

**特约专稿**

**编者按:**继上期,本刊又邀请我国低氧研究领域的专家撰文,简述2019年诺贝尔生理学或医学奖获得者发现细胞如何感知和适应氧浓度变化的研究,探讨低氧诱导因子(HIF)信号通路对相关生理及病理生理过程的认识和对疾病干预靶点的意义,以及HIF通路发现的成功转化——HIF-PHD抑制剂(PHD inhibitor, PHI)治疗肾性贫血。

## 2019年诺贝尔生理学医学奖: 机体细胞感受氧变化及适应性反应的机制

郝传明\*, 李菁

复旦大学肾脏病研究所, 复旦大学附属华山医院肾病科, 上海 200040

随着生物进化,氧成为生物能量代谢的核心,氧的利用也成为细胞活动最基本生物过程,因此维持细胞氧的稳态极其重要。近20余年来,William G. Kaelin Jr.、Peter J. Ratcliffe、Gregg L. Semenza等的研究揭示了机体细胞感受氧变化并作出反应的机制(图1),使人们对氧稳态调控的了解有了重大进展。这些发现不但对组织维持氧稳态机制的认识有重要贡献,而且对有关疾病的病理生理机制的理解,特别是对相关疾病治疗靶点的探讨有重要意义。为表彰这三位科学家在该领域的突出贡献,他们被授予2019年诺贝尔生理学或医学奖(图2)。

### 1 促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的转录调控和转录因子低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)的发现

早在100多年前,科学家们发现上高原可使红细胞增生。以后的研究表明低氧可使机体产生EPO,刺激骨髓红细胞增生<sup>[1]</sup>。在上世纪80年代,人EPO基因被克隆<sup>[2]</sup>。然而低氧是如何调控EPO的产生引起一些科学家的关注。在胎儿,EPO主要来源于肝脏,在成年,肾脏是产生EPO的主要器官。约翰霍普金斯大学的Semenza博士(MD, PhD, 遗传医学)对EPO表达调控展开了研究,探讨了肝脏和肾脏调控EPO表达的的机制。结果在人EPO基因的3'端发现了低氧反应原件(hypoxia response element, HRE),HRE调控肝脏EPO的表达(后续

研究发现肾脏调控EPO的HRE在EPO的5'端)<sup>[3,4]</sup>。应用含该HRE的DNA亲和层析法,分离出2个被低氧诱导并可结合到HRE的核蛋白,其中一个是有描述的芳烃受体核转位子(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)(被称为HIF $\beta$ )。另一个未知蛋白,通过蛋白序列分析,最后克隆出cDNA, Sementa等将其命名为HIF1 $\alpha$ <sup>[3,4]</sup>。HIF $\beta$ 蛋白持续表达。HIF1 $\alpha$ 蛋白在常氧下很快被降解,低氧时不被降解,与HIF $\beta$ 形成异二聚体结合到靶基因HRE,启动转录。在同期,英国牛津大学和弗朗西斯·克里克研究所的Peter J. Ratcliffe(肾病科医生)也在探索低氧诱导EPO的机制,他们也发现在小鼠EPO基因的3'端一非编码区是低氧诱导EPO表达必须的。他们用这段含HRE的DNA连接到报告基因进行试验,发现在不产生EPO的细胞,该报告基因也可被低氧激活,提示低氧诱导机制还调控其他基因<sup>[5,6]</sup>。后续研究发现HIF存在于机体几乎所有器官,其下游基因除了与红细胞增生的基因以外,还包括促进血管增生(如PDGFA/B, TGF- $\beta$ 1, VEGF等)和促进无氧酵解相关基因(PGK1, Ldha, Glut1等)在内的众多基因的表达<sup>[7,8]</sup>。

### 2 氧对HIF转录活性的调控

细胞又是怎样根据氧的水平调控HIF的呢?哈佛医学院达纳-法伯癌症研究所的William G. Kaelin Jr.是一位肿瘤学医生,他当时的研究兴趣是

\*Corresponding author. E-mail: chuanminghao@fudan.edu.cn

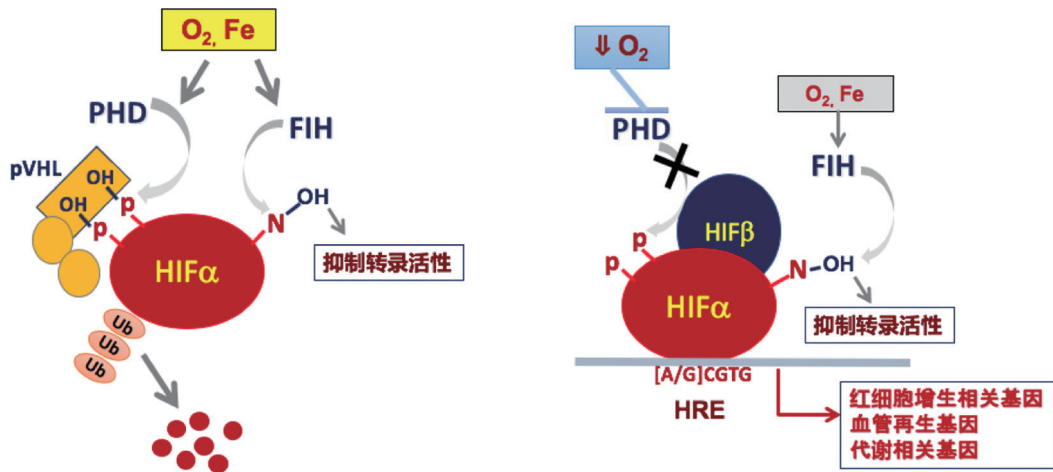


图 1. 细胞对氧变化的感受和反应

在常氧环境中，脯氨酸羟化酶(HIF-PHD)被激活，羟化HIFα脯氨酸，使VHL连接酶复合体结合到被羟化的HIFα，导致其泛素化，并经蛋白酶体降解，终止其转录活性。在低氧环境中，PHD抑制状态，HIFα稳定，并进入细胞核，与HIFβ形成异二聚体，结合到靶基因低氧反应原件(HRE)，激活相关基因表达，包括促进肾脏细胞等产生促红细胞生成素(EPO)，增加铁的吸收和利用，以刺激骨髓生成新的红细胞；增加血管生成(VEGF)，增加供血；增加无氧酵解(PDK1、LDHA、GLUT1等)，以对低氧作出适应性反应。在有氧和铁存在时，FIH也可被激活，使位于HIFα羧基端的门冬酰胺羟化，阻止与转录协同因子的结合，抑制其转录活性。

Fig. 1. The mechanism by which cells monitor and respond to oxygen levels. Under normoxic conditions, two proline residues on the HIFα subunit are hydroxylated (OH) by prolyl hydroxylase (PHD), in the presence of O<sub>2</sub> and Fe<sup>2+</sup>. Hydroxylated HIFα is recognized by the VHL E3 ubiquitin ligase complex, which tags HIFα with polyubiquitin, allowing for proteasomal recognition and subsequent degradation. Under hypoxic conditions, HIFα prolyl hydroxylation is inhibited, preventing recognition of HIFα by VHL. HIFα can then accumulate and translocate to the nucleus, where it dimerizes with HIFβ. The HIF dimer binds to hypoxia response elements (HREs) within the promoters of and trans-activates target genes associated with erythropoiesis, glycolysis (PDK1, LDHA, GLUT1), and angiogenesis (VEGF). Additionally, FIH (factor inhibiting HIF-1) hydroxylates an asparagine residue in the C-terminal trans-activation domain of HIFα, preventing its interaction with transcriptional coactivators.

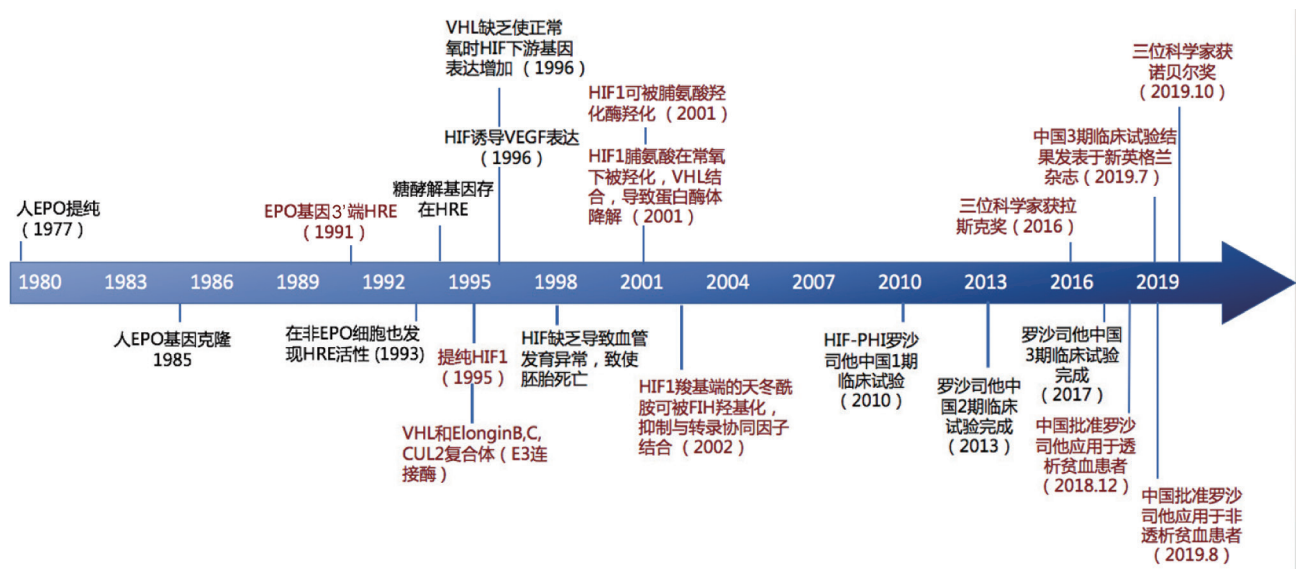


图 2. HIF通路的发现和转化历程

Fig. 2. Milestones of HIF signaling research.

VHL (von Hippel-Lindau) 病。他注意到 VHL 突变导致的肿瘤有丰富的血管。某些 VHL 突变患者伴有红细胞增多。他还发现在 VHL 突变的肿瘤细胞, *VEGF* 等 HIF 下游基因表达增加, 而且不受氧调控。这些研究提示 VHL 与 HIF 活性可能存在关联。进一步研究表明 VHL 和 Elongin B、C 以及 CUL2 等组成复合体, 具有泛素化连接酶 (E3 连接酶) 活性<sup>[9, 10]</sup>。Ratcliffe 和 Kaelin 同时发现, VHL 连接酶复合体可结合到被羟化 HIF1 $\alpha$ , 而 HIF $\alpha$  在有氧的情况下被羟化, 最终导致 HIF $\alpha$  被蛋白酶体系统降解。最后他们分别发现脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 介导了 HIF $\alpha$  脯氨酸的羟化<sup>[11–18]</sup>。这些研究提示, 在常氧情况下, PHD 被激活, 使 HIF $\alpha$  脯氨酸羟化, 导致 VHL 连接酶复合体结合到 HIF1 $\alpha$ , 最终导致 HIF1 $\alpha$  被泛素化和经蛋白酶体降解 (图 1)。

Ratcliffe 和 Semenza 等后续又发现, 在 HIF $\alpha$  的羧基末端的转录活性也可受氧调控。一个称为 FIH (factor inhibiting HIF-1) 的羟化酶, 使 HIF $\alpha$  的羧基末端天冬酰胺残基羟化, 抑制 HIF $\alpha$  与其他转录协同因子的结合, 抑制其转录活性。FIH 也可被氧和铁激活, 而且其在氧水平较低的情况下被激活, 参与调控 HIF 的转录活性 (图 1)<sup>[19–22]</sup>。

### 3 HIF信号通路对相关生理及病理生理过程的认识和对疾病干预靶点探讨的意义

氧的利用以及氧稳态的调控是生命过程的基本现象, 很多疾病或病理过程中 HIF 信号发挥重要作用, 同时 HIF 信号异常参与一些病理过程的病理生理机制。(1) 在众多缺血/缺氧性疾病或病理过程中, HIF 信号被激活并参与其病理过程, 包括: 心血管疾病、脑卒中、急性肾损伤、肺动脉高压、肿瘤、伤口愈合等。(2) HIF 对能量代谢的影响包括: 刺激丙酮酸脱氢酶激酶 1 (pyruvate dehydrogenase kinase-1, PDK1)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 的表达, 抑制丙酮酸向乙酰辅酶 A 转化, 将丙酮酸转换为乳酸, 从而阻断三羧酸循环; 同时调节细胞色素 C 氧化酶的表达使得电子传递链利用率最大化。有研究显示 HIF 在调节脂肪代谢中起了重要作用, 刺激脂质储存并抑制其分解代谢。肝脏特异性 VHL 敲除小鼠出现了脂肪肝, 其脂滴沉积而脂肪酸代谢减少。HIF 机制的发现对代谢相关疾病的认识和防治将产生一定影响。(3) HIF 通路基因突变也是导致透明细胞癌、一些神经内分泌肿瘤、红细胞

增多症等疾病的重要机制。因此该通路的发现不但对一些基本生理和病理生理过程的认识有重要意义, 对探讨疾病新的治疗靶点也有重要价值。以 HIF-PHD 作为治疗靶点的药物, 已作为肾性贫血治疗方法应用于临床。该类药物对炎症性肠病、骨髓异常增生综合征等疾病的治疗作用正在进行临床试验。

### 4 HIF-PHD抑制剂(PHD inhibitor, PHI)治疗肾性贫血是HIF通路发现的成功转化

HIF 信号通路的发现推动了肾性贫血治疗的创新。以 HIF-PHD 为治疗靶点的新药——HIF-PHI 已经研发成功。该类药物通过抑制 HIF-PHD, 使 HIF 不被降解, 从而综合调控红细胞生成。临床试验显示, 该类药物不但刺激内源性 EPO 产生, 还增加铁的吸收和利用, 有效刺激红系增生。更为重要的是, HIF-PHI 作用不依赖静脉铁, 而且在炎症状态下, 通过抑制铁调素等机制, 仍然有效升高血红蛋白水平<sup>[23, 24]</sup>。中国已经在全球范围内率先完成了 1~3 期临床试验, 并首先获得药监部门的批准用于治疗透析患者的贫血。因此中国是全球范围内第一个使用该药治疗肾性贫血的国家。HIF-PHI 将成为肾性贫血治疗新的里程碑。

### 参考文献

- 1 Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252(15): 5558–5564.
- 2 Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(22): 7580–7584.
- 3 Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(13): 5680–5684.
- 4 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5510–5514.
- 5 Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(6): 2423–2427.
- 6 Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY,



- Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 1998; 12(2): 149–162.
- 7 Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(14): 6496–6500.
- 8 Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4604–4613.
- 9 Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG Jr. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 1995; 269(5229): 1444–1446.
- 10 Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, Kamura T, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998; 18(2): 732–741.
- 11 Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG Jr, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20): 10595–10599.
- 12 Kamura T, Koepp DM, Conrad MN, Skowrya D, Moreland RJ, Iliopoulos O, Lane WS, Kaelin WG Jr, Elledge SJ, Conaway RC, Harper JW, Conaway JW. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* 1999; 284(5414): 657–661.
- 13 Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(19): 10430–10435.
- 14 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001; 292(5516): 464–468.
- 15 Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292(5516): 468–472.
- 16 Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; 294(5545): 1337–1340.
- 17 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107(1): 43–54.
- 18 Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K, Yang H, Sorokina I, Conaway RC, Conaway JW, Kaelin WG Jr. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21): 13459–13464.
- 19 Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; 272(31): 19253–19260.
- 20 Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997; 272(17): 11205–11214.
- 21 Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 2001; 15(20): 2675–2686.
- 22 Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 2002; 16(12): 1466–1471.
- 23 Chen N, Hao C, Liu BC, Lin H, Wang C, Xing C, Liang X, Jiang G, Liu Z, Li X, Zuo L, Luo L, Wang J, Zhao MH, Liu Z, Cai GY, Hao L, Leong R, Wang C, Liu C, Neff T, Szczech L, Yu KP. Roxadustat treatment for anemia in patients undergoing long-term dialysis. *N Engl J Med* 2019; 381(11): 1011–1022.
- 24 Chen N, Hao C, Peng X, Lin H, Yin A, Hao L, Tao Y, Liang X, Liu Z, Xing C, Chen J, Luo L, Zuo L, Liao Y, Liu BC, Leong R, Wang C, Liu C, Neff T, Szczech L, Yu KP. Roxadustat for anemia in patients with kidney disease not receiving dialysis. *N Engl J Med* 2019; 381(11): 1001–1010.