导蛋白 27 基因（*IFI27*）]、Mono 1、Mono 4、Mono 11、Mono 6 [趋化因子（C-C 基元）配体 5 基因（*CCL5*）、淋巴毒素 β 基因（*LTB*）、人 HLA II 类组织相容性抗原 DQ alpha 1（*HLA-DQA1*）]、Mono 2、Mono 10 [干扰素诱导蛋白 44 样基因（*IFI44L*）、干扰素 α 可诱导蛋白 26 基因（*IFI6*）、干扰素诱导蛋白含三角形四肽重复 3 基因（*IFIT3*）、干扰素刺激基因 15（*ISG15*）、*IFI27*]、Mono 9（*IFI6*、*IFI27*）、Mono 3（*IGKC*、*HLA-DQA1*、*IFI6*）、Mono 7（*RETN*）和 Mono 8（*RETN*、*IGKC*、*IFI6*）[图 4 (a) 和附录 A 中的图 S1]。

本研究发现单核细胞的组成在不同组之间存在显著差异[图 4 (b)]。与 M、R 和 N 组相比，S 组循环单核细胞的多样性显著降低（附录 A 中的图 S2）。S 组的单核细胞主要由 Mono 0 和 Mono 5 构成。另外，样本 M2（M2 样本为“重症前期”血样）的单核细胞也主要由 Mono 0 和 Mono 5 构成（图 S2）。样本 M2 单核细胞 UMAP 图谱与 S 组相似（附录 A 中的图 S3）。除 Mono 0 和 Mono 5 外，S1、S2、S3 和 M2 几乎没有其他单核细胞亚群。此外，Mono 0 和 Mono 5 仅存在于 S1、S2、S3 和 M2 中，这些样本来自重症/危重症患者或最终发展为重症/危重症的患者。因此，Mono 0 和 Mono 5 被认为是 COVID-19 重症疾病特有的或者特异性单核细胞亚群。

3.3. 重症疾病特异性单核细胞 Mono 0 和 Mono 5 的基因表达模式

本研究进一步分析 COVID-19 重症疾病特异性单核细胞亚群 Mono 0 和 Mono 5 的特征。DEG 分析和 GO 分析表明，Mono 0 和 Mono 5 特异性高表达促纤维化基因，如 *AREG*、*EREG*、ADAM 金属肽酶含血小板反应蛋白 1 基元 2 基因（*ADAMTS2*）和细胞因子 *IL-18* 基因[图 4 (c)]。*IL-18* 被认为是巨噬细胞活化综合征（MAS）的关键驱动因素[10]。此外，单核细胞亚群 Mono 0 还表达激素相关基因——抵抗素基因（*RETN*）。KEGG 通路分析显示 Mono 0 和 Mono 5 中 *ErbB* 信号通路显著富集。该通路可以被 *AREG* 和 *EREG* 与 *EGFR* 的结合激活[图 4 (d) 和

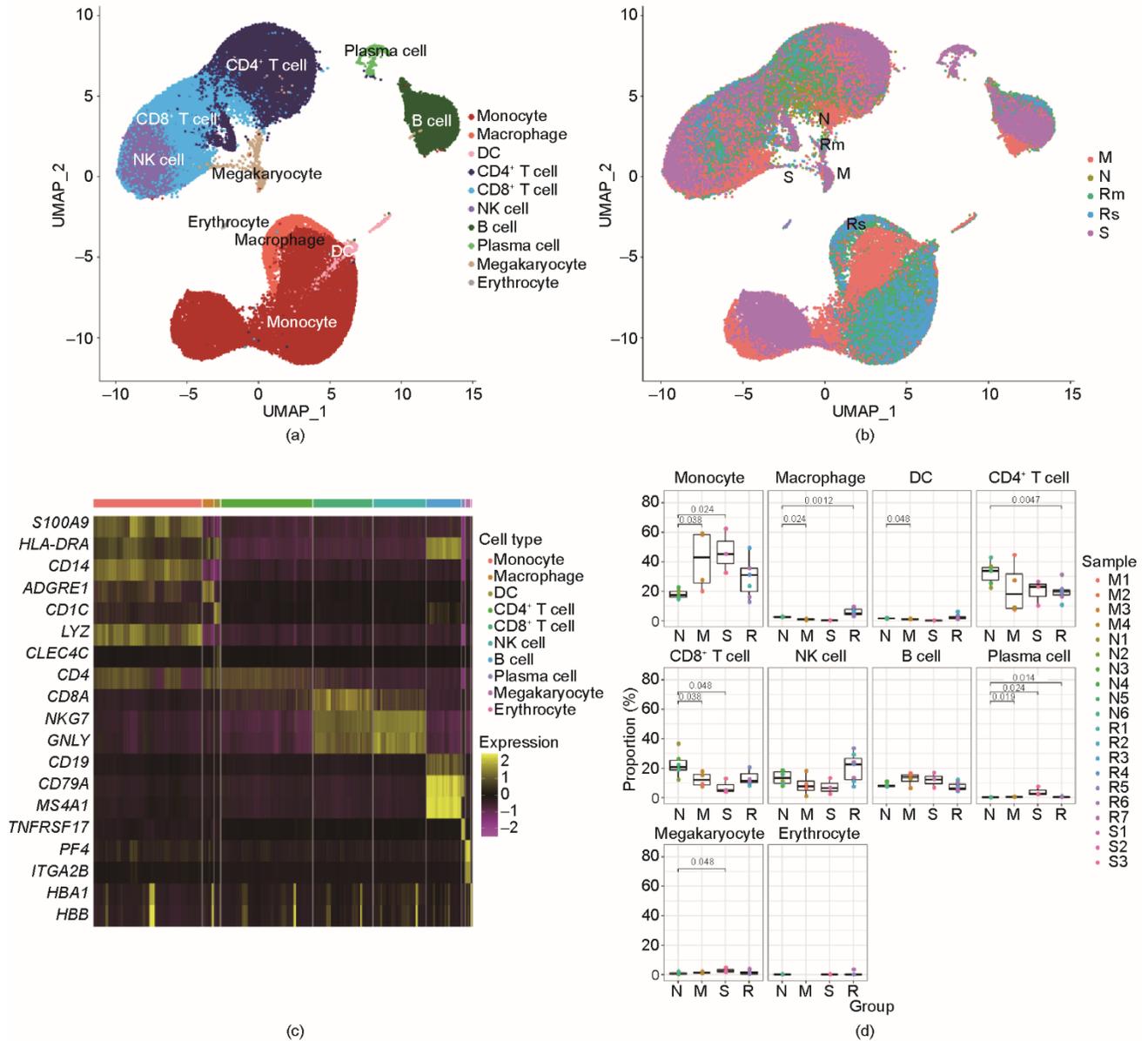


图3. COVID-19患者和对照组PBMC的单细胞图谱。(a)来自不同疾病分型患者和对照组的所有20个PBMC样本的UMAP；(b)不同组的UMAP，即重症/危重组(S)、轻重组(M)和恢复期组(R)(Rm表示从轻症疾病状态恢复，Rs表示从重症/危重症疾病状态恢复)，以及健康对照组(N)；(c)不同类型免疫细胞的差异基因热图；(d)不同分组中不同免疫细胞的比例。X轴对应于每组，Y轴对应于每个样本中每个细胞类型的比例；使用Wilcoxon秩和检验计算 p 值($p < 0.05$ 为显著差异)。

(e)]。并且该通路已被证实与SARS患者的肺部纤维化相关。此外，本研究发现，在疾病期间出现重症疾病特异性单核细胞Mono 0和Mono 5的患者，在随访期间均出现不同程度肺纤维化(图2)。本研究推测单核细胞亚群Mono 0和Mono 5可能与COVID-19患者的肺纤维化有关。且Mono 0和Mono 5表达IL-18，推测这两个亚群可以促进重症患者体内的炎症。

本研究使用SCENIC分析，发现AREG由激活转录因子3(ATF3)和PR结构域蛋白1(PRDM1)驱动；EREG是由转录因子ATF3、Jun二聚化蛋白2(JDP2)、

PRDM1、同源框A5(HOXA5)和干扰素调控因子1(IRF1)驱动；ADAMTS2由ATF3、PRDM1、IRF1和Kruppel样因子9(KLF9)驱动；RETN由Jun原癌基因(JUN)驱动[图S1(c)]。

3.4. 单核细胞亚群的拟时序分析

为研究各单核细胞亚群之间的联系和功能变化，并确定单核细胞亚群与不同疾病状态的关系，本研究进行拟时序分析明确单核细胞的分化轨迹并生成轨迹图。如图5(a)和附录A中的图S4所示，轨迹图的左侧下降轨迹主

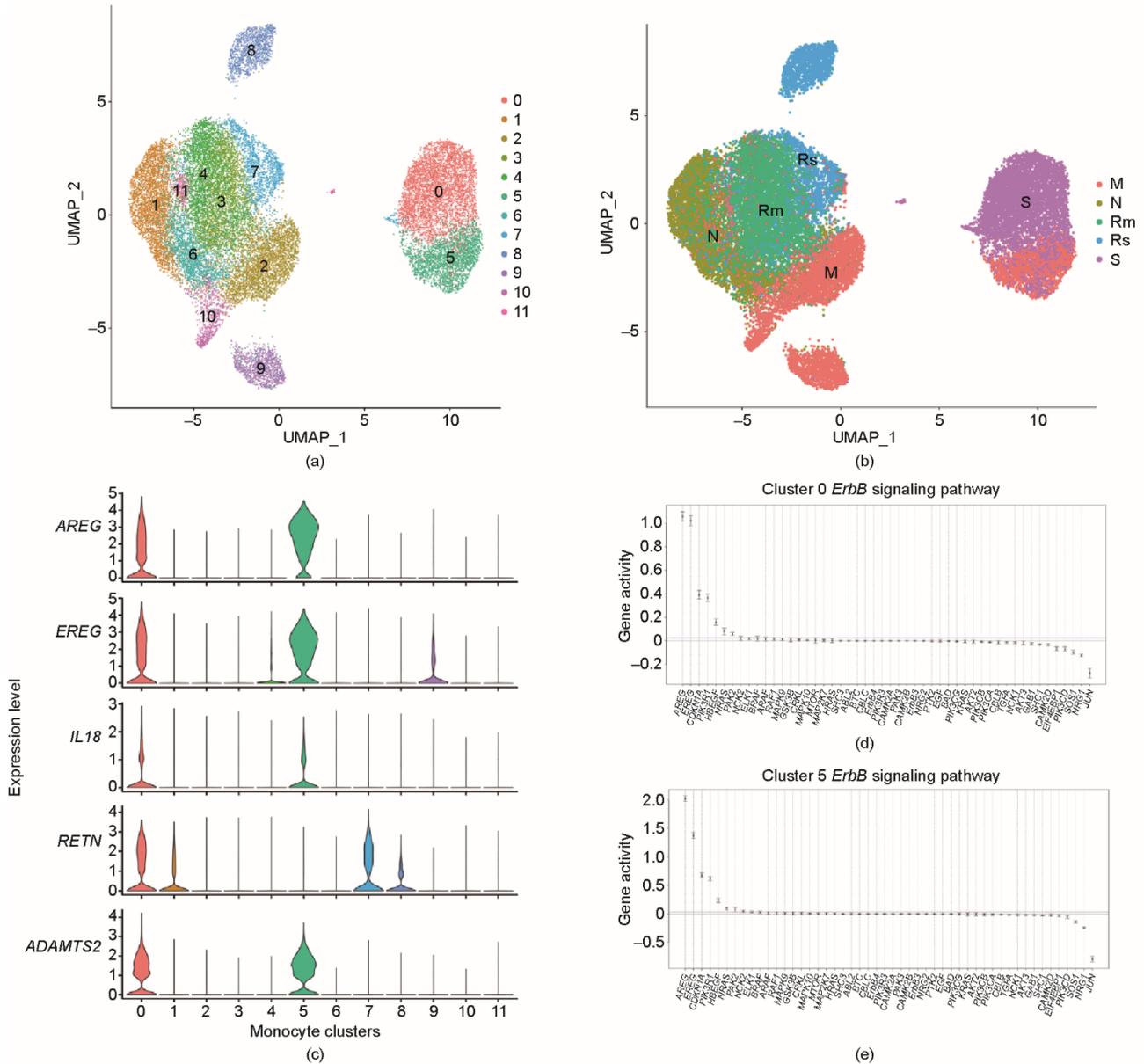


图4. 单核细胞亚群特征的变化。(a) 单核细胞UMAP展示单核细胞12个亚群分布；(b) 不同分组患者和对照组的单核细胞UMAP；(c) 亚群Mono 0和Mono 5中高表达基因的小提琴图谱；(d) Mono 0亚群中AREG和EREG的富集通路；(e) Mono 5亚群中AREG和EREG的富集通路。*CDKN1A*: 周期蛋白依赖激酶抑制因子1A; *HBEGF*: 肝素结合EGF样生长因子; *PIK3R1*: 磷酸肌醇-3-激酶调节亚基1; *PAK2*: p21蛋白(Cdc42/Rac)-活化激酶2; *NCK2*: NCK衔接蛋白2; *ARAF*: A-Raf原癌基因, 丝氨酸/苏氨酸激酶; *ELK1*: ETS转录因子ELK1, ETS癌基因家族成员; *GSK3B*: 糖原合成酶激酶3 β ; *NRAS*: 成神经细胞瘤RAS病毒(v-ras)癌基因同源物; *ABL1*: ABL原癌基因1, 非受体酪氨酸激酶; *HRAS*: v-Ha-ras Harvey鼠肉瘤病毒癌基因同源物; *RAF1*: Raf-1原癌基因, 丝氨酸/苏氨酸激酶; *MTOR*: 雷帕霉素的机制靶点(丝氨酸/苏氨酸激酶); *MAPK10*: 丝裂原活化蛋白激酶10; *STAT5B*: 信号转导子和转录激活子5B; *ABL2*: ABL原癌基因2, 非受体酪氨酸激酶; *EIF4EBP1*: 真核翻译起始因子4E结合蛋白1; *NRG4*: 神经调节蛋白4; *CAMK2B*: 钙/钙调素依赖性蛋白激酶II β ; *BAD*: BCL2相关的细胞死亡激动剂; *BTC*: β 细胞素; *CBLC*: Cbl原癌基因C, E3泛素蛋白连接酶; *ERBB4*: v-erb-b2禽红细胞白血病病毒癌基因同源物4; *SHC3*: SHC(含Src同源性2结构域)转化蛋白3; *CAMK2A*: 钙/钙调素依赖性蛋白激酶II α ; *PAK3*: p21蛋白(Cdc42/Rac)-活化激酶3; *NRG2*: 神经调节蛋白2; *EGF*: 表皮生长因子; *GAB1*: GRB2相关结合蛋白1; *SHC1*: SHC(含Src同源性2结构域)转化蛋白1; *PIK3R3*: 磷酸肌醇-3-激酶, 调节亚单位3(γ); *RPS6KB2*: 核糖体蛋白S6激酶, 70 kDa, 多肽2; *PIK3CA*: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶, 催化亚单位 α ; *BRAF*: B-Raf原癌基因, 丝氨酸/苏氨酸激酶; *MYC*: v-MYC禽骨髓细胞增多症病毒癌基因同源物; *TGFA*: 转化生长因子 α ; *MAPK9*: 丝裂原活化蛋白激酶9; *AKT3*: v-akt小鼠胸腺瘤病毒癌基因同源物3; *CBLB*: Cbl原癌基因B, E3泛素蛋白连接酶; *PIK3CB*: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚单位 β ; *NCK1*: NCK衔接蛋白1; *PTK2*: 蛋白酪氨酸激酶2; *PIK3CG*: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶, 催化亚单位 γ ; *NRG1*: 神经调节蛋白1; *SOS1*: 非七激酶同源物1(果蝇); *PIK3CD*: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸3-激酶催化亚基 δ ; *CAMK2D*: 钙/钙调素依赖性蛋白激酶II δ ; *CRKL*: v-crk禽肉瘤病毒CT10癌基因同源物样; *MAP2K7*: 丝裂原活化蛋白激酶7; *ERBB3*: v-erb-b2禽红细胞白血病病毒癌基因同源物3; *KRAS*: Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物。

要由单核细胞亚群Mono 1、2、3、4、6、7、8、9、10和

组以及健康对照组中。而右侧的上升轨迹由单核细胞亚群Mono 0和Mono 5构成, 这两个亚群主要分布在重症/危重

症组中。轨迹图从左向右的轨迹反映了单核细胞“恶化”的过程。进一步分析单核细胞亚群沿着轨迹图“恶化”过程中基因表达的改变，也即单核细胞亚群在健康对照组、恢复期组和轻症组向重症或危重症组过渡过程中的基因表达模式的改变。将基因在GO/KEGG等数据库进行功能注释并进一步构建热图[图5(b)]。根据基因变化趋势的不同将其分为三组，其中，上调和下调途径列于图5(b)中。沿轨迹图，从相对正常的单核细胞亚群到重症疾病特异性亚群 Mono 0 和 Mono 5，糖酵解/糖异生、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路和 *ErbB* 信号通路上调，而抗原处理和呈递、吞噬作用和细胞-细胞黏附等功能下调。

3.5. Mono 0 与 Mono 5 比值可能与疾病严重程度相关

虽然样本 S1、S2、S3 和 M2 的单核细胞都主要由 Mono 0 和 Mono 5 组成，但来自重症/危重症时期的样本 S1、S2 和 S3 以 Mono 0 为主，而重症前期样本 M2 主要以 Mono 5 为主。即 Mono 0/Mono 5 的比例在重症/危重症样本与重症前期样本相反。从重症前期样本 M2 到重症样本 S1 和 S3，再到危重症样本 S2，该比例逐渐升高（图 S2），这表明 Mono 0 和 Mono 5 的比例增加可能是患者疾病恶化或进展的标志。

4. 讨论

单核细胞在 COVID-19 的致病和疾病进展中起着至关重要的作用。因此，探索重症/危重症患者单核细胞的特点及其与细胞因子的关系可以更好地了解重症化机制，并利于发现阻止疾病重症化新靶点。本研究发现，在 COVID-19 重症和危重症时期，单核细胞发生显著变化，其在外周血中占比增加但多样性显著降低。本研究发现两个新的重症/危重症 COVID-19 特异性单核细胞亚群，即 Mono

0 和 Mono 5。另外，在疾病“重症前期”获得的样本，其单核细胞图谱与重症/危重症时期相似，这表明单核细胞在进展为重症/危重症疾病之前已经发生了重症/危重症疾病的表型变化。这一发现侧面证明单核细胞参与 COVID-19 的重症化，与其他研究报道的一致[2]。此外，单核细胞亚群 Mono 0 和 Mono 5 只存在于 COVID-19 的重症前期和重症/危重症时期，在 COVID-19 轻症时期、恢复期和健康对照组中并不存在。本研究推测，这两个新的单核细胞亚群参与 COVID-19 的疾病重症化，同时可作为早期预测 COVID-19 重症化的潜在标志物。

本研究进一步分析了 COVID-19 重症疾病特异性单核细胞 Mono 0 和 Mono 5 特征。Mono 0 和 Mono 5 特异性表达 *AREG* 和 *EREG*，KEGG 分析发现 *ErbB* 信号通路显著富集。组织损伤时，大量 AREG 和 EREG 被快速诱导表达，通过激活 EGFR 途径（在人类中称为 *ErbB* 途径）促进修复 [11–12]。随着受损组织好转，该修复反应逐渐下调 [13]。然而，过度的炎症或持续性损伤（如重症/危重症 COVID-19）使肺部修复机制失调，引起过度的肌成纤维细胞分化和胶原沉积，导致瘢痕形成、纤维化和器官功能损伤 [13–15]。纤维化类似于一种夸张或异常的修复反应 [16]。EGFR 信号通路是肺部损伤导致肺纤维化的关键途径，在 SARS 中就有报道 [13, 17]。基于上述发现，以及 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV-1 之间的相似性，本研究推测 Mono 0 和 Mono 5 具有促纤维化功能。肺纤维化可能是 COVID-19 患者的主要长期并发症，可引起患者慢性呼吸困难，生活质量下降，给社会带来沉重的负担。因此，迫切需要寻找针对纤维化的有效干预措施。本研究的发现可能有助于更好地了解肺部纤维化机制以及寻找早期干预肺纤维化的靶点。

与其他单核细胞亚群不同，Mono 0 和 Mono 5 特异性表达 IL-18。IL-18 主要由单核细胞和巨噬细胞被 SARS-

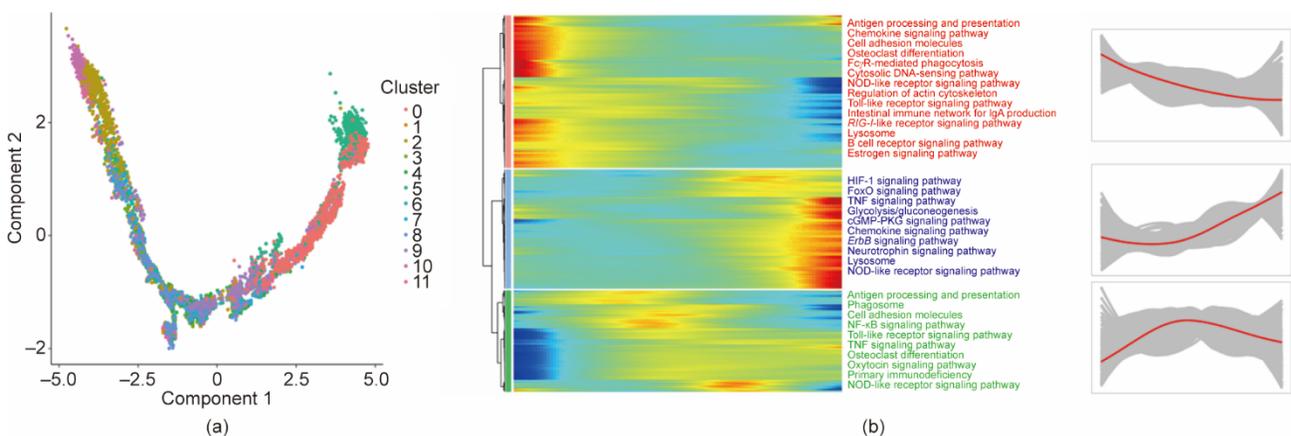


图5. 单核细胞亚群的拟时序分析。(a) 单核细胞亚群的拟时序分析；(b) 拟时序分析中不同单核细胞亚群的上调和下调通路。

CoV-2感染等有害因素刺激后分泌,在免疫反应和肺纤维化中发挥作用[18–22]。COVID-19患者血清中高IL-18水平与疾病严重程度和不良预后相关[23]。IL-18参与重症/危重症COVID-19患者的细胞因子风暴,导致ARDS[24]。因此重症患者特异性表达*IL-18*基因,说明重症患者单核细胞可能通过IL-18参与细胞因子风暴,促进疾病重症化。本研究的发现为IL-18抑制剂是治疗COVID-19的潜在治疗策略提供了证据[25]。

与其他单核细胞亚群相比, Mono 0和Mono 5发生了功能和信号通路的改变。在Mono 0和Mono 5中,正常的单核细胞功能如抗原处理和呈递、吞噬和细胞黏附等功能下降,而糖酵解/糖异生、HIF-1信号通路和*ErbB*信号通路上调。感染可导致单核细胞发生代谢改变[26–27]。已有报道称SARS-CoV-2感染可引起单核细胞发生代谢变化[28–29]。一项体外研究指出SARS-CoV-2的感染通过mtROS/HIF-1 α /糖酵解轴促进单核细胞糖酵解的增加[29]。糖酵解的增加促进了病毒复制和促炎细胞因子产生,进而促进细胞因子风暴形成、T细胞功能障碍和上皮细胞死亡[29–30]。此外,糖酵解增加是糖尿病患者感染SARS-CoV-2后易重症化的机制之一[29]。因此, Mono 0和Mono 5中糖酵解增加可能是其促进疾病重症化的机制之一。糖酵解可能是治疗COVID-19的代谢靶点之一。此外,一项关于COVID-19大样本的研究指出糖异生与COVID-19的严重程度相关,并在疾病进展中起作用[31]。然而, COVID-19患者单核细胞中的糖异生尚未被单独研究,待后续研究报道。因此,靶向代谢途径是治疗COVID-19或阻止疾病重症化的潜在有效方法[29]。

单核细胞亚群Mono 0和Mono 5之间存在一些差异。Mono 0主要存在于疾病的重症/危重症阶段,而Mono 5主要在重症前期阶段。Mono 0与Mono 5的比值在从轻症到重症,再到危重症的疾病进展过程中动态增加。因此, Mono 0与Mono 5的比值可能是重症/危重症患者疾病严重程度和疾病阶段的预测因子。

另外, Mono 0表达*RETN*基因,这与Mono 5不同。*RETN*是一种脂肪因子,主要由人类的单核细胞和巨噬细胞产生[32]。*RETN*可通过诱导TNF- α 、IL-1和IL-6等细胞因子促进炎症反应和胰岛素抵抗[33]。*RETN*基因是与SARS相关的最重要的基因之一[34]。在COVID-19中,*RETN*是中性粒细胞衍生效应物和危重疾病的预测因子[35]。然而,尚未有研究描述COVID-19单核细胞中的*RETN*基因表达情况。此外,患有糖尿病或心血管疾病的COVID-19患者重症化风险高。而糖尿病或心血管疾病与*RETN*表达增加相关[36–37]。本研究推测*RETN*可能是这

些患者更容易重症化的原因之一。Mono 0表达*RETN*基因,可能通过*RETN*的促炎和促胰岛素抵抗作用在COVID-19重症化中发挥作用,这需要进一步研究。

本研究存在一些局限性。首先,研究的样本量小,特别是重症前期和重症/危重症样本很少。由于采样困难,部分患者的样本在疾病的不同时间点并未采集齐全。其次,由于疫情控制,样本少,本研究一些假设无法进一步验证。需要样本量较大的研究进一步验证本研究的观察结果。再次,缺乏其他原因所致ARDS的对照组,如流感所致ARDS。因而难以全面地解析COVID-19所致单核细胞变化特征。

综上所述,本研究描绘了COVID-19患者外周血单核细胞图谱,发现重症及危重症患者单核细胞发生了显著改变。同时发现两个新的重症特异性单核细胞亚群,这两个新的亚群可能具有促纤维化和促炎症的特征,是疾病重症化的潜在预测因子。本研究为更好地理解COVID-19疾病重症化机制奠定基础,为早期识别重症及危重症患者提供潜在新的预测因子,为进一步研究COVID-19提供依据。

致谢

本项工作得到了国家科技重大项目(2017ZX10200440100102)、国家重点研发项目(2017ZX10204401002008)、浙江省重点研发项目(2020C03123)和浙江省自然科学基金(LED20H19001)的支持。我们感谢所有参与的患者。我们非常感谢NovelBio有限公司通过其NovelBrain云分析平台对生物信息学分析的支持,并感谢王博士和张博士的贡献。

Compliance with ethics guidelines

Yan Zhang, Shuting Wang, He Xia, Jing Guo, Kangxin He, Chenjie Huang, Rui Luo, Yanfei Chen, Kaijin Xu, Hainv Gao, Jifang Sheng, and Lanjuan Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.05.009>.

References

- [1] Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z, et al. The use of antiinflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China. *Clin Immunol* 2020;214:108393.
- [2] Jafarzadeh A, Chauhan P, Saha B, Jafarzadeh S, Nemati M. Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. *Life Sci* 2020;257:118102.
- [3] Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ; Across Speciality Collaboration HLH, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020;395(10229):1033–4.
- [4] Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, et al. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 2017;214(8):2387–404.
- [5] Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol* 2019;10:2035.
- [6] Yu M, Liu Y, Xu D, Zhang R, Lan L, Xu H. Prediction of the development of pulmonary fibrosis using serial thin-section CT and clinical features in patients discharged after treatment for COVID-19 pneumonia. *Korean J Radiol* 2020;21(6):746–55.
- [7] Han W, Zhu M, Chen J, Zhang J, Zhu S, Li T, et al. Lung transplantation for elderly patients with end-stage COVID-19 pneumonia. *Ann Surg* 2020;272(1):e33–4.
- [8] Guillaumet-Adkins A, Rodríguez-Esteban G, Mereu E, Mendez-Lago M, Jaitin DA, Villanueva A, et al. Single-cell transcriptome conservation in cryopreserved cells and tissues. *Genome Biol* 2017;18(1):45.
- [9] Aibar S, González-Blas CB, Moerman T, Huynh-Thu VA, Imrichova H, Hulselms G, et al. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods* 2017;14(11):1083–6.
- [10] Weiss ES, Girard-Guyonvarc'h C, Holzinger D, de Jesus AA, Tariq Z, Picarsic J, et al. Interleukin-18 diagnostically distinguishes and pathogenically promotes human and murine macrophage activation syndrome. *Blood* 2018;131(13):1442–55.
- [11] Neufert C, Becker C, Türeci Ö, Waldner MJ, Backert I, Floh K, et al. Tumor fibroblast-derived epi-regulin promotes growth of colitis-associated neoplasms through ERK. *J Clin Invest* 2013;123(4):1428–43.
- [12] Zaiss DMW, Gause WC, Osborne LC, Artis D. Emerging functions of amphiregulin in orchestrating immunity, inflammation, and tissue repair. *Immunity* 2015;42(2):216–26.
- [13] Venkataraman T, Frieman MB. The role of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in SARS coronavirus-induced pulmonary fibrosis. *Antiviral Res* 2017;143:142–50.
- [14] Chan KS, Zheng JP, Mok YW, Li YM, Liu YN, Chu CM, et al. SARS: prognosis, outcome and sequelae. *Respirology* 2003;8(S1):S36–40.
- [15] Chan SY, Wong RW. Expression of epidermal growth factor in transgenic mice causes growth retardation. *J Biol Chem* 2000;275(49):38693–8.
- [16] Ding L, Liu T, Wu Z, Hu B. Bone marrow CD11c⁺ cell-derived amphiregulin promotes pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2016;197(1):303–12.
- [17] Frieman M, Yount B, Agnihotram S, Page C, Donaldson E, Roberts A, et al. Molecular determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus pathogenesis and virulence in young and aged mouse models of human disease. *J Virol* 2012;86(2):884–97.
- [18] Verweyen E, Holzinger D, Weinlage T, Hinze C. Synergistic signaling of TLR and IFN α / β facilitates escape of IL-18 expression from endotoxin tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2020;201(5):526–39.
- [19] Slaats J, Ten Oever J, van de Veerdonk FL, Netea MG. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: distinct inflammatory programs in infections. *PLoS Pathog* 2016;12(12):e1005973.
- [20] Hoshino T, Okamoto M, Sakazaki Y, Kato S, Young HA, Aizawa H. Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1 β in bleomycin-induced lung injury in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41(6):661–70.
- [21] Kang MJ, Choi JM, Kim BH, Lee CM, Cho WK, Choe G, et al. IL-18 induces emphysema and airway and vascular remodeling via IFN- γ , IL-17A, and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(11):1205–17.
- [22] Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008;223(1):20–38.
- [23] Rodrigues TS, de Sá KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* 2021;218(3):e20201707.
- [24] McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. *Autoimmun Rev* 2020;19(6):102537.
- [25] Vecchié A, Bonaventura A. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? *J Cell Physiol* 2021;236(3):1638–57.
- [26] Lachmandas E, Boutens L, Ratter JM, Hijmans A, Hooiveld GJ. Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes. *Nat Microbiol* 2016;2:16246.
- [27] Yamada KJ, Heim CE, Xi X. Monocyte metabolic reprogramming promotes proinflammatory activity and Staphylococcus aureus biofilm clearance. *PLoS Pathog* 2020;16(3):e1008354.
- [28] Gibellini L, De Biasi S. Altered bioenergetics and mitochondrial dysfunction of monocytes in patients with COVID-19 pneumonia. *EMBO Mol Med* 2020;12(12):e13001.
- [29] Codo AC, Davanzo GG, Monteiro LB, de Souza GF, Muraro SP, Virgilio-da-Silva JV, et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 α /glycolysis-dependent axis. *Cell Metab* 2020;32(3):437–46.e5.
- [30] Ardestani A, Azizi Z. Targeting glucose metabolism for treatment of COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 2021;6(1):112.
- [31] Barberis E, Timo S, Amede E, Vanella VV, Puricelli C. Large-scale plasma analysis revealed new mechanisms and molecules associated with the host response to SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci* 2020;21(22):8623.
- [32] Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor- γ action in humans. *Diabetes* 2001;50(10):2199–202.
- [33] Tripathi D, Kant S, Pandey S. Resistin in metabolism, inflammation, and disease. *FEBS J* 2020;287(15):3141–9.
- [34] Hemmat N, Derakhshani A, Bannazadeh Baghi H, Silvestris N, Baradaran B, de Summa S. Neutrophils, crucial, or harmful immune cells involved in coronavirus infection: a bioinformatics study. *Front Genet* 2020;11:641.
- [35] Meizlish ML, Pine AB, Bishai JD, Goshua G, Nadelmann ER, Simonov M, et al. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *Blood Adv* 2021;5(5):1164–77.
- [36] McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. Resistin, obesity central, and type 2 diabetes. *Lancet* 2002;359(9300):46–7.
- [37] Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 2005;111(7):932–9.