

## HIF-2 $\alpha$ 在肺动脉高压中的研究进展

冀 磊<sup>1,2,3</sup>, 李占强<sup>1,2\*</sup>, 芦殿香<sup>1,2\*</sup>

(1. 青海大学高原医学研究中心, 青海 西宁 810001; 2. 高原医学教育部重点实验室、青海省高原医学应用基础重点实验室 (青海-犹他高原医学联合重点实验室), 青海 西宁 810001; 3. 青海省人民医院, 青海 西宁 810007)

**摘要:** 肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种以肺血管阻力进行性增加、闭塞性血管重构为特征的疾病。低氧诱导因子-2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-2 alpha, HIF-2 $\alpha$ ) 是参与肺血管细胞异常增殖和肺血管重构过程的关键因子之一。本文主要从细胞水平、整体水平综述 HIF-2 $\alpha$  在 PH 发生中的作用及其机制, 并对目前以 HIF-2 $\alpha$  为靶点治疗肺动脉高压的候选方案进行介绍, 以期对 PH 发病机制的研究及有效治疗方法的筛选提供参考。

**关键词:** 低氧诱导因子-2 $\alpha$ ; 肺动脉高压; 内皮细胞; 低氧诱导因子-1 $\alpha$ ; 治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0277-10

## Recent advances of HIF-2 $\alpha$ in pulmonary hypertension

Ji Lei<sup>1,2,3</sup>, Li Zhan-qiang<sup>1,2\*</sup>, Lu Dian-xiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Research Center for High Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Key Laboratory of High Altitude Medicine (Ministry of Education), Key Laboratory of Application and Foundation for High Altitude Medicine Research in Qinghai Province (Qinghai-Utah Joint Research Key Lab for High Altitude Medicine), Xining 810001, China; 3. Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, China)

**Abstract:** Pulmonary hypertension (PH) is a kind of disease characterized by progressive increase of pulmonary vascular resistance and occlusive vascular remodeling. Hypoxic inductive factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) plays an important role in the abnormal proliferation of pulmonary vascular cells and pulmonary vascular remodeling. This review focuses on the role of HIF-2 $\alpha$  in pulmonary hypertension at the cellular and the global level, and candidates targeting HIF-2 $\alpha$  for the treatment of pulmonary hypertension, in order to better understand the pathogenesis of PH and find effective treatments.

**Key words:** hypoxic inducible factor-2 $\alpha$ ; pulmonary hypertension; endothelial cell; hypoxic inducible factor-1 $\alpha$ ; treatment

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种威胁生命的疾病, 其特征是进行性肺血管阻力增加和闭塞性血管重构, 从而导致右心肥大、衰竭和过早死亡<sup>[1]</sup>。组织病理学特征包括内膜和中膜增厚、远端

肺动脉肌化、血管闭塞和复杂的丛状病变<sup>[2]</sup>。其诊断标准为: 海平面、静息状态下、经右心导管测定的肺动脉平均压 (mean pulmonary artery pressure, mPAP)  $\geq$  25 mmHg<sup>[3]</sup>。根据 WHO 标准, 肺动脉高压分为 5 类: 动脉性 PH、左心疾病导致的 PH、肺病和/或低氧导致的 PH、慢性血栓栓塞性 PH 和其他肺动脉阻塞病所致的 PH、未明和 (或) 多因素所致的 PH<sup>[4]</sup>。尽管不同类 PH 的病因不同, 但都表现出相似的病理变化。目前认为, 肺动脉高压发生机制是遗传基因突变 (骨形成蛋白 II 型受体、活化素受体样激酶 1、内皮糖蛋白、

收稿日期: 2021-04-26; 修回日期: 2021-05-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860768, 82060786); 青海省自然科学基金资助项目 (2020-ZJ-784); 2020 年中国科学院西部之光项目 (1.4).

\*通讯作者 Tel: 86-971-6104063,

E-mail: zhanqiang\_li@163.com; ludianxiang@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0632

SMAD 蛋白 9、SMAD 蛋白 1、细胞质膜微囊蛋白-1、钾离子通道 3、T-box gene 4、真核翻译起始因子 2 $\alpha$  激酶 3、生长分化因子 2、ATP 酶 13A3、水通道蛋白 1、Y 染色体性别决定区相关高迁移率 17 群)、表观遗传因素 (DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、微小 RNA 等) 以及环境因素 (低氧、机械剪切力、炎症、药物或毒物等) 共同作用的结果<sup>[5-8]</sup>。此外, 血管活性分子 (内皮素、一氧化氮、血管紧张素 II、前列环素、雌激素等)、钾钙离子通道、Ras 同源基因/Rho 相关螺旋卷曲蛋白激酶、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B、核因子- $\kappa$ B、骨形成蛋白/转化生长因子- $\beta$ 1、蛋白激酶 C/丝裂原活化蛋白激酶、肾素血管紧张素醛固酮系统、血小板衍生生长因子、过氧化物酶体增殖物激活受体、Janus 激酶/信号转导子和转录激活子、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白和 Notch 等信号通路以及精氨酸酶 (arginase, Arg)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、细胞周期蛋白 (cyclin)、周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDK)、叉头框转录因子 M1 (forkhead box M1, FoxM1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素 (interleukin, IL)-6、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、骨形成蛋白 II 型受体 (bone morphogenetic protein type II receptor, BMPRII) 等靶蛋白在 PH 形成过程中也发挥着重要作用<sup>[9-21]</sup>。

目前, 临床上治疗 PH 的药物主要包括前列环素类似物和前列环素受体激动剂、内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶-5 抑制剂和可溶性鸟苷酸环化酶抑制剂, 这些药物只能抑制血管收缩或促进血管扩张, 对血管进行调控, 无法根治 PH<sup>[22]</sup>。虽然干细胞治疗能够修复或替换受损肺血管结构, 改善心肺功能, 但目前还停留在动物实验研究阶段, 仍有很多问题需要解决<sup>[23]</sup>。加之 PH 发病机制复杂、病程隐匿等多种原因, 常在就诊时, 患者对药物已不再敏感, 各主要脏器结构也已发生不可逆的改变, 故 PH 的死亡率仍居高不下。现有研究表明, 低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF)-2 $\alpha$  在 PH 的发生发展中起重要作用, 现做一综述, 以更好了解 PH 的发病机制, 寻找有价值的药物靶点和有效治疗方法。

### 1 HIF-2 $\alpha$ 的结构和功能

HIF-2 $\alpha$  于 1997 年被发现和克隆<sup>[24]</sup>, 由  $\alpha$  和  $\beta$  亚基组成。HIF-1 $\beta$  又称芳香烃受体核转运蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT), 为结构性表达蛋白, HIF-2 $\alpha$  为氧调节性蛋白, 由 870 个氨基酸组成, 分子量为 118 kD, N-端包含螺旋-环-螺旋结构域 (basic-helix-loop-helix domain, bHLH) 和 PAS (Per-ARNT-Sim) 结构域, 后者又含有 PAS-A 和 PAS-B 两

个亚结构域, 这有助于  $\alpha$  和  $\beta$  异质二聚体的稳定性。HIF-2 $\alpha$  的活性在翻译后受氧、脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 和泛素蛋白酶体的协同调节。常氧时, HIF-2 $\alpha$  的氧依赖性降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) 中的特定位点 Pro405 和 Pro531 可与 PHD 结合而发生羟基化, 羟基化的 ODDD 与肿瘤抑制蛋白 (von Hippel-Lindau, pVHL) 亲和力增加, 使 HIF-2 $\alpha$  泛素化并通过泛素蛋白酶体途径降解<sup>[25,26]</sup>。除 PHD 外, 天冬酰胺羟化酶又称为 HIF-1 $\alpha$  抑制因子 (factor-inhibiting HIF-1 $\alpha$ , FIH-1), 也可调节 HIF-2 $\alpha$ , 可使 HIF-2 $\alpha$  的天冬酰胺残基羟化后被降解<sup>[27]</sup>。在低氧条件下, PHD 和 FIH 失去活性, 阻断 pVHL 与 ODDD 的结合, 从而阻断泛素-蛋白酶体通路, 使 HIF-2 $\alpha$  转位至核内, 与 HIF-1 $\beta$  形成异源二聚体, 结合于目的基因的低氧反应元件 (hypoxic reaction element, HRE) 区域, 促进目的基因转录<sup>[28]</sup>。此外, 磷酸化、去乙酰化等修饰也对 HIF-2 $\alpha$  的转录功能具有调控作用。

相比 HIF-1 $\alpha$  几乎在不同动物的所有细胞均有表达<sup>[29]</sup>, HIF-2 $\alpha$  的表达则具有组织特异性, 为内皮偏向性<sup>[30]</sup>。早期研究认为, 其 mRNA 几乎只在内皮细胞中表达, 因此又称为“内皮 PAS 蛋白-1 (endothelial PAS domain protein-1, EPAS-1)”。但 Wiesener 等<sup>[31]</sup>通过 RNA 酶保护法在 RNA 水平和蛋白质水平检测了一系列细胞类型的表达, 发现 11 种人体细胞系均能表达 HIF-2 $\alpha$  mRNA, 其中 10 种为非内皮细胞。HIF-2 $\alpha$  mRNA 的丰度在不同细胞系之间差异很大, 可相差近百倍。在常氧和低氧条件 (1% O<sub>2</sub>, 4 h) 下培养后, 发现低氧对这些细胞中 HIF-2 $\alpha$  mRNA 水平无明显影响, 但能显著诱导 HIF-2 $\alpha$  蛋白的表达, 提示低氧并不影响其转录过程, 但能影响其翻译过程。此外, HIF-2 $\alpha$  还可影响 HIF-1 $\alpha$  的表达, 通过在细胞内瞬时转染显性突变体, 发现 HIF-2 $\alpha$  可阻止慢性低氧下 HIF-1 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达, 提示在慢性低氧时 HIF-2 $\alpha$  可能参与了抑制 HIF-1 $\alpha$  表达的作用<sup>[32]</sup>。

作为同源异构体的 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$ , 在结构和生化特性上有许多相似性, 两者的氨基酸有 48% 的一致性, 均在低氧下稳定, 并可通过激活 HRE 依赖的基因表达<sup>[33]</sup>, 但这两个亚单位在 N-末端激活结构域 (N-terminal activation domains, NAD) 上存在差异<sup>[34]</sup>, 这意味着它们可能有独特的靶基因。低氧条件下, HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  可以调节 VEGF、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、促红细胞生成素、NOS 等基因的表达<sup>[35]</sup>。HIF-2 $\alpha$  的 1 个等位基因缺失可导致相关基因显著下调, 包括纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、ET-1、血小板衍生生长因子 B 链、CXC 趋化因子配体

12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 和抵抗素样  $\alpha$ <sup>[36]</sup>, 提示以上基因可能为 HIF-2 $\alpha$  的下游靶基因。此外, HIF-2 $\alpha$  的靶基因还涉及炎症、铁代谢、糖代谢、胎肺成熟、精氨酸酶活性等多方面, 这些均与低氧性 PH、肿瘤、慢性阻塞性肺疾病等有关<sup>[37]</sup>。

## 2 HIF-2 $\alpha$ 对PH细胞水平的影响

PH是一种破坏性疾病, 其特征是由平滑肌细胞过度增殖、内皮细胞抗凋亡、成纤维细胞增殖迁移、巨噬细胞聚集、细胞外基质沉积和慢性炎症引起的肺血管重构<sup>[38-40]</sup>, 故主要介绍 HIF-2 $\alpha$  对上述细胞的影响。

**2.1 HIF-2 $\alpha$ 对肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs) 的影响** 目前, 对于 PH 细胞水平的研究大多侧重于 PSMCs, 其作为疾病发病机制中的主要细胞类型, 它的增殖导致肺血管重构, 进而发生 PH。Ahmad 等<sup>[41]</sup>用腺病毒转染 PSMCs 发现 HIF-1 $\alpha$  可以促进细胞增殖, 而 HIF-2 $\alpha$  没有这种作用。从特发性肺动脉高压 (idiopathic pulmonary hypertension, IPAH) 患者和正常对照人群肺中分离出的 PSMCs 中 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达也没有显著差异<sup>[42]</sup>。虽然 HIF-2 $\alpha$  对 PSMCs 没有直接促增殖作用, 但 HIF-2 $\alpha$  可以通过影响下游信号分子或内皮细胞旁分泌来影响 PSMCs 的增殖。研究发现, HIF-2 $\alpha$  在低氧下可通过诱导下游信号分子 FoxM1 的表达促进人 PSMCs 的增殖<sup>[43]</sup>, 还可以激活 Oct-4 基因的转录而导致 PSMCs 的过度增殖<sup>[44]</sup>。此外, 敲除 PHD2 基因可导致 HIF-2 $\alpha$  降解减少, HIF-2 $\alpha$  的积聚可激活内皮细胞中 CXCL12 引起 PSMCs 增殖<sup>[45]</sup>。

**2.2 HIF-2 $\alpha$ 对肺动脉内皮细胞 (pulmonary artery endothelial cell, PAEC) 的影响** 虽然 PSMCs 在 PH 中具有重要地位, 但随着对 PH 病理机制研究的深入, 越来越多的实验数据表明, PAEC 和 PSMCs 间的相互作用更有助于 PH 的发生发展。与健康供体相比, IPAH 患者肺中 HIF-2 $\alpha$  mRNA 和蛋白的表达显著增加, 免疫荧光染色提示 HIF-2 $\alpha$  主要分布在内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 中<sup>[42]</sup>。在常氧条件下, 由腺病毒介导的 HIF-2 $\alpha$  过度表达可明显促进人 PAEC 的增殖<sup>[41]</sup>, 这可能与 HIF-2 $\alpha$  通过破坏线粒体和代谢稳态而诱导的内皮细胞炎症、增殖和抵抗凋亡有关<sup>[46]</sup>。此外, 血管内皮细胞中 HIF-2 $\alpha$  可通过调节结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的表达, 促进内皮细胞黏附和增殖, 并促进转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 增加胶原蛋白表达从而加速肺纤维化相关 PH 的发展<sup>[47,48]</sup>。

在体内, ECs 会根据局部条件的变化表现出不同表型。在发生重构的肺血管腔内, 包含有间充质细胞

和平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC), 而 ECs 的细胞标志物并不突出。这种现象称之为内皮向间充质转变 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT), 通过 EndMT 使得 ECs 获得间充质细胞和平滑肌细胞表型, 而失去 ECs 表型。同时, EndMT 能够增强肺血管内皮细胞 (lung vascular endothelial cells, LVEC) 的迁移能力, 并且可将缓慢增殖的 LVEC 转化为高度增殖的细胞类型, 从而导致闭塞性内膜病变的形成和发展。上述过程与 LVEC 中 PHD2 下调导致 HIF-2 $\alpha$  激活, 进而上调 SNAI 锌指转录因子家族成员 Snai1/Snai2 的表达有关 (SNAI 为 EndMT 的已知诱导剂)<sup>[49]</sup>。作为 HIF-2 $\alpha$  的重要调节因子, PHD2 在 LVEC 中高表达, 而在全身血管 ECs 中低表达, PHD2 缺乏可引起严重的 PH, 但对体循环压力没有影响<sup>[45]</sup>。

外周血来源的过度生长内皮细胞 (blood outgrowth endothelial cells, BOECs) 富含血管新生和细胞黏附所需的蛋白, 与内皮干细胞相比, 生物学特性更像内皮细胞, 同时它克服了成熟人脐血内皮细胞体外培养扩增量少、表型易改变的缺点, 已被广泛作为血管疾病体内外皮功能研究的模型<sup>[50]</sup>。当健康志愿者和 PH 患者暴露于低氧环境下, 均能够促进 BOEC 中 HIF-2 $\alpha$  靶基因 (葡萄糖转运蛋白 1、PAI-1、VEGF 和精氨酸酶 2) 的表达, 导致 BOEC 过度增殖以及分化、侵袭、迁移能力增强<sup>[51]</sup>。可见, HIF-2 $\alpha$  对 ECs 的影响不仅体现在细胞表型上, 对基因水平也具有调节作用。

**2.3 HIF-2 $\alpha$ 对肺动脉成纤维细胞的影响** 肺小动脉外膜成纤维细胞的增殖已被证实为低氧性 PH 和肺心病发展的早期表现。采用 RNA 干扰技术特异性抑制 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$ , 发现外膜成纤维细胞的增殖反应仅依赖于 HIF-2 $\alpha$ , 而其迁移反应与 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  均有关<sup>[52]</sup>。此外, 肿瘤抑制蛋白 VHL 密码子 200 (R200W) 突变可导致 HIF-2 $\alpha$  的积聚, 后者进一步促进细胞外基质沉积和肺成纤维细胞或肌成纤维细胞增殖, 最终发生肺纤维化。这种突变纯合子 VHL<sup>R/R</sup> 模型小鼠与野生型相比, 7~8 月龄肺组织中纤维连接蛋白沉积增强且分布杂乱, 而野生型小鼠纤维连接蛋白主要局限于肺血管周围<sup>[36]</sup>。

**2.4 HIF-2 $\alpha$ 对巨噬细胞的影响** 炎症在 PH 的发生发展中起着关键作用, 大多数免疫细胞, 如 T 细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、B 细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞都参与了 PH 的进展<sup>[53,54]</sup>。其中, 单核细胞和巨噬细胞在血管周围募集是 PH 的一个显著特征, 可加剧炎症并促进与肺动脉平滑肌细胞和肺动脉内皮细胞的相互作用, 导致肺血管重塑<sup>[55,56]</sup>。特别是, CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞与 PH 的进展密切相关<sup>[56]</sup>。HIF-2 $\alpha$  的

激活可导致急性低氧暴露 SD 大鼠肺组织中 CD68<sup>+</sup> 单核细胞聚集, 经 HIF-2 $\alpha$  抑制剂 PT2567 干预后可抑制聚集现象, 提示抑制 HIF-2 $\alpha$  活性对低氧性 PH 极早期启动具有遏制作用<sup>[57]</sup>。集落刺激因子-1 (colony stimulating factor-1, CSF-1) 和 IL-6 可以通过激活 HIF-2 $\alpha$  的转录, 诱导巨噬细胞选择性激活<sup>[58]</sup>。此外, 细胞因子如 IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-18、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  也参与了 PH 的发生发展, 其血浆的高水平表达提示 PH 患者预后不良<sup>[59]</sup>。在 PH 动物模型中, 敲除肺内皮细胞 HIF-2 $\alpha$  可降低血浆中 IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CXCL12 的水平<sup>[60]</sup>。PT2567 干预也可降低血浆 TNF- $\alpha$  浓度, 增加抗炎因子 IL-10 的水平<sup>[51]</sup>。髓系 HIF-2 $\alpha$  敲除的小鼠可使血浆 IL-10 增加或恢复至正常水平<sup>[61]</sup>。因巨噬细胞主要位于血管周围间隙, 单纯靶向巨噬细胞治疗 PH 可行性差<sup>[62]</sup>, 基于细胞因子和趋化因子的疫苗治疗可能是治疗 PH 的潜在靶点<sup>[53]</sup>。

### 3 HIF-2 $\alpha$ 对 PH 整体水平的影响

**3.1 HIF-2 $\alpha$  激活突变可诱导 PH** 研究表明, HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> 和 HIF-2 $\alpha$ <sup>+/-</sup> 小鼠对慢性低氧均表现出右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP) 和右心室肥厚的钝性反应, HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> 小鼠肺动脉压降低, 而 HIF-2 $\alpha$ <sup>+/-</sup> 小鼠由于没有响应慢性低氧而未发展为 PH<sup>[63]</sup>。小鼠平滑肌细胞中 HIF-1 $\alpha$  基因缺失可减轻 RVSP 和肺动脉壁厚度, 但对右室重构没有影响<sup>[64]</sup>, 而 HIF-2 $\alpha$  选择性抑制剂 C76 可逆转由 Sugen5416/低氧和/或野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的 PH 大鼠病理特征, 能够抑制血管重塑、心肌纤维化和右心衰竭 (right heart failure, RHF), 提高 PH 大鼠的存活率<sup>[42]</sup>。此外, HIF-2 $\alpha$  获得性功能突变与患者严重 PH 相关, HIF-2 $\alpha$  激活突变 (G536W) 基因敲入小鼠会发生严重的 PH<sup>[65]</sup>。应用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotides, ASOs) 敲低 HIF-2 $\alpha$  可减轻低氧诱导的小鼠血管肌化作用, 降低肺动脉压和右心室肥厚。在慢性低氧条件下, 肺内皮细胞 HIF-2 $\alpha$  缺失的小鼠中 RVSP 并不升高, 且与常氧野生型小鼠无显著差异, 显著低于低氧下野生型和肺内皮细胞缺失 HIF-1 $\alpha$  小鼠的 RVSP 值, 同时, 肺内皮细胞 HIF-2 $\alpha$  的缺失可显著抑制低氧所致的小鼠肺血管重塑<sup>[57]</sup>。但 Skuli 等<sup>[66]</sup> 引入一种内皮细胞 HIF-2 $\alpha$  缺陷的小鼠模型, 发现尽管发育正常, 但这些小鼠内皮细胞超微结构异常, 可诱发 PH, 这可能是因为缺失 HIF-2 $\alpha$  的 ECs 降低了细胞外基质蛋白、纤维连接蛋白、整合素、内皮素 B 受体 (endothelin B receptor, ET-B) 的表达水平, 影响了内皮完整性, 导致血管通透性增加, 液体渗漏, 从而促进水肿、炎症和出血, 进而驱动肺动脉压力的升高。

HIF-2 $\alpha$  还可通过影响下游靶基因导致 PH。Cowburn 等<sup>[60]</sup> 发现, 从基因敲除 HIF-2 $\alpha$  小鼠分离的肺内皮细胞和整个肺组织中精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 的表达均下调, 肺血管内皮细胞 Arg-1 的缺失同样减轻了许多与低氧性 PH 相关的病理生理症状, 表明 HIF-2 $\alpha$  可通过 Arg-1 依赖的机制影响肺血管阻力和 PH 的发展。HIF-2 $\alpha$  还可上调 SNAI 锌指转录因子家族成员导致 PH。IPAH 患者和 PH 动物模型均表现出高水平的 EndMT 和 HIF-2 $\alpha$  蛋白表达, HIF-2 $\alpha$  通过介导 Snai1/Snai2 上调, 导致肺血管壁增厚和血管闭塞<sup>[49]</sup>。

离体动物肺灌注/通气实验提示, 将肺血管内皮细胞中 HIF-1 $\alpha$  或 HIF-2 $\alpha$  敲低后对急性低氧诱导的肺血管收缩没有影响<sup>[49]</sup>。利用全身体积描记法测定响应低氧的每分通气量、潮气量、流量和肺活量, 在基因敲除 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  以及野生型三组中没有差异<sup>[60]</sup>, 说明 HIF-2 $\alpha$  对急性低氧诱导的肺血管收缩无明显贡献。

**3.2 HIF-2 $\alpha$  对颈动脉体的影响** 颈动脉体 (carotid body, CB) 在调节低氧心肺反应中具有重要作用。研究表明, HIF-2 $\alpha$  对颈动脉体在慢性低氧反应中的发育和生长至关重要<sup>[67]</sup>。但通过对颈动脉分叉处细胞酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 免疫染色发现, 野生型和基因敲除 HIF-2 $\alpha$  的动物中颈动脉体组织学结构均正常<sup>[60]</sup>, 与常氧对照大鼠相比, Sugen/低氧 3 周大鼠颈动脉分支 CB 体积显著增加, 给予 HIF-2 $\alpha$  抑制剂 PT2567 干预后体积明显减小, 但与溶剂对照组和西地那非组并无明显差异, 说明 HIF-2 $\alpha$  对颈动脉体的影响并不起主要作用<sup>[51]</sup>。

**3.3 继发性 HIF-2 $\alpha$  增多导致 PH** 作为 HIF-2 $\alpha$  的重要调节因子 PHD 和 pVHL 的异常均可导致 HIF-2 $\alpha$  表达的改变。由于 ECs 和骨髓造血细胞 (hematopoietic cells, HCs) PHD2 基因缺失, 导致 HIF-2 $\alpha$  被继发激活, 小鼠出现严重的血管重塑包括血管阻塞和复杂丛状样病变、严重 PH 和 RHF, 从而出现死亡, 同临床 PH 的病理学表现相类似。在此过程中, ECs 中 PHD2 的缺失起着重要作用, 而骨髓造血细胞 PHD2 的缺失并不是 PH 发展的必要条件, 但可加剧病理表现和 PH 的严重性, 两者具有协同作用。在 IPAH 患者闭塞性肺血管内皮细胞中也证实了 PHD2 的表达明显减少<sup>[45]</sup>。VHL 功能获得突变的人和小鼠均发生 PH, R200W VHL 突变纯合子 VHL<sup>R/R</sup> 小鼠的肺出现肺血管重构、出血、水肿和巨噬细胞浸润现象, 老龄小鼠的肺表现出纤维化。HIF-2 $\alpha$  活性在 VHL<sup>R/R</sup> 小鼠肺中上调, HIF-2 $\alpha$  敲低后可以逆转 VHL<sup>R/R</sup> 小鼠的红细胞增多、肺动脉高压和右心室肥大, 并可以降低 ET-1 的表达, 使非肌化血管数量增加到接近正常野生型水平, 逆转血管的重构, 减缓出

血和水肿表型<sup>[36]</sup>。

**3.4 HIF-2 $\alpha$ 对种群水平的影响** 在种群水平,居住在海拔4 700米的藏族人中HIF-2 $\alpha$ -rs6756667-A或rs1868092-A占70%以上,且随着海拔增高,AA携带者增多<sup>[68]</sup>。应用高通量全基因组芯片技术从世居海拔4 350米地区藏族人群中筛选出10个特有正选基因,进一步对全基因组外显子进行测序发现,HIF-2 $\alpha$ 基因在高原低氧环境下进化速率最快,与世居人群低血红蛋白相关<sup>[69]</sup>,并通过下游靶基因调节能量和铁代谢<sup>[70]</sup>,降低了慢性高原病的发病可能,提示该人群对高原低氧环境的适应与HIF-2 $\alpha$ 基因位点选择有关<sup>[71]</sup>。HIF-2 $\alpha$ 基因位点选择不仅与慢性高原病的发生有关,它和急性高原病(acute mountain sickness, AMS)的发生也有关。黄岚课题组<sup>[72,73]</sup>通过对18~45岁汉族男性由平原急进高原后18~24 h进行单核苷酸多态性检测发现HIF-2 $\alpha$ -rs4953354和rs6756667与头痛明显相关,HIF-2 $\alpha$ -rs6756667位点与AMS发病相关,HIF-2 $\alpha$ -rs6756667-G等位基因较HIF-2 $\alpha$ -rs6756667-A等位基因更易发生AMS,AG+AA携带者较GG携带者AMS发病风险明显减少45%。临床上,Chuvash真性红细胞增多症(一种由VHL基因纯合性点突变引起的常染色体隐性遗传病)的患者HIF-2 $\alpha$ 水平升高,增加了发生PH的易感性<sup>[36]</sup>。总之,目前研究结果一致显示,世居藏族人HIF-2 $\alpha$ 基因具有积极的正向选择性,从而能发生有利突变以增强机体对高原环境的适应性,降低PH的发病风险<sup>[74]</sup>。

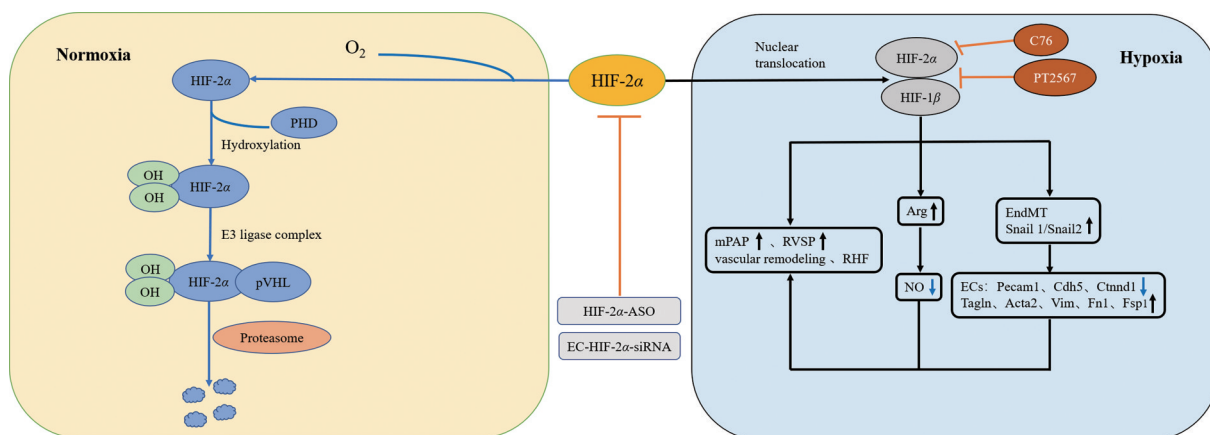
#### 4 针对HIF-2 $\alpha$ PH的候选治疗方案

目前针对HIF-2 $\alpha$ 在肺动脉高压中的主要作用机制,涉及下述7个相关治疗方案(图1)。

**4.1 HIF-2 $\alpha$ -Arg轴** Arg可以与内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)竞争二者共同底物L-精氨酸,当Arg过度表达,打破二者的平衡状态,使一氧化氮(nitric oxide, NO)合成减少,从而损害内皮功能,造成血管内皮功能紊乱。HIF-2 $\alpha$ 可以通过增加Arg-1的表达减少肺中NO的合成<sup>[60]</sup>,NO作为血管活性剂,其生成减少会促进PH的初期发展和血管重塑。在临床中也发现PH患者肺内硝酸盐、支气管肺泡液中NO的生化反应产物以及呼出的NO均减少<sup>[75]</sup>。从PH患者分离的肺内皮细胞的Arg-2表达大幅增加(人肺动脉内皮细胞不表达Arg-1)<sup>[76]</sup>,这会减少可利用的L-精氨酸并减少NOS衍生NO的形成。PH患者来源的BOEC中Arg-2酶活性升高,BOECs成管脆弱,连接短,回路小,抑制HIF-2 $\alpha$ 后可恢复至正常水平<sup>[51]</sup>。因此,可探索通过HIF-2 $\alpha$ 途径操纵NO稳态控制PH的疗法。

**4.2 PHD2/HIF-2 $\alpha$ 信号** 作为HIF-2 $\alpha$ 的重要调节因子,PHD2对PH的形成至关重要。通过条件敲除大鼠内皮细胞和骨髓造血细胞中PHD2基因后,大鼠可表现出类似临床IPAH患者的病理表现,而敲除PHD2的大鼠未出现PH症状,其原因可能是PHD2缺失导致HIF-2 $\alpha$ 降解减少,HIF-2 $\alpha$ 积聚诱导CXCL12促进SMC增殖<sup>[45]</sup>。因此,靶向PHD2/HIF-2 $\alpha$ 信号传导失调,可能是一种新颖的有效治疗策略。

**4.3 抑制EndMT进程** 通过EndMT过程,可以使缓慢生长的完全分化的LVEC转化为高度增殖的间充质细胞,特征是细胞之间失去黏附,细胞形态转化为纺锤形,表现为SMC特异性基因[转胶蛋白(transgelin, Tagln)和肌动蛋白 $\alpha$ 2(actin alpha 2, Acta2)]和/或成纤



**Figure 1** The main mechanism and related therapeutic targets of HIF-2 $\alpha$  in pulmonary hypertension. pVHL: von Hippel-Lindau; HIF-2 $\alpha$ : Hypoxia inducible factor-2 alpha; OH: Hydroxyl; PHD: Prolyl hydroxylase; O<sub>2</sub>: Oxygen; HIF-1 $\beta$ : Hypoxia inducible factor-1 beta; mPAP: Mean pulmonary arterial pressure; RVSP: Right ventricular systolic pressure; RHF: Right heart failure; Arg: Arginase; NO: Nitric oxide; EndMT: Endothelial-to-mesenchymal transition; ECs: Endothelial cells; Pecam 1: Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1; Cdh5: Cadherin 5; Ctnnd1: Catenin delta 1; Tagln: Transgelin; Acta2: Actin alpha 2; Vim: Vimentin; Fn1: Fibronectin 1; Fsp1: Fibroblast specific protein S100A4

维细胞特异性基因 [波形蛋白 (vimentin, Vim)、纤维连接蛋白 1 (fibronectin 1, Fn1) 和成纤维细胞特异蛋白 S100A4 (fibroblast specific protein S100A4, Fsp1)] 的上调以及 EC 特异性基因 [血小板内皮细胞黏附分子 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1, Pecam1)、钙黏蛋白 5 (cadherin 5, Cdh5) 和连环蛋白  $\delta$ 1 (catenin delta 1, Ctnnd1)] 的下调, 最终导致闭塞性内膜病变。低氧条件下, HIF-2 $\alpha$  可上调 SNAI 锌指转录因子家族成员 Snai1/Snai2 的表达, 诱导内皮细胞向间充质细胞转变, 导致肺血管重构, 发生肺动脉高压<sup>[49]</sup>。HIF-2 $\alpha$  和 EndMT 的联合抑制可能会为治疗肺动脉高压提供独特的治疗方法。

**4.4 ASOs** ASOs 是人工合成的一类通过碱基互补原则特异性地与靶 DNA 或 mRNA 结合而抑制该基因表达的核酸片段。利用 HIF-2 $\alpha$ -ASO 敲低 HIF-2 $\alpha$  基因的效率为 72%。在低氧条件下, 与对照低氧小鼠相比, HIF-2 $\alpha$ -ASO 干预的小鼠 RVSP、右心室肥厚指数和右心室/体重比值均降低, 肺内完全肌化血管明显减少。注射 HIF-2 $\alpha$ -ASO 后虽然没有出现像整体基因敲除小鼠在低氧下的致死现象, 但在该模型中, 成年小鼠体重降低, 循环血液中儿茶酚胺包括肾上腺素和去甲肾上腺素减少, 心率、心输出量以及左室收缩功能指标 dp/dtmax 均降低。除了观察到的心脏功能变化外, HIF-2 $\alpha$ -ASO 干预动物的红细胞比容也降低, 导致氧输送效率下降, 上述变化使得这些小鼠更加脆弱, 从而导致死亡风险增加<sup>[57]</sup>。总之, 如果未来临床应用 HIF-2 $\alpha$ -ASO 治疗 PH 需谨慎。

**4.5 细胞类型特异性敲除** 因为整体敲除 HIF-2 $\alpha$  对模型动物具有胚胎致死性, 所以条件敲除特定细胞 HIF-2 $\alpha$  成为可选的替代方法。在肺血管细胞中, HIF-2 $\alpha$  在 ECs 中高表达, 所以一般选择肺血管内皮细胞为基因敲除的靶细胞。其原理为利用 Cre/LoxP 或 Flpe/Frt 原理, 将待敲除的一段目标 DNA 序列的两端各敲入一个 loxP 序列, 得到 flox 小鼠, 将 flox 小鼠与带有细胞特异性表达 Cre 酶的小鼠交配繁殖, 以获得在特定细胞中敲除目标基因的小鼠。ECs 特异性 HIF-2 $\alpha$  敲除可防止小鼠在低氧条件下发展为肺动脉高压。有研究提示, ECs 中 HIF-2 $\alpha$  基因缺失在预防低氧性 PH 发展方面似乎比整体 HIF-2 $\alpha$  敲低更有效<sup>[57]</sup>。除 ECs 外, Eul 等<sup>[52]</sup> 利用 RNA 干扰技术敲低肺内小动脉外膜成纤维细胞中 HIF-2 $\alpha$  的表达, 对低氧诱导的肺内小动脉成纤维细胞增殖有显著抑制作用, 而 HIF-1 $\alpha$ -siRNA 对其增殖无影响。HIF-1 $\alpha$ -siRNA 和 HIF-2 $\alpha$ -siRNA 联合使用抑制成纤维细胞增殖的效果并没有超过单独使用 HIF-2 $\alpha$ -siRNA 的效果。在研究细胞迁移时, 发现 HIF-1 $\alpha$ -siRNA 和

HIF-2 $\alpha$ -siRNA 均有明显抑制作用, 且两者联用效果更好。

**4.6 化合物 76 (compound 76, C76)** Zimmer 等<sup>[77]</sup> 通过在细胞上筛选 HIF-2 $\alpha$  抑制剂, 发现了 C76, 其可以通过结合铁调节蛋白抑制 HIF-2 $\alpha$  的翻译。在 PHD2 基因敲除小鼠中, 经 C76 治疗逆转了闭塞性肺血管重构, 包括新生内膜形成和闭塞性血管病变, 改善了右心室肥大和心肌纤维化, 减少了 RHF 的发生, 提高了生存率。C76 没有影响从 IPAH 患者中分离出的 PSMC 的增殖和凋亡, 但可通过影响 ECs 旁分泌抑制 PSMC 增殖。在 Sugen5416/低氧大鼠中, C76 可逆转肺血管重塑, 抑制右室肥大和心肌纤维化, 并保护其心脏功能。在 MCT 大鼠中, C76 可降低 RVSP、改善肺血管重塑和右心室肥大, 并能够降低死亡率<sup>[42]</sup>。

**4.7 PT2567** PT2567 是 Peloton Therapeutics 公司研发的一种有效的、选择性的口服 HIF-2 $\alpha$  抑制剂, 用于非肿瘤适应症, 最开始针对 PH, 目前仍在探索其在炎症性肠病中的开发潜力, 处于临床前研究阶段。Hu 等<sup>[57]</sup> 利用 PT2567 抑制 HIF-2 $\alpha$ , 观察正常成年啮齿动物暴露于短期 (4 天) 或慢性 (4~5 周) 低氧中的血液动力学及心肺病理变化, 发现 PT2567 显著抑制了短期低氧暴露大鼠肺血管周围单核细胞募集, 以及慢性低氧暴露大鼠肺血管细胞增殖、血管肌化、细胞黏合素 C (tenascin C, Tnc) 沉积, 降低了平均肺动脉压。机制可能为: HIF-2 $\alpha$  作为一个转录因子, 其是通过蛋白质与蛋白质的相互作用而发挥转录功能的, 既往认为 HIF-2 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  的结合很难被小分子破坏, 但 Scheuermann 和他的同事<sup>[78]</sup> 发现 HIF-2 $\alpha$  的 PAS-B 结构域的内核具有疏水腔, 可以结合小分子, 通过变构破坏同 HIF-1 $\beta$  的二聚化, 从而阻断转录活性。HIF-2 $\alpha$  抑制剂 PT2567 即可作为这样的小分子直接与 HIF-2 $\alpha$  的 PAS-B 结构域结合, 并破坏 HIF-2 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  二聚体的形成, 从而终止其转录功能, 逆转肺血管重构、减少循环促炎因子和恢复血浆亚硝酸盐水平, 降低与严重 PH 发展相关的血流动力学参数。PT2567 不仅减轻了 PH 的病理表现, 还可在分子水平使异常基因表达正常化。经 PT2567 干预后, ECs 中异常的经典 HIF 下游靶基因葡萄糖转运蛋白 1、N-myc 下游调节基因 1、VEGF、碳酸酐酶 9 趋于正常, 与炎症相关基因 CXCR4 趋化因子受体 4、CXCL12、基质细胞衍生因子-1、细胞间黏附分子 1、E-选择素以及与细胞增殖相关因子分化抑制因子 1、分化抑制因子 3、转化生长因子  $\alpha$  基本恢复正常, 与 PH 相关的信号靶标, 包括爱帕琳肽、Arg-2、细胞周期蛋白 D1、PAI-1、ET-1 均降低<sup>[51,57]</sup>。此外, 还可纠正心脏相关基因的异常表达, 如降低心肌结构靶标  $\beta$ -肌球蛋白重

链、骨骼肌肌动蛋白 $\alpha 1$ 、心脏负荷靶标心房钠尿肽前体A、膜联蛋白A5和心肌纤维化靶标I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 、III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 和金属蛋白酶2的表达。而作为目前临床治疗PH常用药物西地那非只降低了III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 和金属蛋白酶2的表达。PT2567干预使血浆心肌应激标志物肌钙蛋白I和脂肪酸结合蛋白3、血浆亚硝酸盐浓度正常化,降低PH患者和健康志愿者来源BOEC增殖,但不影响细胞凋亡<sup>[51]</sup>。这表明HIF-2 $\alpha$ 小分子抑制剂PT2567可能成为治疗PH的一种潜力药物。

## 5 结语与展望

大多数已发表的关于HIF-2 $\alpha$ 在PH发生中的作用,采用的模型为胚胎期HIF-2 $\alpha$ 敲除或激活,先天存在肺或血管缺陷的动物,但现实中观察到PH的人和动物的肺循环对慢性低氧应激反应是正常的。所以采用上述动物模型作为研究对象可能导致研究不客观。原因如下:① 这些模型在胚胎中存在血管缺陷,可能在成年后继续表现出血管缺陷<sup>[79]</sup>;② 当基因缺失在胚胎中开始与在成年小鼠中开始时其表型存在差异。如在成年动物中抑制单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1, MCP1)可降低低氧或MCT诱导的PH,而MCP1或MCP1受体敲除小鼠(始于胚胎)表现出自发的PH<sup>[80,81]</sup>。细胞类型特异性敲除是了解特定细胞类型中靶基因对疾病贡献的有力方法。然而,仅从细胞类型特异性敲除实验中得出的结论在确定疾病中基因功能方面可能存在缺陷。在疾病发生发展过程中并非单一细胞发挥作用,而是存在不同细胞间的相互作用,并且特定基因在不同疾病相关细胞类型中可能具有不同或相反的功能。如微囊蛋白在PH患者ECs中降低,促进PH的发展,但微囊蛋白在原发性肝癌中过度表达也促进原发性肝癌的发展<sup>[82]</sup>,故需要寻求更符合临床PH的动物模型及研究手段。

目前,对于PH的研究主要集中在对血管舒缩功能进行调控,然而PH导致患者死亡的原因往往是因为脏器重构导致的右心衰竭,故研发可以逆转肺血管和右心重构的药物十分必要。HIF-2 $\alpha$ 作为PH的关键调节因子,参与了肺血管重构的过程,HIF-2 $\alpha$ 抑制剂已经在PH患者肺组织显示出抑制重构的优势,且在不同动物模型中不仅具有降低PH的作用,还具有抑制肺血管和右心室重构的效果,尤其在抑制右心重构方面优于西地那非。HIF-2 $\alpha$ 抑制剂的研发将对临床PH死亡率居高不下的现状带来希望。PT2567目前处于临床前期研究阶段,根据临床试验效果,如患者生活质量、生存时间、药物不良反应以及耐药性等问题,未来可以尝试研发针对PAS-A结构域的HIF-2 $\alpha$ 的抑制剂以及除

针对HIF-2 $\alpha$ 的直接变构调控外其他间接调控的小分子。此外,目前研发的双环类HIF-2 $\alpha$ 抑制剂PT2399、PT2385、PT2977已经处于临床I/II期阶段,显示出良好的治疗肾透明细胞癌的效果,且其作用机制与PT2567类似,即诱导HIF-2 $\alpha$ -PAS-B结构域结合面上残基位置发生变化,削弱两个PAS-B结构域之间的结合能力,导致HIF-2 $\alpha$ 与HIF-1 $\beta$ 无法形成二聚体<sup>[83]</sup>。是否可以将双环类HIF-2 $\alpha$ 抑制剂应用于PH的治疗还需实验验证,以给临床治疗提供更多可能。

**作者贡献:** 冀磊负责查阅文献、撰写文章;李占强负责文章选题、指导撰写思路;芦殿香负责指导撰写思路、文章修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, et al. Management of pulmonary arterial hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65: 1976-1997.
- [2] Tuder RM, Stacher E, Robinson J, et al. Pathology of pulmonary hypertension [J]. Clin Chest Med, 2013, 34: 639-650.
- [3] Pulmonary Embolism and Pulmonary Vascular Disease Group, Respiratory Society, Chinese Medical Association. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension (the 2021 version) [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 2021, 101: 11-51.
- [4] Hoeper MM, Humbert M, Souza R, et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. Lancet Resp Med, 2016, 4: 306-322.
- [5] Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension [J]. Eur Respir J, 2019, 53: 1801899.
- [6] Thomas CA, Anderson RJ, Condon DF, et al. Diagnosis and management of pulmonary hypertension in the modern era: insights from the 6th World Symposium [J]. Pulm Ther, 2020, 6: 9-22.
- [7] Wu WH, Yuan P, Zhang SJ, et al. Impact of pituitary-gonadal axis hormones on pulmonary arterial hypertension in men [J]. Hypertension, 2018, 72: 151-158.
- [8] Thompson AAR, Lawrie A. Targeting vascular remodeling to treat pulmonary arterial hypertension [J]. Trends Mol Med, 2017, 23: 31-45.
- [9] Luo L, Liu D, Tang C, et al. Sulfur dioxide upregulates the inhibited endogenous hydrogen sulfide pathway in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433: 519-525.
- [10] Yerabolu D, Weiss A, Kojonazarov B, et al. Targeting Jak-Stat signaling in experimental pulmonary hypertension [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 64: 100-114.
- [11] Anwar MA, Samaha AA, Ballan S, et al. *Salvia fruticosa* induces vasorelaxation in rat isolated thoracic aorta: role of the PI3K/Akt/

- eNOS/NO/cGMP signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 686.
- [12] Dang ZC, Su SS, Jin GE, et al. Tsantan Sumtang attenuated chronic hypoxia-induced right ventricular structure remodeling and fibrosis by equilibrating local ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang1-7-Mas axis in rat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112470.
- [13] Cai Z, Li J, Zhuang Q, et al. miR-125a-5p ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting the TGF- $\beta$ 1 and IL-6/STAT3 signaling pathways [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50: 45.
- [14] Sun LY, Cai ZY, Pu J, et al. 5-Aminosalicylic acid attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by increasing the expression of Nur77 [J]. *Inflammation*, 2017, 40: 806-817.
- [15] Legchenko E, Chouvarine P, Borchert P, et al. PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone reverses pulmonary hypertension and prevents right heart failure *via* fatty acid oxidation [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaao0303.
- [16] Dai ZY, Zhu MM, Peng Y, et al. Endothelial and smooth muscle cell interaction *via* FoxM1 signaling mediates vascular remodeling and pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198: 788-802.
- [17] Deng LY, Chen JD, Wang T, et al. PDGF/MEK/ERK axis represses Ca<sup>2+</sup> clearance *via* decreasing the abundance of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump PMCA4 in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320: C66-C79.
- [18] He YH, Zuo CJ, Jia DL, et al. Loss of DP1 aggravates vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension *via* mTORC1 signaling [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2020, 201: 1263-1276.
- [19] Wang LL, Wang Y, Lei Z. Chrysin ameliorates ANTU-induced pulmonary edema and pulmonary arterial hypertension *via* modulation of VEGF and eNOS [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33: e22332.
- [20] López V, Moraga FA, Llanos AJ, et al. Plasmatic concentrations of ADMA and homocystein in Llama (*Lama glama*) and regulation of arginase type II: an animal resistant to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 606.
- [21] Tian HS, Lei L, Wu Y, et al. Resistin-like molecule  $\beta$  acts as a mitogenic factor in hypoxic pulmonary hypertension *via* the Ca<sup>2+</sup>-dependent PI3K/Akt/mTOR and PKC/MAPK signaling pathways [J]. *Respir Res*, 2021, 22: 8.
- [22] Jiang XH, Xing XY, Wang XC, et al. Drugs and drug delivery strategies for treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1332-1342.
- [23] Zhang D, Yang J. The current application of stem cell based therapy in pulmonary hypertension [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1778-1783.
- [24] Tian H, Mcknight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells [J]. *Genes Dev*, 1997, 11: 72-82.
- [25] Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  in development and disease [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 628-634.
- [26] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis [J]. *Nature*, 1999, 399: 271-275.
- [27] Dyson HJ, Wright PE. Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators CREB-binding protein (CBP) and p300 [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 6714-6722.
- [28] Kim SY, Yang EG. Recent advances in developing inhibitors for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases and their therapeutic implications [J]. *Molecules*, 2015, 20: 20551-20568.
- [29] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 588-594.
- [30] Young JM, Williams DR, Thompson AAR. Thin air, thick vessels: historical and current perspectives on hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Front Med*, 2019, 6: 93.
- [31] Wiesener MS, Turley H, Allen WE, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 [J]. *Blood*, 1998, 92: 2260-2268.
- [32] Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 14871-14878.
- [33] Shimoda LA, Semenza GL. Role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183: 152-156.
- [34] Hu CJ, Sataur A, Wang L, et al. The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 4528-4542.
- [35] Kumar H, Choi DK. Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway? [J]. *Med Inflamm*, 2015, 2015: 584758.
- [36] Hickey MM, Richardson T, Wang T, et al. The von Hippel-Lindau Chuvash mutation promotes pulmonary hypertension and fibrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 827-839.
- [37] Yoo S, Takikawa S, Geraghty P, et al. Integrative analysis of DNA methylation and gene expression data identifies EPAS1 as a key regulator of COPD [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1004898.
- [38] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 4306-4313.
- [39] Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, et al. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*, 2014, 115: 165-175.
- [40] Lai YC, Potoka KC, Champion HC, et al. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome [J]. *Circ Res*, 2014, 15: 115-

- 130.
- [41] Ahmad A, Ahmad S, Malcolm KC, et al. Differential regulation of pulmonary vascular cell growth by hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$  and hypoxia-inducible transcription factor-2 $\alpha$  [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49: 78-85.
- [42] Dai ZY, Zhu MM, Peng Y, et al. Therapeutic targeting of vascular remodeling and right heart failure in pulmonary arterial hypertension with a HIF-2 $\alpha$  inhibitor [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198: 1423-1434.
- [43] Raghavan A, Zhou G, Zhou Q, et al. Hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation is controlled by forkheadbox M1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46: 431-436.
- [44] Firth AL, Yao WC, Ogawa A, et al. Upregulation of Oct-4 isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298: L548-L557.
- [45] Dai ZY, Li M, Wharton J, et al. PHD2 deficiency in endothelial cells and hematopoietic cells induces obliterative vascular remodeling and severe pulmonary arterial hypertension in mice and humans through HIF-2 $\alpha$  [J]. *Circulation*, 2016, 133: 2447-2458.
- [46] Fijalkowska I, Xu W, Comhair SA, et al. Hypoxia inducible-factor 1 $\alpha$  regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176: 1130-1138.
- [47] Bryant AJ, Carrick RP, McConaha ME, et al. Endothelial HIF signaling regulates pulmonary fibrosis-associated pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310: L249-L262.
- [48] Rimón E, Chen B, Shanks AL, et al. Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor [J]. *Endocrinology*, 2008, 149: 2952-2958.
- [49] Tang HY, Babicheva A, McDermott KM, et al. Endothelial HIF-2 $\alpha$  contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314: L256-L275.
- [50] Yin J, Ma ZN, Zhao XJ, et al. Isolation, culture and characterization of outgrowth endothelial cells from the human peripheral blood [J]. *J Exp Hematol (中国实验血液学杂志)*, 2014, 22: 1711-1715.
- [51] Macias D, Moore S, Crosby A, et al. Targeting HIF2 $\alpha$ -ARNT hetero-dimerisation as a novel therapeutic strategy for pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2021, 57: 1902061.
- [52] Eul B, Rose F, Krick S, et al. Impact of HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia [J]. *FASEB J*, 2006, 20: 163-165.
- [53] He W, Kapate N, Shields CW 4th, et al. Drug delivery to macrophages: a review of targeting drugs and drug carriers to macrophages for inflammatory diseases [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 165-166: 15-40.
- [54] Li C, Liu PP, Song R, et al. Immune cells and autoantibodies in pulmonary arterial hypertension [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49: 1047-1057.
- [55] Tian W, Jiang XG, Tamosiuniene R, et al. Blocking macrophage leukotriene b4 prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5: 200ra117.
- [56] Thenappan T, Goel A, Marsboom G, et al. A central role for CD68<sup>+</sup> macrophages in hepatopulmonary syndrome: reversal by macrophage depletion [J]. *Am Respir Crit Care Med*, 2011, 183: 1080-1091.
- [57] Hu CJ, Poth JM, Zhang H, et al. Suppression of HIF2 signalling attenuates the initiation of hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Eur Respir J*, 2019, 54: 1900378.
- [58] Wang QR, He ZQ, Huang MG, et al. Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 $\alpha$  [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 559.
- [59] Groth A, Vrugt B, Brock M, et al. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension [J]. *Respir Res*, 2014, 15: 47.
- [60] Cowburn AS, Crosby A, Macias D, et al. HIF2 $\alpha$ -arginase axis is essential for the development of pulmonary hypertension [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 8801-8806.
- [61] Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, et al. Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 2699-2714.
- [62] Xiao QQ, Li XT, Li Y, et al. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 941-960.
- [63] Brusselmans K, Compennolle V, Tjwa M, et al. Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1519-1527.
- [64] Ball MK, Waypa GB, Mungai PT, et al. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189: 314-324.
- [65] Tan Q, Kerestes H, Percy MJ, et al. Erythrocytosis and pulmonary hypertension in a mouse model of human HIF2A gain of function mutation [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 17134-17144.
- [66] Skuli N, Liu LP, Runge A, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) alters vascular function and tumor angiogenesis [J]. *Blood*, 2009, 114: 469-477.
- [67] Macias D, Cowburn AS, Torres-Torrel H, et al. HIF-2 $\alpha$  is essential for carotid body development and function [J]. *Elife*, 2018, 7: e34681.
- [68] Basang Z, Wang BY, Li L, et al. HIF2A variants were associated with different levels of high-altitude hypoxia among native Tibetans [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0137956.
- [69] Simonson TS, Yang YZ, Huff CD, et al. Genetic evidence for

- high-altitude adaptation in Tibet [J]. *Science*, 2010, 329: 72-75.
- [70] Beall CM, Cavalleri GL, Deng L, et al. Natural selection on EPAS1 (HIF2alpha) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 11459-11464.
- [71] Lorenzo FR, Huff C, Myllymki M, et al. A genetic mechanism for Tibetan high-altitude adaptation [J]. *Nat Genet*, 2014, 46: 951-956.
- [72] Yang S, Zhang JH, Yang J, et al. Association of EPAS1 and PPARA gene polymorphisms with high-altitude headache in Chinese Han population [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1593068.
- [73] Guo L, Zhang JH, Jin J, et al. Genetic variants of endothelial PAS domain protein 1 are associated with susceptibility to acute mountain sickness in individuals unaccustomed to high altitude: a nested case-control study [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10: 907-914.
- [74] He QL, Ge RL, Li ZQ, et al. Hypoxia inducing factor related genetic adaptation in high-altitude and pharmacological modulation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 611-619.
- [75] Girgis RE, Champion HC, Diette GB, et al. Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: response to bosentan therapy [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 352-357.
- [76] Xu WL, Kaneko FT, Zheng S, et al. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *FASEB J*, 2004, 18: 1746-1748.
- [77] Zimmer M, Ebert BL, Neil C, et al. Small-molecule inhibitors of HIF-2 $\alpha$  translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing [J]. *Mol Cell*, 2008, 32: 838-848.
- [78] Scheuermann TH, Tomchick DR, Machius M, et al. Artificial ligand binding within the HIF2alpha PAS-B domain of the HIF2 transcription factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 450-455.
- [79] Takeda K, Ho VC, Takeda H, et al. Placental but not heart defects are associated with elevated hypoxia-inducible factor alpha levels in mice lacking prolyl hydroxylase domain protein 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 8336-8346.
- [80] Kosanovic D, Dahal BK, Vroom C, et al. Selective inhibition of chemokine CCL2/MCP-1 reduces experimental pulmonary hypertension [J]. *Pneumologie*, 2013, 67: 10.
- [81] Yu YR, Mao L, Piantadosi CA, et al. CCR2 deficiency, dysregulation of Notch signaling, and spontaneous pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48: 647-654.
- [82] Mathew R. Cell-specific dual role of caveolin-1 in pulmonary hypertension [J]. *Pulm Med*, 2011, 2011: 573432.
- [83] Yu YC, Yu QW, Zhang XJ. Allosteric inhibition of HIF-2 $\alpha$  as a novel therapy for clear cell renal cell carcinoma [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24: 2332-2340.