

· 新型冠状病毒肺炎研究 ·

# 冠状病毒相关基因在IBD肠黏膜组织中的表达与COVID-19患病风险的相关性研究

王宏刚, 杨晓钟, 吴尚农, 戴伟杰, 马天恒, 谢睿, 沈鹏, 李倩君\*

南京医科大学附属淮安第一医院消化科, 江苏 淮安 223300

**[摘要]** **目的:**分析炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者肠黏膜的冠状病毒相关基因[血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)、跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)、二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)、氨基肽酶N(aminopeptidase N, ANPEP)]的表达差异。**方法:**收集新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)患者的腹泻发生率,并且利用IBDMDB数据库,分析IBD患者肠黏膜ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP的表达差异。**结果:**COVID-19患者的腹泻发生率为5.8%(136/2350)。与直肠黏膜相比,末端回肠ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP的差异表达倍数分别为9.800、0.571、5.318和11.127倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。但这4种基因的表达在IBD与非IBD患者中未显示出显著差异( $P > 0.05$ )。GO分类显示这些基因都参与了病毒进入宿主细胞的生物学过程,且各基因之间有相互作用。**结论:**冠状病毒相关基因(ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP)在IBD与非IBD的肠黏膜组织中的表达没有显著差异,推测IBD没有显著增加COVID-19的患病风险。

**[关键词]** 新型冠状病毒; COVID-19; 炎症性肠病; 基因; 肠黏膜

**[中图分类号]** R512.99

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)06-788-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200603

## Correlation between the expression of coronavirus-related genes in the intestinal mucosa of IBD and the risk of COVID-19

WANG Honggang, YANG Xiaozhong, WU Shangnong, DAI Weijie, MA Tianheng, XIE Rui, SHEN Peng, LI Qianjun\*

Department of Gastroenterology, the Affiliated Huaian No.1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huaian, 223300, China

**[Abstract]** **Objective:** The aim of this study was to analyze the expression of coronavirus-associated genes [angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2), dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), aminopeptidase N (ANPEP)] in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Methods:** The occurrence of diarrhea in patients with corona virus disease 2019 (COVID-19) were collected, and the IBDMDB database was used to analyze the expression of ACE2, TMPRSS2, DPP4 and ANPEP in the intestinal mucosa of IBD patients. **Results:** The occurrence of diarrhea in COVID-19 patients was 5.8% (136/2350). Compared with the rectal mucosa, the difference expression fold of ACE2, TMPRSS2, DPP4 and ANPEP in the terminal ileum were 9.800, 0.571, 5.318 and 11.127, respectively, with statistical differences ( $P < 0.05$ ). However, the expression of these 4 genes did not show significant differences between IBD and non-IBD patients ( $P > 0.05$ ). The GO classification showed that these genes were involved in the biological process of the virus entering the host cell, and there was a network interaction between these genes. **Conclusion:** There is no significant difference in the expression of coronavirus-related genes (ACE2, TMPRSS2, DPP4, ANPEP) in the intestinal mucosa of IBD and non-IBD. We speculate that IBD patients do not have a significantly increased risk of COVID-19.

**[Key words]** SARS-CoV-2; COVID-19; inflammatory bowel disease; gene; intestinal mucosa

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(06): 788-792]

**[基金项目]** 江苏省卫生健康委科研课题(H2018082); 淮安市自然科学研究计划课题(HAB201926); 淮安市第一人民医院转化医学创新团队科研项目(YZHT201905)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jsycjhnydwhg2006@126.com

新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)于2019年12月暴发,被WHO认为是大流行病,涉及中国、意大利、伊朗、韩国、法国和其他100多个国家<sup>[1]</sup>。呼吸道飞沫传播和接触传播是COVID-19的主要传播途径<sup>[2]</sup>。然而,粪-口传播也可能是病毒在人与人之间传播的潜在途径<sup>[3-5]</sup>。最近研究报道了在粪便中检测到严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)<sup>[4-6]</sup>。SARS-CoV-2通过血管紧张素转换酶2(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)感染人体细胞。因此从理论上讲,肠道是SARS-CoV-2感染的靶器官。实际上,腹泻作为肠道症状在COVID-19患者中并不罕见<sup>[5]</sup>。虽然腹泻的发生率低于发热和咳嗽<sup>[7]</sup>,但可能为COVID-19的首发症状<sup>[8]</sup>。

疫情之下,患有炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的患者可能比普通人更担心感染这种病毒。IBD患者的焦虑,不仅来自本身的肠道疾病,也来自疫情。情绪管理是IBD患者管理的重要部分。因为不乐观的心态会增加肠道症状复发的可能性<sup>[9-10]</sup>。

冠状病毒的致病机制尚未完全清楚。研究认为,冠状病毒与ACE2蛋白结合,进入细胞,并利用跨膜丝氨酸蛋白酶2(transmembrane protease serine 2, TMPRSS2)激活S蛋白,从而导致COVID-19<sup>[11]</sup>。在人小肠和结肠上皮细胞中,ACE2表达明显高于肺<sup>[5]</sup>。根据尸体解剖结果,COVID-19患者的小肠可能出现节段性狭窄和扩张<sup>[12]</sup>。目前证据支持病毒可侵犯肠道。IBD患者免疫紊乱,是否更容易感染SARS-CoV-2还不清楚。

本文汇总了已发表的英文文献,统计COVID-19患者的总体腹泻发生率。挖掘数据库信息,分析IBD患者肠黏膜的冠状病毒相关基因[ACE2、TMPRSS2、二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)、氨基肽酶N(aminopeptidase N, ANPEP)]的表达差异,从而预测IBD患者的感染风险。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

检索PubMed数据库,对已发表的18篇英文文献进行汇总,收集腹泻的发生例数和百分比以及患者所在城市。为避免研究数据的重复,本文未纳入中文文献。IBDMDB数据库<sup>[13]</sup>是人类微生物组计划的一部分。我们利用IBDMDB数据库,筛选出23例溃

疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、25例克罗恩病(Crohn's disease, CD)以及28例非IBD患者,纳入到本研究。这些研究对象都有直肠和末端回肠活检的肠黏膜组织样本。缺乏完整数据的患者未被纳入本研究。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因表达分析

使用Deseq2对IBDMDB数据库筛选后的各样本数据进行分析,计算ACE2、TMPRSS2、DPP4和ANPEP这4个基因的差异表达倍数。

#### 1.2.2 GO分类和蛋白相互作用分析

使用Metascape(<https://metascape.org>)和String(<https://string-db.org>)对这4种基因进行GO分类富集分析和构建蛋白相互作用网络。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 23.0软件分析处理数据,组间比较采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 COVID-19患者的腹泻发生率

本研究一共纳入了2350例COVID-19患者(表1),有136例在入院治疗前已出现腹泻,总体腹泻发生率为5.8%(136/2350)。

### 2.2 冠状病毒相关基因在小肠和直肠黏膜的表达

对这些样本的转录组数据进行分析,发现非IBD患者的ACE2、DPP4、ANPEP在末端回肠中的表达显著高于结肠,而TMPRSS2在末端回肠中的表达显著低于结肠( $P < 0.05$ )。与直肠黏膜相比,末端回肠的ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP基因差异表达倍数分别为9.800( $P < 0.001$ )、0.571( $P = 0.005$ )、5.318( $P < 0.001$ )和11.127( $P < 0.001$ )。

### 2.3 冠状病毒相关基因在IBD肠黏膜的表达

比较UC和非IBD的直肠黏膜转录组数据,发现这两组样本的ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP表达无显著差异( $P > 0.05$ )。这些基因在CD和非IBD的末端回肠中的表达也无显著差异(表2)。以上这些结果表明,这4种基因在IBD与非IBD患者中未显示出转录水平的差异。

### 2.4 GO分类与蛋白相互作用

对ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP基因进行GO分类,发现这4个基因都参与了病毒进入宿主细胞的生物学过程( $P < 0.05$ ),利用String网站对4个蛋白进行网络相互作用分析(表3)。蛋白相互作用综合得分越高提示两者相互作用越强。

表1 COVID-19患者的腹泻发生率

Table 1 The occurrence rate of diarrhea in patients with COVID-19

文献	病例所在城市	总病例数	腹泻发生率[n(%)]
1	武汉 <sup>[14]</sup>	139	18(12.9)
2	武汉 <sup>[15]</sup>	278	17(6.1)
3	广州 <sup>[16]</sup>	90	5(5.6)
4	湖北省5个以上城市 <sup>[17]</sup>	137	11(8.0)
5	北京 <sup>[18]</sup>	13	1(7.7)
6	中国30个以上城市 <sup>[7]</sup>	1 099	42(3.8)
7	武汉 <sup>[19]</sup>	38	1(2.6)
8	武汉 <sup>[20]</sup>	99	2(2.0)
9	武汉 <sup>[21]</sup>	138	14(10.1)
10	浙江省5个以上城市 <sup>[22]</sup>	62	3(4.8)
11	南京 <sup>[23]</sup>	24	2(8.3)
12	武汉 <sup>[24]</sup>	34	5(14.7)
13	深圳 <sup>[25]</sup>	6	2(33.3)
14	上海 <sup>[26]</sup>	51	5(9.8)
15	金华 <sup>[27]</sup>	14	0(0)
16	盐城、无锡 <sup>[28]</sup>	80	1(1.3)
17	武汉 <sup>[29]</sup>	5	0(0)
18	武汉 <sup>[30]</sup>	43	7(16.3)
总计		2 350	136(5.8)

## 3 讨论

本文纳入的这18篇英文文献报道的COVID-19患者腹泻的总体发生率为5.8%。但是,各报道的腹泻发生率有较大差别。原因可能是部分文献纳入的研究对象较少,或不同医师对腹泻的评价标准不同,或患者的排便情况未被列为临床观察重点。本文认为腹泻不是COVID-19患者的常见症状。在1例COVID-19患者的尸检报告中,病理学家发现患者的小肠呈现节段性狭窄和扩张<sup>[12]</sup>,这提示SARS-CoV-2会侵入肠道,因此需要更多关注。未来的研究应集中于SARS-CoV-2在发生腹泻的COVID-19患者粪便中的持续存在时间。这有助于更好地管理出院的患者,并谨慎处置患者的粪便,从而避免SARS-CoV-2的潜在传播。医务人员应密切注意COVID-19的非典型症状。COVID-19患者在出院后应继续在家隔离,需特别注意手卫生。另外,患者需重视康复医疗,呼吸功能、运动能力、生活自理能力、心理状态等康复不可缺位<sup>[31]</sup>。

SARS-CoV-2进入细胞取决于病毒刺突蛋白(S蛋白)与细胞受体的结合,以及宿主细胞蛋白酶对S

表2 冠状病毒相关基因在肠黏膜的表达

Table 2 Expression of coronavirus-related genes in intestinal mucosa

研究对象	活检位点	ACE2		TMPRSS2		DPP4		ANPEP	
		差异倍数	P值	差异倍数	P值	差异倍数	P值	差异倍数	P值
UC vs. 非IBD	直肠	1.064	0.844	1.114	0.576	0.735	0.199	1.120	0.740
CD vs. 非IBD	末端回肠	0.714	0.248	0.985	0.933	0.795	0.303	0.816	0.521

表3 冠状病毒相关蛋白的相互作用网络

Table 3 Protein-protein interaction networks for coronavirus-related proteins

蛋白1	蛋白2	蛋白相互作用综合得分
ACE2	DPP4	0.942
DPP4	ANPEP	0.758
ACE2	ANPEP	0.588
ACE2	TMPRSS2	0.427
TMPRSS2	DPP4	0.409

蛋白的激活。S蛋白通过与DPP4受体相互作用而附着到宿主细胞上,随后病毒得以入侵细胞。宿主细胞蛋白酶激活S蛋白是SARS-CoV-2入侵细胞的首要条件。研究者利用冷冻电镜技术分析了SARS-CoV-2表面S蛋白的近原子结构,并发现了SARS-CoV-2与SARS病毒S蛋白的结构相似性<sup>[32]</sup>。SARS-CoV-2通过其受体ACE2进入细胞,而TMPRSS2可

活化S蛋白<sup>[11]</sup>。细胞实验发现只有在受体ACE2表达的情况下,SARS-CoV-2和SARS病毒才能有效入侵,表明ACE2正是SARS-CoV-2入侵细胞需结合的受体。细胞丝氨酸蛋白酶TMPRSS2和溶酶体组织蛋白酶(cathepsin B/L, CatB/L)能够协同激活SARS-CoV-2的S蛋白入侵细胞,而蛋白酶TMPRSS2的作用更为关键。TMPRSS2抑制剂如卡莫司他可阻止病毒感染细胞,可能是未来的一个治疗选择,但还需进一步的科学研究验证<sup>[11]</sup>。研究人员还证实了来自1例SARS-CoV-2感染者的血清能够阻断S蛋白介导的病毒侵入,认为人体能够产生中和抗体来抵抗SARS-CoV-2<sup>[11]</sup>。病毒的抗体检测诊断、中和抗体及亚单位疫苗研发,是需关注的应对策略<sup>[33]</sup>。

ACE2和TMPRSS2是SARS-CoV-2入侵细胞所需的关键蛋白,ANPEP是人冠状病毒-229E(human corona virus-229E, HCoV-229E)的受体,DPP4是中

东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)的受体,这4种蛋白均在冠状病毒感染中发挥作用<sup>[5]</sup>。研究认为ANPEP和DPP4在肠道中与ACE2有类似的表达趋势<sup>[5]</sup>。利用IBDMDB数据库,分析ACE2、TMPRSS2、DPP4、ANPEP在肠道中的表达,发现他们在末端回肠和直肠中的表达有显著差异,但是在IBD与非IBD这两组间没有显著差异。GO分类发现这4种基因参与了病毒进入细胞的重要过程。蛋白相互作用分析发现它们之间存在密切关联。

本研究推测IBD患者可能对COVID-19并不易感。但是,这仅仅是理论上的推测,需要进一步了解IBD患者发生COVID-19的实际情况。本研究至少在理论上认为,IBD患者没有必要过度担忧和焦虑。像其他人一样,做好个人防护才是目前预防SARS-CoV-2感染的重要措施,提醒公众不必恐慌,科学预防定能战胜疫情。

#### 【参考文献】

- [1] WHO. Rolling updates on coronavirus disease (COVID-19) [EB/OL]. (2020-03-11) [2020-03-13]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>
- [2] LI Q, GUAN X H, WU P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(13): 1199-1207
- [3] GAO Q Y, CHEN Y X, FANG J Y. 2019 novel coronavirus infection and gastrointestinal tract [J]. *J Dig Dis*, 2020, 21(3): 125-126
- [4] YEO C, KAUSHAL S, YEO D. Enteric involvement of coronaviruses: is faecal-oral transmission of SARS-CoV-2 possible? [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5(4): 335-337
- [5] LIANG W, FENG Z, RAO S, et al. Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus [J]. *Gut*, 2020, 69(6): 1141-1143
- [6] XIAO F, TANG M, ZHENG X, et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2 [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(6): 1831-1833
- [7] GUAN W J, NI Z Y, HU Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China [J/OL]. *N Engl J Med*, 2020, 382(18): 1708-1720
- [8] SONG Y, LIU P, SHI X L, et al. SARS-CoV-2 induced diarrhoea as onset symptom in patient with COVID-19 [J]. *Gut*, 2020, 69(6): 1143-1144
- [9] KNOWLES S R, GRAFF L A, WILDING H, et al. Quality of life in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analyses-Part I [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(4): 742-751
- [10] MIKOCKA-WALUS A, PITTET V, ROSSEL J B, et al. Symptoms of depression and anxiety are independently associated with clinical recurrence of inflammatory bowel disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 14(6): 829-835
- [11] HOFFMANN M, HANNAH KW, 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
- [12] 刘茜, 王荣帅, 屈国强, 等. 新型冠状病毒肺炎死亡尸体系统解剖大体观察报告 [J]. *法医学杂志*, 2020, 36(1): 19-21
- [13] IBDMDB. The NIH human microbiome project NIDDK U54DE023798 [EB/OL]. [2020-03-05]. <https://ibdmdb.org/tunnel/public/summary.html>
- [14] ZHANG J J, DONG X, CAO Y Y, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China [J/OL]. *Allergy*, 2020 [2020-04-05]. DOI: 10.1111/all.14238
- [15] LAI C C, SHIH T P, KO W C, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55(3): 105924
- [16] XU X, YU C, QU J, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2 [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2020, 47(5): 1275-1280
- [17] LIU K, FANG Y Y, DENG Y, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(9): 1025-1031
- [18] CHANG D, LIN M, WEI L, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of novel coronavirus infections involving 13 patients outside Wuhan, China [J]. *JAMA*, 2020, 323(11): 1092-1093
- [19] 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
- [20] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513
- [21] WANG D, HU B, HU C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. *JAMA*, 2020, 323(11): 1061-1069

[22] XU X W, WU X X, JIANG X G, et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series[J]. *BMJ*, 2020, 368: 606

[23] HU Z, SONG C, XU C, et al. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(5): 706-711

[24] HUANG Y, TU M, WANG S, et al. Clinical characteristics of laboratory confirmed positive cases of SARS-CoV-2 infection in Wuhan, China: a retrospective single center analysis [J/OL]. *Travel Med Infect Dis*, 2020 [2020-03-05]. DOI: 10.1016/j.tmaid.2020.101606

[25] CHAN J F, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 514-523

[26] SONG F, SHI N, SHAN F, et al. Emerging 2019 novel coronavirus (2019 - nCoV) pneumonia [J]. *Radiology*, 2020, 295(1): 210-217

[27] ZHANG J, WANG S, XUE Y. Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus - infected pneumonia [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(6): 680-682

[28] WU J, LIU J, ZHAO X, et al. Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu province: a multi-center descriptive study [J]. *Clin Infect Dis*, 2020 [2020-03-05]. DOI: 10.1093/cid/ciaa199

[29] REN L L, WANG Y M, WU Z Q, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(9): 1015-1024

[30] JIN J M, BAI P, HE W, et al. Gender differences in patients with COVID - 19: focus on severity and mortality [J]. *Front Public Health*, 2020, 8: 152

[31] 励建安. 康复医疗在 COVID-19 康复过程中的作用及启示[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(3): 306-308

[32] 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): 1260-1263

[33] 张 茜, 冯振卿. 新型冠状病毒肺炎的抗体应对策略 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(2): 155-159

[收稿日期] 2020-03-13

(上接第 787 页)

bility, partitioning, and recovery of enveloped viruses in untreated municipal wastewater [J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(10): 5077-5085

[39] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[J]. *心肺血管病杂志*, 2020, 39(2): 103-107

[40] VAN DOREMALEN N, BUSHMAKER T, MORRIS DH, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(16): 1564-1567

[41] LIU Y, NING Z, CHEN Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals [J]. *Nature*, 2020, 582(7813): 557-560

[42] 周 静, 郎 楠, 袁 媛, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情呼吸防护及对策建议 [J]. *职业卫生与应急救援*, 2020, 38(2): 116-119

[43] ADHIKARI U, CHABRELIE A, WEIR M, et al. A case study evaluating the risk of infection from middle eastern respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in a hospital setting through bioaerosols [J]. *Risk Anal*, 2019, 39(12): 2608-2624

[44] SETO W H. Airborne transmission and precautions: facts and myths [J]. *J Hosp Infect*, 2015, 89(4): 225-228

[45] 丘 杨, 王 宁, 曾 文, 等. 新型冠状病毒能否通过气溶胶传播? [J]. *三峡生态环境监测*, 2020, 5(2): 1-5

[收稿日期] 2020-04-03