

细胞低氧感知与响应

——2019年诺贝尔生理学或医学奖成果简析

叶盛

北京航空航天大学医工交叉创新研究院;北航-首医大数据精准医疗高精尖创新中心,北京 100191

摘要 2019年诺贝尔生理学或医学奖颁给了 William G. Kaelin, Jr、Sir Peter J. Ratcliffe、Gregg L. Semenza, 以奖励他们在细胞低氧感知与适应的相关研究中所做出的开创性贡献。他们发现细胞利用了转录因子 HIF-1 的 α 亚基上的羟基化修饰来感知细胞内的氧水平, 而低氧条件下未羟基化的 HIF-1 α 会快速累积, 并进入细胞核内调控上千个基因的转录。细胞低氧响应与多种人类疾病紧密相关, 包括贫血症、红细胞增多症、心血管疾病、卒中以及癌症。回顾了细胞低氧响应信号通路的发现过程以及与低氧响应有关的人类疾病。

关键词 2019年诺贝尔生理学或医学奖; 氧; 细胞低氧诱导因子; 促红细胞生成素; 血管上皮生长因子

2019年10月7日, 瑞典皇家科学院诺贝尔奖评审委员会将2019年诺贝尔生理学或医学奖颁发给美国科学家威廉·凯林(William G. Kaelin, Jr)、英国科学家彼得·拉特克利夫(Sir Peter J. Ratcliffe)、美国科学家格雷格·塞门扎(Gregg L. Semenza), 以奖励他们在细胞低氧感知与适应相关研究中所做出的开创性贡献(图1)。

1 获奖者及其研究经历

在当前的3位诺奖获得者当中, 塞门扎的贡献



图1 2019 诺贝尔生理学或医学奖的3名获得者
Fig. 1 Three winners of the Nobel Prize in Physiology or
Medicine 2019
(图片来源: www.nobelprize.org)

收稿日期:2019-11-21;修回日期:2019-11-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31871287)

作者简介:叶盛,教授,研究方向为癌症等重大疾病的分子病理机制,电子信箱:yesheng@buaa.edu.cn

引用格式:叶盛. 细胞低氧感知与响应——2019年诺贝尔生理学或医学奖成果简析[J]. 科技导报, 2019, 37(24): 41-50; doi: 10.3981/j.

issn.1000-7857.2019.24.006

主要是发现了细胞各种低氧响应举措的关键调控因子,凯林和拉特克利夫各自独立发现了这种调控因子如何直接感知低氧环境。3位科学家的工作综合在一起,完成了细胞对低氧环境的感知与响应的完整链条。值得一提的是,这3位科学家同样因为对于细胞低氧研究领域的贡献而于2016年获得了拉斯克奖。

格雷格·塞门扎 1956 年出生于美国纽约市的法拉盛地区,于 1974 年进入哈佛大学学习遗传学。由于受到一名亲属产下唐氏综合征婴儿的影响,塞门扎在本科毕业之后决定进入宾西法尼亚大学攻读医学博士和哲学博士双学位。在此期间,他接触到了珠蛋白生成障碍性贫血的研究,并最终成为了一名儿科医生^[1]。1986 年,塞门扎获得博士学位并完成临床医生的全部训练之后,选择来到约翰·霍普金斯大学,作为博士后加入了斯蒂利亚诺斯·安东那拉基斯(Stylianos Antonarakis)的研究组,因为后者是当时世界上研究珠蛋白生成障碍性贫血的顶级专家。然而该研究组的研究方向很快就转向了血友病。塞门扎在尝试构建一个与血友病有关的重要基因的转基因小鼠时,利用公司附赠的促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因构建了 EPO 基因的转基因小鼠。由此,塞门扎开始了对于 EPO 的研究,并于 1991 年在 EPO 基因的调控机制研究中发现了低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)。塞门扎在约翰·霍普金斯大学独立建立实验室之后,一直致力于 HIF-1 的研究工作,不但发现 HIF-1 是由两个不同蛋白质亚基组成的异源二聚体,还找到了众多由 HIF-1 调控的基因。这些基因的表达产物共同构成了细胞对低氧环境的响应举措。塞门扎因为在细胞低氧问题研究中所做出的一系列奠基性重要发现,于 2010 年当选为美国科学院院士。

彼得·拉特克利夫 1954 年出生于英国兰开郡。他在剑桥大学进行了医学基础知识的学习后,进入伦敦玛丽王后大学附属的圣巴塞洛缪医院进行临床实习,并于 1978 年以优异的成绩获得内外全科医学士学位(MB ChB)。此后,他于牛津大

学接受了进一步的肾脏医学培训,并在此期间开始关注肾脏疾病与氧的关系问题。1990 年,拉特克利夫得到了英国著名的惠康(Wellcome Trust)基金会的资助,以惠康资深研究人员的身在牛津大学的韦瑟罗尔分子医学研究所内建立了自己的低氧生物学实验室。2004 年,拉特克利夫成为了牛津大学的纳菲尔德临床医学教授,并担任纳菲尔德临床医学系的系主任。2016 年,以 DNA 双螺旋结构发现者命名的弗朗西斯·克里克研究所任命拉特克利夫为临床医学主任。临床医生出身的拉特克利夫从肾脏疾病的研究出发,发现冯·希佩尔-林道病(von Hippel-Lindau disease, VHL)的致病关键蛋白质 VHL 与 HIF-1 有直接结合,并决定着 HIF-1 在细胞内的命运。此后,结合其他研究组在当时取得的进展,拉特克利夫的研究组发现了氧浓度与 HIF-1 羟基化修饰之间的关系,以及这种修饰与 VHL 结合能力的关系,构建了细胞低氧感知的完整链条。由于拉特克利夫在细胞低氧感知以及相关肾脏疾病的研究方面做出的突出贡献,他于 2002 年入选英国皇家学会会员以及英国医学科学院院士,并于 2014 年被英国皇室授予了骑士爵位。

威廉·凯林于 1957 年出生在美国纽约市。他在杜克大学获得数学和化学的学士学位后,继续留校攻读医学博士学位。此后凯林前往约翰·霍普金斯大学完成了住院医师的培训,并在哈佛大学的戴纳-法伯癌症研究所进行了肿瘤学方向的博士后研究。本科期间的一些经历让凯林认为自己并不适合进行学术研究工作,但是在戴纳-法伯癌症研究所的博士后研究工作令他重拾自信^[2]。1993 年,凯林在该研究所建立自己的实验室时,决定应用博士后期间研究视网膜母细胞瘤的成功经验和方法来研究 VHL 病。之所以做出这样的选择,原因之一就是两类疾病的一些显著相似性,包括生血管和 EPO 水平提高等特征,而这些特征又与细胞低氧的情况有着相似性。凯林和其他一些研究者都相信 VHL 与细胞低氧之间有着某种联系。最终,他的研究组发现了 VHL 蛋白在细胞低氧感知中所扮演的角色,又与本次诺贝尔奖的另一位获得奖者拉特

克利夫同时发现了氧浓度与 HIF-1 羟基化修饰之间的关系,及其与 VHL 蛋白的关系。2008 年,凯林被委任为戴纳-法伯癌症研究所的基础科研助理所长。

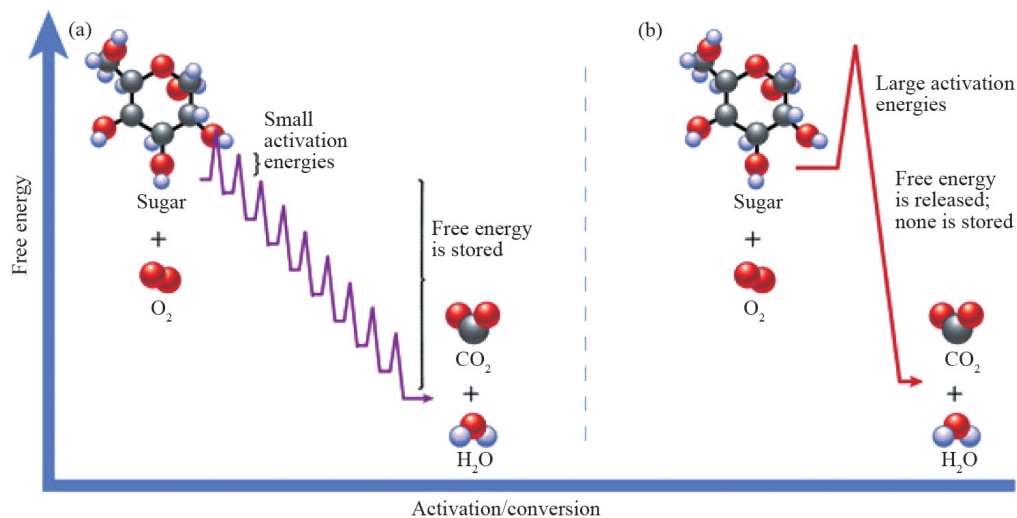
2 细胞对低氧状态的感知与响应

2.1 氧气与地球生命

今天,以动物为主体的相当一部分地球生命都是依赖氧气生存的,但是在漫长的地球历史上,氧气所扮演的角色曾经是完全相反的。在地球上出现生命之后,很快就出现了能够进行光合作用的单细胞生物,这个时间大约是在 38 亿年前。通过光合作用,这些生物在利用太阳光能的同时,也产生了一些副产物。最初的副产物以单质硫为主,又经过了几亿年的进化,才出现了会产生氧气这种副产物的新型光合作用。

氧气对于地球早期的生命而言,不仅不是生命的必需品,反而是一种有毒的物质。随着产氧的原始藻类不断繁盛,氧气在大气层中逐渐累积,在大约 24 亿年前形成了富含氧气的氧化性大气环境。无法适应这种富氧环境的生命逐渐死亡,能够适应这种富氧环境的生命则逐渐兴盛,进一步繁衍成为今天枝繁叶茂的“地球生命之树”。也就是说,今天的动物等众多生命形式对于氧气的依赖性,其实是氧气环境对于早期地球生命筛选的结果,是进化过程中意义重大的一次适应。

动物生命的共同特征之一,就是不依赖光合作用或酵解作用(能量利用效率相当低)作为能量的主要供给来源,而是通过对葡萄糖等有机分子的氧化来释放能量。与日常可见的燃烧等剧烈氧化过程不同的是,能量物质在细胞中的氧化是一个缓慢且可控的过程,在充分氧化释放能量的同时又不会对细胞产生不必要的伤害(图 2)。



(a)葡萄糖分子在细胞内逐步氧化释放能量;(b)葡萄糖分子通过燃烧剧烈释放能量

图 2 葡萄糖释放能量的不同途径

Fig. 2 The different energy releasing patterns of glucose

(图片来源:www.nature.com)

由于氧的不可或缺性,使得动物细胞必须具备对于供氧水平的感知能力,并且能够在供氧不足时

做出及时而恰当的响应,从而维持细胞机能的正常运转。

2.2 机体对供氧不足的应对措施

对于体内的细胞而言,供氧不足往往是由两方面的原因造成的:一是细胞自身的耗氧量突然急剧升高,使得正常水平的供氧量显得远远不足;二是机体的供氧水平的确降低到了正常水平之下,导致细胞供氧不足。

上述第一种情况在日常活动中经常会出现,比如肌肉的剧烈运动、脑的强烈神经活动,都会迅速提高相应细胞的能量需求,因而加剧了对于氧分子的需求量。对于此类情况,机体有着丰富的应对措施。一方面,肌肉等组织中存在肌红蛋白,能够像红细胞中的血红蛋白一样与氧分子结合,形成细胞内的氧储备,用以应对临时性的耗氧量增加。像鲸豚类水生哺乳动物,正是依靠极高的肌红蛋白含量来满足长时间水下活动对氧分子的需求。另一方面,在血红细胞中还会专门合成2,3-二磷酸甘油酸等小分子,提高血红蛋白向肌肉等组织释放氧的能力。此外,动物还可以通过特定激素的分泌,结合神经系统的调控,共同提高机体的呼吸频率、心率以及血压,从而提升血液向全身输送氧气的效率,达到临时提高供氧水平的目的。

除了上述暂时性缺氧以外,人类的身体还会出现长期供氧不足的状态。比如身处高海拔地区时,由于空气稀薄的原因,通过正常呼吸所获得的氧气必然会减少。此外,贫血等特定疾病、受伤失血、吸烟以及某些亚健康状态,也会导致全身或身体局部长时间无法获得充足的氧供给。不言而喻,提高心率等临时性措施并不适宜长期采用,因此机体必然存在其他提高氧供给的方法。

早在20世纪初,法国科学家保罗·卡诺特(Paul Carnot)就提出猜想,认为血液中红细胞的产生受到了机体内某种激素的调节。1977年,这种被命名为促红细胞生成素的激素才被美国生物化学家尤金·戈德瓦瑟(Eugene Goldwasser)从再生障碍性贫血病人的尿液中提取并纯化得到^[5]。EPO是一种糖蛋白激素,也就是一种表面带有糖基化修饰的蛋白质,主要由肾脏合成,能够刺激骨髓中的造血细胞分裂形成新的红细胞。

实际上,我们的身体还会采取其他一些措施来

适应低氧环境。比如分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),促进毛细血管的生长,让血液的运输更加深入到身体组织内部。另外,细胞表面的葡萄糖转运蛋白(glucose transporter 1, GLUT1)表达水平也会增高,提升细胞摄取葡萄糖的效率,促进能量代谢。

然而,细胞是如何感知到低氧环境的?又是如何将这种感知信号转化为EPO、VEGF、GLUT1等蛋白质的高水平表达的?这些问题在20世纪90年代之前都是没有答案的。

2.3 低氧诱导因子HIF-1

关于细胞低氧感知与响应的研究突破口首先出现在EPO上。此次诺贝尔奖的获得者之一——格雷格·塞门扎在约翰·霍普金斯大学从事博士后研究期间,利用公司附赠的人源EPO基因构建了一种转基因小鼠,结果发现这种小鼠的体内不但能够合成人源EPO,而且这些人源EPO还对小鼠产生了刺激作用,使得小鼠的红细胞显著增多^[6]。该工作一方面进一步确证了EPO的促红细胞生成作用,另一方面也说明,与小鼠源EPO氨基酸序列一致性高达80%的人源EPO在小鼠体内同样可以发挥激素的正常功能。

随后,在进一步的深入研究中,塞门扎发现人源EPO基因的上下游均有能够调控该基因的顺式调控元件,特别是转录增强子^[5]。所谓基因的调控元件,是与基因处于同一DNA链上,位于基因上游或下游的DNA序列,虽然这些序列不直接编码蛋白质,但是通过一些调控因子蛋白与这些调控元件序列的特异性结合,就能够实现对该基因表达情况的调控。转录增强子就是能够提高相关基因转录水平的调控元件,通过转录出更多信使RNA的方式来提高该基因所编码的蛋白质在细胞内的表达水平。显然,EPO基因的转录增强子一定也存在着与之相结合的调控因子蛋白。

1991年,塞门扎等接连在《美国科学院院报》上发表了2篇与EPO基因调控有关的论文,均与低氧问题有联系。在第1篇论文^[6]中,塞门扎等人发现贫血小鼠的肝脏细胞核提取物中含有某种调控因子蛋白,能够与EPO基因转录增强子相结合。

由于贫血症会导致供氧不足的问题,所以这种调控因子蛋白应该是贫血导致的低氧所诱发的。进一步地,塞门扎将EPO基因的转录增强子序列连接到特定的报告基因上,发现低氧环境会导致报告基因的强烈表达,说明这种低氧环境触发了EPO基因的转录增强子。因此,塞门扎等人称这些调控因子蛋白为低氧诱导因子。在第2篇论文^[7]中,塞门扎等人进一步确认,EPO基因转录增强子起作用的方式是较为复杂的,在不同器官组织的细胞中有着不同的调控方式,但一定都是由低氧条件诱导产生的。塞门扎等人的这2篇论文正式开启了在分子水平上研究细胞低氧问题的新时代。

塞门扎结束博士后工作之后在约翰·霍普金斯大学建立了自己的研究组,并继续关注于低氧诱导因子的研究领域。虽然此前工作已经证实了低氧诱导因子的存在,但是这种蛋白并未被真正找到,也就是说尚缺乏直接证据。塞门扎和他的来自中国的博士研究生王广良,马不停蹄地投入到对于低氧诱导因子蛋白的寻找工作中。在1992年发表的一篇论文中显示,他们通过不断精细化的EPO基因转录增强子定位,锁定了在人工低氧环境中的细胞所产生的低氧诱导因子蛋白,并命名为HIF-1^[8]。1995年,他们从生产EPO的肝脏细胞中纯化出了HIF-1蛋白,并证实该蛋白实际上是由2个不同亚基构成的异源二聚体^[9]。在同年发表的另一篇论文中,王广良和塞门扎成功克隆得到了HIF-1的2个亚基HIF-1 α 和HIF-1 β 的基因,从而能够对这2个亚基进行详细的结构域分析,确定两者同属于含有PAS结构域的一类蛋白质^[10]。

塞门扎在此后的研究生涯中一直致力于HIF-1等低氧诱导因子的研究。他发现由低氧诱导因子进行调控的基因远远不止是EPO、VEGF、GLUT1等少数几个,而是多达整个基因组5%以上的基因^[11]。这一事实说明,低氧条件对细胞和机体产生的影响是非常巨大且极其复杂的。

2.4 HIF-1 α 的泛素化依赖性降解

在组成的HIF-1的2个亚基当中,只有被命名为HIF-1 α 的亚基是一个新发现的蛋白质,而被命名为HIF-1 β 的亚基则是一个当时已知的蛋白质

——芳香烃受体核转位蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)。顾名思义,该蛋白能够结合芳香烃受体,并在核内结合相关基因附近的调控元件序列。实际上,ARNT与芳香烃受体的这种合作方式,是一大类基因调控因子共享的一种工作模式。打比方来说,HIF-1 β (也就是ARNT)是一只右手,它单独无法拨动基因调控的开关,还需要一只左手的帮助,而这只左手可以是芳香烃受体蛋白,也可以是HIF-1 α ,还可以是其他的调控因子蛋白。显而易见,由于HIF-1 β 被多重生理事件所共用,应该不会受到低氧与否的直接调控,否则就会错误地对其他基因调控功能产生交叉影响。因此,当时已经有研究者预测,细胞低氧所影响的应该是HIF-1 α 。

上述预测很快被实验结果所证实。哈佛大学医学院富兰克林·邦恩(H. Franklin Bunn)教授的研究组发现,环境低氧与否并不会影响细胞中HIF-1 β 的水平,但是富氧环境会令HIF-1 α 变得极不稳定,而低氧环境则能迅速稳定HIF-1 α ,使其快速积累^[11]。通过进一步地深入研究,邦恩的研究组发现促使HIF-1 α 变得不稳定的原因是细胞一直在通过泛素-蛋白酶体降解途径来降解HIF-1 α ^[12]。

泛素是一种广泛存在于真核细胞当中的小蛋白质。在泛素连接酶的催化作用下,泛素可以通过自己的羧基端与其他蛋白质表面特定赖氨酸残基的侧链氨基发生缩合反应,形成共价键连接,称为泛素化修饰。实际上,细胞内部的蛋白质表达生产出来之后,有着极其丰富多变的化学修饰方式,统称为翻译后修饰。这些修饰能够显著改变被修饰蛋白质的某些理化特性,从而起到一种类似于功能“开关”的作用。

泛素化能够改变被标记蛋白质在细胞内的时空定位,以多种方式影响其命运与功能。泛素化标记最主要的功能之一,就是将被标记蛋白质带往细胞内的蛋白酶体,在多种蛋白酶共同作用下,使被标记蛋白质降解,从而达到关闭或减弱该蛋白质原有功能的目的。邦恩研究组在1998年发表的研究论文中指出,HIF-1 α 在富氧环境的细胞中会发生严重的泛素化,从而被蛋白酶体所降解,也就无法

结合 HIF-1 β 来发挥基因调控的功能^[12]。

2.5 冯·希佩尔-林道病与 VHL 蛋白

当 HIF-1 α 吸引了大部分细胞低氧问题研究者的注意力时,另一些研究者则把目光投向了一种名为冯·希佩尔-林道病的罕见遗传病。这种疾病是由与之同名的 VHL 蛋白的基因突变所引起的,病人会在小脑、脊髓、视网膜,以及肾脏等部位出现血管瘤细胞瘤,且在癌组织中出现异常高水平的 VEGF、GLUT1 等蛋白质。这种现象非常像是 HIF-1 在细胞低氧状态下所引发的反应。

来自哈佛大学医学院戴纳-法伯癌症研究所的马克·古德伯格(Mark Goldberg)以及本次诺贝尔奖得主之一威廉·凯林,在研究中发现,VEGF、GLUT1 等蛋白质的异常高表达可以通过重新在细胞中引入无突变的正常 VHL 蛋白来缓解^[13]。也就是说,只要 VHL 病人细胞中重新出现正常的 VHL 蛋白,那么 VEGF、GLUT1 等蛋白质的生产水平就会得到抑制。

那么,VHL 蛋白会不会与 HIF-1 有着某种直接的关联呢?本次诺贝尔奖的另一位得主彼得·拉特克利夫循着这一方向进行了深入探索,并于 1999 年在《Nature》上发表论文^[14],证明 VHL 蛋白的确能够与 HIF-1 蛋白结合到一起,说明两者有直接的关系。他还在文章中展示了 VHL 对 HIF-1 的巨大影响力:当细胞从低氧切换回富氧状态时,VHL 蛋白可以让 HIF-1 的半衰期降到 5 min 左右;而在 VHL 有缺陷的细胞中,这一数字是 60 min,说明此时 HIF-1 有更大的机会进入细胞核去开启低氧响应。

此前已经有证据显示,VHL 蛋白与其他蛋白质共同组成了一个蛋白质复合体,很可能起到了泛素连接酶的作用。在拉特克利夫的文章发表几个月之后,一个瑞士的研究组最终证实 VHL 蛋白的确就是泛素连接酶复合体的一部分^[15]。次年,凯林^[16]和拉特克利夫^[17]各自的研究组以及另外两个实验室^[18-19]接连发表文章,从体内实验和体外实验等多个角度证实,VHL 蛋白所在的泛素连接酶复合体正是以 HIF-1 α 为底物的。也就是说,VHL 蛋白是泛素连接酶用以识别并结合 HIF-1 α 的关键。

至此可以确定的是,在 VHL 基因正常的细胞

内,正常的 VHL 蛋白能够介导 HIF-1 α 的泛素化,造成后者的降解。但是当低氧环境出现时,上述泛素化降解途径为什么不能工作了呢?或者说,细胞到底是如何直接感知到低氧信号的呢?

2.6 氧依赖性的羟基化修饰

在此前的细胞低氧研究中,凯林和拉特克利夫分别做出了重要贡献,也形成了一种竞争关系。为了解开细胞低氧感知的秘密,两个研究组都在迅速推进工作,并且几乎在同一时间找到了答案。最终,他们各自的研究团队在 2001 年 4 月的《Science》上以“背靠背”的形式分别发表了一篇文章,阐述了细胞感知低氧的原理^[20-21]。

由于此前的其他已有研究已经做好了铺垫,所以凯林和拉特克利夫所采用的研究思路也是基本一致的。首先,两人都想到了氧的问题可能与除泛素化之外的其他类型翻译后修饰有关。当时被研究者们寄予厚望的是磷酸化修饰,但是两人的研究都证明,HIF-1 α 上可以接受磷酸化修饰的酪氨酸等残基突变之后,并不影响其对低氧的感知。

此前邦恩曾提出,HIF-1 α 上有一个氧气依赖的降解结构域^[12]。无论氧的存在与否引发了何种效应,它一定就发生在这个结构域中。凯林采用了突变扫描的办法,将该结构域逐段替换成连续的甘氨酸来观察对功能的影响,最终锁定了一个关键区段。拉特克利夫则通过对不同物种的 HIF-1 α 序列进行比对,锁定了氧气依赖的降解结构域当中一个高度保守的区段。上述两个区段是几乎重合的。

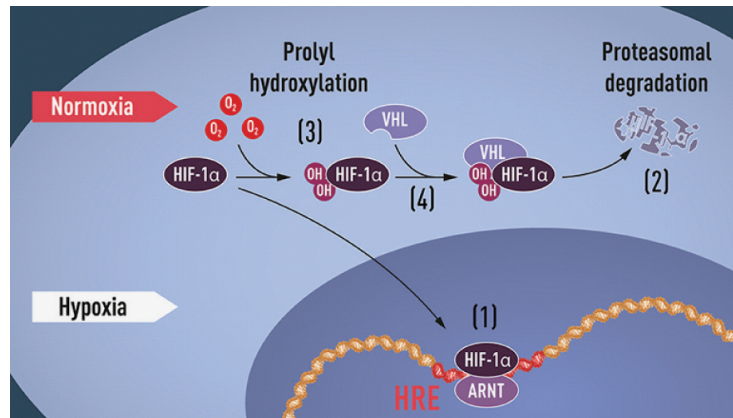
此后,两个研究组采用了相同的手段,都是利用细胞提取物对这段多肽进行了处理,再进行质谱分析,结果发现多肽分子量提高了 16 道尔顿,并最终确证是在 HIF-1 α 的 564 位脯氨酸残基上发生了羟基化修饰所致。该修饰过程需要氧的参与,只有在细胞处于富氧环境,有足够的氧时才能完成。而经过了羟基化修饰的 HIF-1 α 才能被 VHL 可靠识别,并介导泛素化的发生^[20-21]。

至此,细胞对低氧环境的感知与响应机制就已经基本清晰了。正常富氧情况下,细胞一直在生产 HIF-1 α 和 HIF-1 β 。但是由于后者在细胞中还有其他的功能,所以并不会受到有无氧气的影响。而

HIF-1 α 会在564位的脯氨酸上发生依赖于氧的羟基化修饰,从而被VHL蛋白识别,并介导泛素化的发生。此后,泛素化的HIF-1 α 迅速被蛋白酶体降解,不会与HIF-1 β 结合进入细胞核内。

当细胞遭遇低氧环境时,没有足够的氧来完成HIF-1 α 的羟基化。未经羟基化的HIF-1 α 不会被

VHL可靠识别并泛素化,也就不会被降解。当其与HIF-1 β 结合后,就能进入细胞核内,开启或增强EPO、VEGF、GLUT1等一系列基因的表达,令细胞对低氧做出响应(图3)。VHL病人细胞内的突变VHL无法正常工作,也就无法实现HIF-1 α 的泛素化降解,其效果与低氧环境中是一致的。



注:细胞低氧状态下,HIF-1 α 无法发生羟基化,就不会被降解,因而能够进入细胞核调控一系列基因的转录表达

图3 细胞对低氧的响应

Fig. 3 Cell response to hypoxia

(图片来源:www.medgadget.com)

3 细胞低氧与疾病

2019年诺贝尔生理学或医学奖颁给细胞低氧领域的有关研究成果,一方面体现了细胞低氧研究在人类认识自身氧代谢与调节方面的重要性,另一方面也是由于细胞低氧问题与多种人类疾病有着紧密的联系。

首先与细胞低氧问题密不可分的疾病就是贫血症。贫血症是一大类疾病的统称,发病机理各异,但最终大都会体现为血红细胞的匮乏,进而导致机体细胞无法获得充足的氧供给,进入低氧状态。实际上,细胞低氧的早期研究就是利用贫血症细胞来开展的,围绕的核心也正是对贫血症病人有着重要意义的EPO。随着相关研究的深入开展,重组人源EPO已经成为一种对部分贫血症具有显著治疗效果的注射药物。

然而,重组人源EPO作为一种蛋白质药物,生产成本低,储运使用方法复杂,使得药价高昂,也不方便病人的使用。为了解决这些问题,人们一直在寻找新的贫血症药物研发思路,比如能否直接利用小分子药物激活HIF-1,从而促进机体自身的EPO合成。2019年,珐博进(中国)和阿斯利康(中国)合作研发的一种新型小分子药物罗沙司他(Roxadustat,商品名:爱瑞卓)获批在国内上市销售,正是这一思路当中第1种取得成功的药物。罗沙司他能够抑制细胞内的脯氨酸羟化酶活性,从而阻止HIF-1 α 的羟基化,起到了低氧的同等效应。在这种情况下,HIF-1进入细胞核,增强了EPO的表达,刺激更多红细胞的产生,解决了病人的贫血问题。上海瑞金医院陈楠教授主导的临床研究表明,无论是长期透析性还是非透析性的肾性贫血症患者,都能在罗沙司他的治疗下缓解贫血症状,且不会提高

心血管不良事件的发生率^[23-24]。值得一提的是,罗沙司他也是中国本土研发成功的第1种国际首创原研药。

另一种与细胞低氧问题有联系的疾病是脑卒中。由于细胞低氧会提高一系列蛋白质的表达水平,包括多种激素,从而对人体产生全局性的影响,因此身体局部的低氧刺激可能导致身体整体对低氧的耐受力得到提高。2001年,塞门扎撰文指出,HIF-1在各种缺血性心脑血管疾病的预防中扮演着重要角色^[2]。以这些理论为基础,逐渐形成了缺血预适应这种训练方法,通过对手臂等以肌肉组织为主的部位进行重复性间歇缺血刺激,提高心脑血管等部位的血管强健程度,从而降低脑卒中等疾病的发病风险。

细胞低氧问题还与癌症有着紧密的联系。在肿瘤内部,由于癌细胞不受控的快速分裂增殖,导致大量细胞聚集在一起,却没有血管可以带来养分和氧气,也无法带走各种代谢废物。因此,肿瘤内部的细胞通常会陷入低氧环境中,从而通过HIF-1开启或增强一系列基因的表达,其中包括促进能量物质无氧酵解的酶,也包括VEGF等促进血管生成的激素,以及导致癌细胞规避凋亡并启动转移机制的信号通路。事实上,生血管和癌转移正是恶性肿瘤的标志事件,充分说明了HIF-1及其导致的低氧响应在癌症病理发展过程中的重要性。像地高辛(Digoxin)等HIF-1的抑制剂药物在临床应用中表现出了抑制部分种类肿瘤生长的效果。塞门扎目前正在研究其他靶向HIF-1的抗癌新药。

未来,细胞低氧感知与响应通路上的蛋白质仍将是癌症等疾病的诊疗研究中关注的重点之一,有可能诞生出新的抗癌药物,特别是在癌症转移的抑制方面大有可为。根据世界卫生组织的统计,死于癌症的患者当中,大部分是由于癌症转移所造成的,而目前还没有能够有效抑制癌细胞转移的药物。由于癌细胞的转移是由HIF-1所开启的,是癌细胞对低氧做出的响应之一,因此很可能在细胞低氧问题的深入研究中催生高效的癌转移抑制药物,让癌症患者在治愈之后不必再为癌细胞转移而忧心忡忡。

4 结论

人们都知道氧对于动物生命的重要意义。反过来,氧的可获取性也的确限制了人类的活动空间。对于细胞低氧领域的持续深入研究,未来有可能令人类在水下和太空等环境中获得更为自由的行动能力。目前,EPO等相关手段已经被少数人用于提高运动员的运动能力,破坏了竞技体育的公平性,也令兴奋剂检查面临全新的挑战,这就必然需要低氧相关学术研究的深入开展,以提供相应的技术支持。此外,低氧领域的研究不仅仅对癌症等疾病的治疗有着现实意义,很可能也与衰老问题的解决有着联系。衰老的特征之一就是机体对远端组织和重要器官的供氧能力下降,且细胞不再对这种低氧状态做出及时有效的响应。通过人为诱发低氧响应将有望改善机体的能量代谢状态,延缓衰老。本次诺贝尔奖的颁发无疑将对细胞低氧相关领域的研究产生显著的刺激与推动作用,催生更多造福人类的医药与健康产品。

参考文献(References)

- [1] Ahmed F. Profile of Gregg L. Semenza[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the united States of America, 2010, 107(33): 14521-14523.
- [2] Hurst J H. William Kaelin, Peter Ratcliffe, and Gregg Semenza receive the 2016 Albert Lasker Basic Medical Research Award[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2016, 126(10): 3628-3638.
- [3] Miyake T, Kung C K, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1977, 252(15): 5558-5564.
- [4] Semenza G L, Traustman M D, Gearhart J D, et al. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(7): 2301-2305.
- [5] Semenza G L, Dureza R C, Traustman M D, et al. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: Multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements[J]. Molecular and Cellular Biology, 1990, 10(3): 930-938.

- [6] Semenza G L, Nejfelt M K, Chi S M, et al. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(13): 5680-5684.
- [7] Semenza G L, Koury S T, Nejfelt M K, et al. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(19): 8725-8729.
- [8] Semenza G L, Wang G L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Molecular and Cellular Biology, 1992, 12(12): 5447-5454.
- [9] Wang G L, Semenza G L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(3): 1230-1237.
- [10] Wang G L, Jiang B H, Rue E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(12): 5510-5514.
- [11] Huang L E, Arany Z, Livingston D M, et al. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(50): 32253-32259.
- [12] Huang L E, Gu J, Schau M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(14): 7987-7992.
- [13] Iliopoulos O, Levy A P, Jiang C, et al. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(20): 10595-10599.
- [14] Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis[J]. Nature, 1999, 399(6733): 271-275.
- [15] Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity[J]. Genes Development, 1999, 13(14): 1822-1833.
- [16] Ohh M, Park C W, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein[J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(7): 423-427.
- [17] Cockman M E, Masson N, Mole D R, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(33): 25733-25741.
- [18] Kamura T, Sato S, Iwai K, et al. Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(19): 10430-10435.
- [19] Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, et al. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein[J]. EMBO Journal, 2000, 19(16): 4298-4309.
- [20] Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing[J]. Science, 2001, 292(5516): 464-468.
- [21] Jaakkola P, Mole D R, Tian Y M, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation[J]. Science, 2001, 292(5516): 468-472.
- [22] Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends in Molecular Medicine, 2001, 7(8): 345-350.
- [23] Chen N, Hao C, Peng X, et al. Roxadustat for Anemia in Patients with Kidney Disease Not Receiving Dialysis [J]. New England Journal of Medicine, 2019, 381(11): 1001-1010.
- [24] Chen N, Hao C, Liu B C, et al. Roxadustat Treatment for Anemia in Patients Undergoing Long-Term Dialysis [J]. New England Journal of Medicine, 2019, 381(11): 1011-1022.

Cellular sensing of and responding to hypoxia: A discussion on the Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019

YE Sheng

Interdisciplinary Innovation Institute of Medicine & Engineering, Beijing Advanced Innovation Center for Big Data-Based Precision Medicine, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

Abstract The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019 was awarded jointly to William G. Kaelin Jr, Sir Peter J. Ratcliffe and Gregg L. Semenza for their discoveries of how cells sense and adapt to oxygen availability. They discovered that cells employ the hydroxylation of HIF-1 α , a subunit of the transcriptional factor HIF-1, to sense the cellular oxygen level, and, consequently, the unhydroxylated HIF-1 α under hypoxic conditions will be rapidly accumulated and enter the nucleus to regulate the transcription of over one thousand genes. The hypoxic response is closely related to a number of human diseases, including anemia, polycythemia, cardiovascular disease, stroke, and cancer. This paper reviews the history of the discovery of the cellular hypoxic response pathway, as well as human diseases involved.

Keywords Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019; oxygen; hypoxia-inducible factor; erythropoietin; vascular endothelial growth factor ●



(责任编辑 徐丽娇)