

低氧诱导因子与氧感受器

孙学军, 黄俊龙, 彭兆云, 蒋春雷

(第二军医大学海军医学系航海医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 低氧诱导因子(HIF)是人们探索低氧调节促红细胞生成素(EPO)机制的过程中被发现的, HIF是EPO低氧调节的关键转录因子, 也是其他各种低氧诱导基因调节的关键转录因子, 它的活性复合体是由2个亚单位组成的异构体。近年来, 通过对HIF低氧调节的深入研究, 发现了2种氧依赖酶: 脯氨酸和天冬氨酸羟化酶, 这是高等生物中首次被系统研究的氧感受器。本文分别从HIF的结构功能、低氧对HIF调节和氧感受器等方面综述有关研究进展。

[关键词] 低氧诱导因子; 氧感受器; 转录因子

[中图分类号] R 331.141 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)09-1023-04

Hypoxia-inducible factors and oxygen sensors

SUN Xue-Jun, HUANG Jun-Long, PENG Zhao-Yun, JIANG Chun-Lei (Department of Nautical Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] The erythropoietin(EPO) system was used to study the molecular mechanisms associated with the induction of hypoxia responsive genes and from these investigations the hypoxia-inducible factors (HIFs) was identified as a key transcriptional hypoxic regulator of EPO. Subsequent research has now found that a large number of other hypoxia-inducible genes are also induced by HIF under hypoxic conditions. The HIF transcriptional complex is a heterodimer consisting of an alpha subunit and a beta subunit. Recently, two oxygen sensor, oxygen-dependent prolyl and asparaginyl hydroxylation were found, and it is the first time that the oxygen sensor had been described for higher organisms. This review focused on the structure and functions of HIF and the regulation of HIF proteins by hypoxia and oxygen sensors.

[KEY WORDS] hypoxia-inducible factors; oxygen sensors; transcriptional factor

Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 1023-1026

* 氧气是需氧生物不可缺少的物质, 在长期进化过程中, 生物体形成了从环境中有效获取氧的能力, 这种能力主要是通过呼吸和循环系统实现的。氧气过量可导致体内自由基产生增多, 对机体造成伤害; 氧气不足可引起机体细胞缺氧, 也可危害机体。所以, 为了同时避免氧过多或缺乏对机体的危害, 机体要通过多种机制将氧的供应调节到一个恰当的生理浓度范围^[1]。

在细胞水平上, 低氧使细胞减少氧化磷酸化, 使ATP的生成主要依赖加快糖酵解速度来实现, 以降低细胞的氧消耗。为适应长期低氧, 细胞会上调与糖酵解有关酶和葡萄糖转运蛋白的表达; 在组织器官水平上, 细胞低氧可提高血管内皮生长因子(VEGF)的表达, VEGF作用于内皮细胞上, 刺激新生血管的形成, 提高局部氧的供应; 在系统水平上, 可通过激素调节机体氧的运输能力, 低氧刺激肾脏分泌促红细胞生成素(EPO), EPO可增加红细胞数量, 提高血液的运氧能力^[2,3]。在许多疾病状态下, 如肿瘤、中风、心肌梗死等, 这些适应性调节发生紊乱, 成为病理性因素之一。

多年来, EPO表达调控一直被用作低氧诱导基因研究的模型, 低氧诱导因子(HIF)就是作为EPO基因表达的转录因子被首先确定的。进一步研究HIF发现, 大多数低氧诱导基因的低氧诱导途径是通过HIF实现的。因此, HIF常被称为低氧适应调节的管家转录因子^[4]。

1 HIF的基本结构与功能

早就有人发现, 低氧刺激肾脏分泌EPO是登山运动员红细胞数量增多的原因, 全长人EPO序列的克隆使人们开始从基因表达水平上来研究肾脏分泌EPO的调控机制。研究表明, EPO的3'端增强子部位存在低氧诱导区, 该区可结合一种蛋白复合物, 命名为HIF-1。HIF属于DNA结合蛋白, 是由 α 和 β 两个亚单位组成的同源二聚体, α 和 β 亚单位同属bHLH/PAS基因家族, 其中 α 亚单位有3种, 分别为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 。HIF的bHLH区含有DNA结合区和HLH原发二聚体界面, PAS区由约300个氨基酸残基组成, 含有PAS-A和PAS-B两个半保守重复区, PAS区与HLH区共同形成继发二聚体界面(图1)。除HIF α 外, HIF β 也可与其他许多bHLH/PAS蛋白形成具有转录活性的同源二聚体, HIF $\alpha 1$ 和HIF $\alpha 2$ 的生物化学性质非常相似, 识别同样的DNA结合区, 但各自具有独特的生物学效应。如胚胎发育过程中, HIF $\alpha 1$ 调节血管生长, HIF $\alpha 2$ 则调节儿茶酚胺的生成^[5,6]。

作为转录活化因子, HIF作用于目的基因的增强子序

* [作者简介] 孙学军(1970-), 男(汉族), 博士, 副教授, 硕士生导师
E-mail: sunxjk@hotmail.com

列,调控多种基因的低氧诱导表达。这些基因主要包括葡萄糖代谢、细胞生长、氧运输和传递等^[7](表1)。

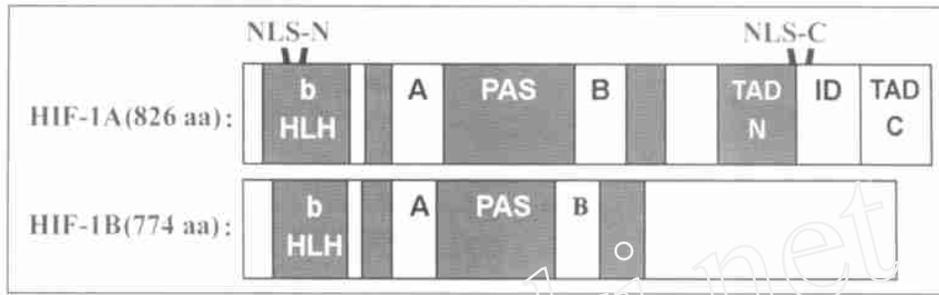


图1 低氧诱导因子的基因结构

Fig 1 Gene structures of HIF

Both bHLH and PAS are essential for dimerization and DNA-binding bHLH: Basic helix-loop-helix domain; PAS: Domain with A and B repeats, an amino-terminal(N) and carboxyl-terminal(C) nuclear localization signal(NLS); TAD: Transactivation domain; D: Transcriptional inhibitory domain

表1 HIF-1 调控的基因

Fig 1 HIF target genes and their roles in oxygen homeostasis

Categories	Target genes
Glucose metabolism	Aldolase A, aldolase C, enolase 1 (ENO 1), glucose transporter 1, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, hexokinase 1 and 2, lactate dehydrogenase A, phosphofructokinase L, phosphoglycerate kinase 1, pyruvate kinase M, glucose transports-1 and 3
Cell growth	Insulin-like growth factor 2 (IGF-2), IGF binding protein 1 and 3, P21, P35srj
Oxygen transport or delivery	Leptin, transferrin, transferrin receptor, erythropoietin (EPO), tyrosine hydroxylase, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor FLT-1, plasminogen activator inhibitor-1, α_B adrenergic receptor, nitric oxide synthase 2 (NOS2), heme oxygenase, intestinal trefoil factor, adrenomedullin, ceruloplasmin, endothelin-1
Others	Cytochrome oxidase-2, collagen prolyl hydroxylase α , presenilin 1 and 2, VL30, P53srj, ETS-1, DEC1

2 低氧对 HIF 的调节

细胞感受氧分压并将该信号传递到 HIF 的分子机制,是研究 HIF 面临的最大的挑战之一。早期研究认为,氧水平能影响 HIF α 的稳定性、亚细胞定位、DNA 结合能力和转录活性。在常氧条件下, HIF α 非常容易被降解,其降解途径是泛素-蛋白酶体复合体,抑制蛋白酶体或抑制泛素依赖酶均能阻断这一过程;在低氧条件下, HIF α 降解过程被阻断,导致 HIF α 堆积。这一研究结果主要得益于对一种遗传疾病的深入研究,该疾病被称为 Von Hippel-Lindau (VHL) 综合征,其主要特点是血管增生,原因是 VEGF 表达增多。VHL 是一种抑癌基因, VHL 综合征根本原因是 VHL 缺乏。

VEGF 是一种低氧诱导基因,是 HIF 的目标基因之一,提示 VHL 综合征可能与 HIF 有关。Maxwell 等^[8]研究发现,与正常细胞不同, VHL 基因缺陷细胞表达 HIF α 增多,常氧不能抑制这些细胞的 HIF α 表达水平, VHL 基因被重新导入这些缺陷细胞后,常氧就能抑制这些细胞的 HIF α 表达水平,说明 VHL 基因可能是调控 HIF α 表达的重要因素。HIF $\alpha 1$ 和 HIF $\alpha 2$ 的 PAS 区 C 端(非 PAS 区)附近由 200 个氨基酸残基左右组成的一个氧敏感区,是影响降解的重要结构,该区缺失后,在常氧条件下 HIF $\alpha 1$ 仍不被降解,因此被称为氧依赖降解区(ODD)。进一步研究表明, VHL 能与 HIF α 的 ODD 区结合形成复合物, VHL 复合物类似于泛素连接酶的作用,使 HIF α 与泛素依赖的蛋白酶体复合体结合并被该酶水解。低氧、铁离子螯合剂,如去铁敏都可阻断 VHL 这一作用^[9]。

HIF $\alpha 1$ 基因含 2 个转录活性区,即 N 末端转录活性区(NAD)和 C 末端转录活性区(CAD)。NAD 与 ODD 有一定的重叠, NAD 活性增强作用是促进 HIF 结构稳定; CAD 活性增强作用与结构稳定或蛋白含量无关,而与提高了 HIF $\alpha 1$ 和转录共激活蛋白的结合力有关, CAD 转录共激活蛋白包括 CBP/p300、类固醇激素受体共激活蛋白和转录中间因子 2。HIF $\alpha 2$ 和 HIF $\alpha 1$ 的结构和功能类似,但 HIF $\alpha 3$ 缺乏 CAD。所以,低氧诱导 HIF $\alpha 1$ 和 HIF $\alpha 2$ 水平增多除增加蛋白稳定性外,还促进 HIF 的转录活性。CAD 和 ODD 的转录活性都具有铁离子依赖性,并受到低氧正向调节,所以它们都被称为 HIF 的氧感受区^[10]。

经过对 ODD 的 VHL 结合区的细致研究,人们逐渐将目光集中在 HIF $\alpha 1$ 和 HIF $\alpha 2$ 上 ODD 的 VHL 结合区内一个小段区域,该区含 20 个氨基酸残基。体外生物合成的该区片段不能与 VHL 结合,加入用常氧处理的细胞提取液处理则可使它们结合,降低反应系统氧分压能使它们分离。也就是说,常氧处理的细胞能产生一种活性物质,这种活性物质可引起这一小区与 VHL 结合,而这种结合可被低氧阻断。类似现象也发生在 CAD,常氧诱导的某种活性物质能抑制 CAD 转录共激活蛋白的表达,低氧能阻断这一细胞活性物质发挥作

用。用线虫作进一步研究表明,这2种生物活性物质分别是脯氨酸羟化酶(PHD)和天冬氨酸羟化酶。PHD的作用是将ODD内的脯氨酸残基羟化,脯氨酸残基羟化促进了HIF α 与VHL蛋白的亲合力;天冬氨酸羟化酶的作用是将CAD内的天冬氨酸残基羟化,天冬氨酸残基羟化阻断p300与CAD的结合。因此,PHD和天冬氨酸羟化酶均负向调节HIF的活性,PHD作用提供VHL的结合位点,促进HIF α 水解,而天冬氨酸羟化酶作用是阻断HIF α 与p300的结合,抑制HIF α 转录活性。低氧和铁离子螯合剂能阻断脯氨酸羟化酶,限制VHL与ODD结合,增加HIF稳定性,提高HIF蛋白浓度。低氧和铁离子螯合剂也可阻断天冬氨酸羟化酶,促进p300与CAD结合,提高HIF的转录活性。两种羟化酶分别从蛋白含量和功能两个方面调节HIF^[11]。进一步研究表明,PHD的催化位点是HIF α 的第402和564位脯氨酸残基,天冬氨酸羟化酶的催化位点是HIF α 的第803位天冬氨酸残基。

3 氧感受器(PHD和天冬氨酸羟化酶)

通过对原核生物和酵母的研究,人们已经确定了许多氧感受器。关于高等生物的氧感受器,也有许多推测,如血红蛋白、NADPH氧化还原酶、线粒体电子传递链成分和氧敏感钾离子通道等,但这些推测均不能解释低氧调节HIF的分子机制。近年来,关于低氧调节ODD和CAD的生物化学机制的深入研究,大大促进了人们对高等生物的氧感受器的了解。HIF脯氨酸和天冬氨酸羟化酶被发现前,人们曾详细研究过胶原蛋白脯氨酸羟化酶和表皮细胞生长因子(EGF)天冬氨酸羟化酶,这些铁依赖的羟化酶催化区是一种由双链 α 折叠组成的类似果冻卷样的保守序列,这些酶活性中心亚铁离子结合位置为2个组氨酸1个天冬氨酸结构域。HIF脯氨酸和天冬氨酸羟化酶被发现后,利用蛋白数据库结合基因和生物化学分析,人们相继发现了3个新的HIF脯氨酸羟化酶同工酶,分别被称为PHD1、2和3,并发现了一个新的HIF天冬氨酸羟化酶,被称为因子抑制低氧诱导因子-1(FIH-1),FIH-1能羟化HIF上关键的脯氨酸和天冬氨酸。酶反应分析发现,这些酶活性的发挥依赖氧分子、Fe²⁺和 α -酮戊二酸的存在。在羟化过程中,氧分子提供氧, α -酮戊二酸脱羧形成琥珀酸,并消耗氧原子,产生CO₂(图2)。因此,通过对依赖氧的PHD和FIH-1羟化活性作用的抑制,低氧阻断PHD-HIF α -VHL的HIF α 降解和p300与CAD结合两条通路,分别使HIF蛋白含量和转录活性发生快速反转。在线虫和果蝇研究系统中,已证实存在PHD-HIF α -VHL通路,FIH-1的同源基因也已被确定,相信其作用方式也将很快明确^[12]。

PHD活性对梯度性氧分压降低非常敏感,PHD活性与HIF蛋白水平呈负相关。因此,人们认为PHD就是一种氧感受器。尽管尚缺乏直接实验证据,人们推测FIH-1也是一种氧感受器。在感受不同氧分压变动时,2种氧感受器可能有不同的分工,PHD感受较剧烈的氧分压变动,FIH-1感受精细的氧分压变动^[12]。PHD倾向于病理性低氧的调节,FIH-1倾向于生理性低氧,如在某些生长因子作用时。但令人不解

的是,当FIH-1过度表达时,FIH-1仍能部分抑制低氧时CAD活性,而低氧时其羟化作用被阻断,其原因可能是FIH-1能竞争p300与CAD的结合,也可能还存在其他未知共激活因子^[13]。

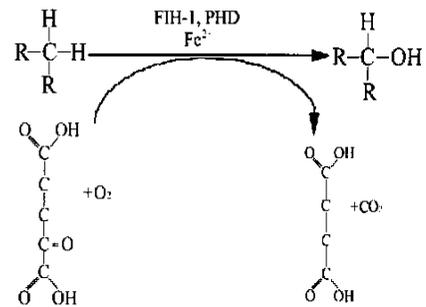


图2 脯氨酸和天冬氨酸羟化酶催化反应过程

Fig 2 General reaction scheme for oxygen-dependent hydroxylation by PHD/HPH and FIH-1 hydroxylases

已经证实,3种PHD特异性羟化靶点都是ODD内2个非常保守的序列LXXLAP^{*}(P^{*}表示PHD靶点)。当合成HIF-1 α 的VHL最小结合区片段时,只有关键脯氨酸残基采用4-羟基脯氨酸,该片段才能直接结合VHL蛋白,结构分析发现,该羟化脯氨酸残基的4-羟基可与VHL的氨基酸残基形成紧密结合的氢键,说明VHL蛋白特异性识别4-羟基脯氨酸。用HeLa细胞作为体外表达工具的研究发现,常氧条件下3种PHD酶的mRNA均可表达,PHD-1表达最多,而低氧只诱导PHD-2和PHD-3。也就是说,当恢复给氧时,PHD活性增强,促进HIF-1 α 降解,但PHD的合成下降,提示PHD表达水平上存在氧分压的负反馈调节机制^[12,14]。体外分析证明3种PHD有不同酶活性,但仍需要进一步确定各自在生理条件下的重要性。

对p300或CBP上CH1区与HIF-1 α 上CAD区结合的溶液状态分析表明,CH1区形成球形结构,CAD区类似手指或老虎钳样包绕在CH1球上,CAD上关键的第803位天冬酰胺残基45%埋在分子界面内,该天冬酰胺两支链上氢与CAD内第799位天冬氨酸残基形成两个氢键,对复合体的形成非常关键。EGF天冬氨酸羟化酶催化天冬氨酸和天冬酰胺羟化一般位于 α 碳,如果CAD上的天冬酰胺羟化也位于 α 碳,无论是形成赤-还是苏-对碘氧基苯甲醚均不利于p300/CBP-HIF复合物的形成。除 α 碳上羟化,FIH-1还可能羟化酰胺链上氮形成羟氨酸,事实上,HIF-1上的第803位天冬酰胺是 α 碳被羟化。如果CAD区上该天冬酰胺被天冬氨酸替换,FIH-1羟化酶的活性会下降到原来的7%。这些结果表明,与一般赤氨酸羟化酶或天冬氨酸/天冬酰胺双羟化酶不同,FIH-1只特异性羟化HIF-1 α 上CAD区内天冬酰胺,而不羟化天冬氨酸。这种特异识别天冬氨酸的特征提示,FIH-1是属于 α -酮戊二酸依赖天冬氨酸羟化酶家族的一组新成员。HIF-1 α 和HIF-2 α 的CAD内FIH-1结合区包含一个精氨酸-亮氨酸-亮氨酸结构,该结构与常氧时HIF-1 α 活性抑制有关。需要明确的是,CAD上被羟化的天冬酰胺与

CAD 内 F_H-1 相互作用区并不一致, 该天冬酰胺位于结合区 C 端外, 相距 20~30 个氨基酸残基。结合区与反应区的不一致对解释一些现象提供了依据, 如 CAD 临近抑制区 786~826 位氨基酸残基存在时, 常氧条件下 HIF-1 α 就表现出很强的 CBP/p300 结合活性^[15]。

除对 CAD 调节外, F_H-1 也可通过 α 区与 VHL 区结合, 表面上看, F_H-1 似乎通过与 VHL 区结合抑制 CAD 的活性, 实际上, 它可能存在更复杂的功能。而且 F_H-1 和 VHL 都可与组蛋白脱乙酰酶相互作用, 后者是重要的染色体修饰酶, 说明 F_H-1 和 VHL 能调节基因的表达。这些发现提示, F_H-1 的生物学作用远不仅是调节 CAD。

尽管 PHD 和 F_H-1 途径能非常清楚地解释低氧诱导 HIF 活性增强的机制, 但还不能完全解释其他一些诱导因子对 HIF 活性的调节机制, 如 NO、CO、活性氧和磷酸化过程 (p38, MAPK)。有关这些诱导因子对 PHD 和 F_H-1 功能调节的具体机制, 目前仍然了解较少, 作为氧分子类似物, NO 通过异青霉素 N 合成酶 (属 α -酮戊二酸氧化酶家族) 分解非血红素亚铁离子, 说明 NO 能够与这类酶的铁离子中心结合, 由于 NO 只能提供一个氧原子, PHD 和 F_H-1 则需要氧分子, 所以 NO 的作用可能是阻断这种作用, 这种推测符合 NO 诱导 HIF 活性的报道^[16]。有关胶原蛋白 PHD 研究发现, 活性氧也能影响胶原蛋白 PHD 的活性, 因此, 活性氧也可能通过影响 PHD 和 (或) F_H-1 的活性调节 HIF 的水平和活性。其他一些因子也有可能通过影响 VHL 泛酸或 CBP/p300 复合体形成。

低氧在各种疾病中的效应可分为增殖性 (肿瘤) 和损伤性 (中风等) 2 种。HIF 活性增加可促进新血管形成, 有利于减轻中风和心肌梗死损伤; HIF 活性降低, 可阻断新血管形成则可使肿瘤组织饥饿而产生治疗作用。与传统的羟化酶不同, F_H-1 活性中心缺乏精氨酸和赖氨酸, 活性发挥需要 α -酮戊二酸, 这些特殊性使开发相关特异性药物成为可能。除 HIF 途径以外, 受氧分压调节的细胞过程和蛋白还有许多, 如低氧对平滑肌细胞的复制周期延长调节与端粒酶催化元件磷酸化增强有关, 一些蛋白激酶也受低氧调节, 如 MAPK、二脂酰甘油激酶等, 低氧也可提高 VEGF 的 mRNA 稳定性。这些过程是否也有 PHD 和 F_H-1 的参与, 也值得深入研究。

[参考文献]

- [1] Storz G, Inlay JA. Oxidative stress[J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(2): 188-194.
- [2] Wiesener M S, Maxwell PH. HIF and oxygen sensing, as important to life as the air we breathe[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19(1): 183-190.
- [3] Semenza GL. HIF-1 and human disease: one highly involved factor[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(16): 1983-1991.
- [4] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(3): 1230-1237.
- [5] Huang ZJ, Edery I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors[J]. *Nature*, 1993, 364(6434): 259-262.
- [6] Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, et al. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and HIF-2 alpha in hypoxic gene regulation[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(24): 9361-9374.
- [7] Lando D, Goman JJ, Whitelaw ML, et al. Oxygen-dependent regulation of hypoxia-inducible factors by prolyl and asparaginyl hydroxylation[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(5): 781-790.
- [8] Maxwell PH, Wiesener M S, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis[J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 271-275.
- [9] Wiesener M S, Turley H, Allen W E, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Blood*, 1998, 92(7): 2260-2268.
- [10] Kung AL, Wang S, Kico JM, et al. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription[J]. *Nat Med*, 2000, 6(12): 1335-1340.
- [11] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF[J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1337-1340.
- [12] Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation[J]. *Cell*, 2001, 107(1): 43-54.
- [13] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. A prolyl hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch[J]. *Science*, 2002, 295(5556): 858-861.
- [14] Masson N, Willam C, Maxwell PH, et al. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-1 α chains activated by prolyl hydroxylation[J]. *EMBO J*, 2001, 20(18): 5197-5206.
- [15] Sang N, Fang J, Srinivas V, et al. Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 α is governed by a von Hippel-Lindau protein independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(9): 2984-2992.
- [16] Huang LE, Willmore W G, Gu J, et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 9038-9044.

[收稿日期] 2004-01-09

[修回日期] 2004-05-10

[本文编辑] 尹 茶