

综 述

氧感受与适应机制的研究进展

沈安然¹, 王彬^{1,2}, 刘必成^{1,2,*}东南大学¹肾脏病研究所; ²附属中大医院肾脏病科, 南京 210009

摘要: 机体在低氧状态下会产生一系列生理反应, 以适应生理功能的需要。该反应包括肾脏在内的全身各个器官和细胞分子水平的动员, 并随着低氧程度和持续时间不同而变化, 细胞从适应到产生损伤性改变。过去20多年来, 低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)调控机体红细胞生成的机制逐渐被阐明, 这同时也为诸如肾性贫血之类的低氧相关性疾病的治疗开辟了新的方向。本文对细胞氧感受与适应机制方面的研究进展进行综述。

关键词: 氧感受; 适应; 机制

中图分类号: R332; R363

New advances in oxygen sensing and adaptive mechanism

SHEN An-Ran¹, WANG Bin^{1,2}, LIU Bi-Cheng^{1,2,*}¹Institute of Nephrology; ²Department of Nephrology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: Under the hypoxic condition, organs or cells trigger a series of reactions or responses to adapt to the physiological requirement. These responses involve a complex regulation at different levels from organs, in particular the kidney (producing erythropoietin), to cells throughout the body. Actually, the responses to hypoxia from adaption to injury largely depend on the degree and time of hypoxia. In the past two decades, with the discovery of hypoxia-inducible factor (HIF), the mechanisms of erythropoiesis regulation were elucidated gradually, which has provided a novel therapeutic strategy for hypoxia-related diseases, especially renal anemia. In this review we focus on the latest advances in oxygen sensing and adaptive mechanism.

Key words: oxygen sensing; adaption; mechanism

氧气是生命的本源, 是生物机体进行生命活动如细胞呼吸等过程所必需的原料。机体既可以通过自身适应而耐受低氧, 也可以因为低氧而导致疾病, 因此, 认识细胞及机体感知氧的机制和调控过程十分重要。所谓低氧, 指细胞所处环境中的氧水平不足以维持正常的细胞功能状态。最初, 人们关注到大气氧分压降低状态下血液中红细胞压积的增加, 进一步研究表明促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)

在红细胞生成中发挥重要的作用, 由此促使研究者们思考氧感受与EPO之间的联系。自从1992年Semenza等人首先发现低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)以来^[1], 人们逐渐认识到, 由HIF调控的EPO产生和红细胞生成过程是细胞适应低氧变化的主要机制, 对其复杂的分子调控过程的揭示, 可为人类治疗诸如肾性贫血在内的低氧相关性疾病提供新的思路。

Received 2019-12-09 Accepted 2020-01-29

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the Key International Cooperation Project of the National Natural Science Foundation of China (No. 81720108007), the National Key Research and Development Program, China (No. 2018YFC1314000), the National Natural Science Foundation of China (No. 81670696) and the Medical Science and Technology Support Project of Jiangsu Province, China (No. BL2014080).

*Corresponding author. E-mail: liubc64@163.com

1 HIF的氧感受机制

HIF是一种异二聚体,由感受氧分子的HIF- α 亚基与结构型表达的HIF- β 亚基组成。目前所知亚型有HIF-1、HIF-2和HIF-3。其中,HIF-1 α 和HIF-1 β 受到的关注相对较多。

1.1 HIF-1 α 和HIF-1 β

众多研究表明,HIF-1 α 介导了HIF转录复合体的氧感受性。HIF- α 含有的Per-ARNT-Sim(PAS)结构域可与HIF- β 结合,形成HIF异二聚体转录复合体,从而进一步作用于低氧相关基因,介导EPO、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、糖酵解过程中的关键酶——磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)表达水平的变化,以及能量代谢、炎症、血管修复、氧化应激等低氧反应的产生。而HIF- α 亚基N-末端含有的螺旋-环-螺旋基本结构域可介导其与DNA的结合,C-末端则是含有诱导基因表达所需的转录激活结构域。HIF- α 上还包含一种氧依赖性降解结构域,是羟化酶进行氧感受的作用位点。羟化后的HIF- α 可被von Hippel-Lindau蛋白(pVHL)识别并结合,即E3泛素连接酶的底物,从而导致HIF- α 蛋白酶体的多泛素化和降解。此类常见结构域有脯氨酸残基和天冬氨酸残基。因此,C-端结构域与氧依赖性降解结构域共同决定HIF- α 的氧感受性。

HIF-1 β 拥有与HIF- α 相似的N-端和C-端结构域,因此能很好地与之结合。HIF-1 β 已被证实为芳基碳氢化合物核转运子,是芳基羟受体在另一类转录通路中的二聚体伴侣。

如上所述,HIF分为HIF-1、2、3亚型,是由HIF-1 β 分别与HIF-1 α 、2 α 、3 α 结合而成。三者虽有同为HIF转录复合体的 α 亚基,却存在不同点。目前研究较多的是HIF-1 α 和HIF-2 α 亚基。首先,两者优势表达的部位不同,同一器官中优势表达细胞也不同。研究显示,有一种名为EPAS1的蛋白与HIF-1 α 高度相似,并高表达于内皮细胞中(并不局限于内皮细胞)^[2]。该蛋白随后被命名为HIF-2 α ,由EPAS1基因编码表达。HIF-1 α 则相对缺少组织特异性。在肾脏,HIF-2 α 主要表达于间质细胞、内皮细胞和肾小球等,HIF-1 α 则主要表达于肾小管细胞中^[3]。本研究组最近研究显示,低氧后的肾小管上皮细胞中HIF-1 α 分泌增多,并且与后续肾间质纤维化过程相关^[4]。再者,不同亚型的活化条件不同。HIF-1 α 主要在重度低氧条件下激活,而HIF-2 α

则在中度低氧情况下活性较强。而且后者的活性持续时间较前者长,一般达到高峰时间要大于24 h^[5]。目前人们对HIF-3 α 亚型的研究较少。有研究显示,HIF-3A(编码HIF-3 α)可作为HIF-1/2 α 的靶基因之一促进转录抑制性HIF-3 α 亚型的表达^[6],并通过与HIF-1 β 竞争性结合实现其对HIF的反向调控^[7]。

1.2 HIF的低氧调适机制

HIF参与多种低氧反应的形成,对其进行研究可大致了解低氧适应反应的主要分子机制。在转录水平,可通过转录因子和表观遗传学等方式对编码HIF- α 的基因进行修饰。例如,核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)和STAT3可影响HIF-1A基因位点(编码HIF-1 α)的转录。转录因子和表观遗传修饰子DNMT3A可影响EPAS1基因位点(编码HIF-2 α)的转录。其中HIF-1A基因的转录还受到其反义转录本(HIF1A-AS2)的负向调控。另外,研究显示,HIF- α 介导的microRNA修饰还参与多种肾脏疾病的发生与发展^[8]。例如miR-30c-2-3p和miR-30a-3p的表达下调可作用于促肿瘤发生型的HIF-2 α 亚型,从而介导肾透明细胞癌的发生^[9],在低氧型急性肾损伤中,HIF-1 α 诱导的miR-210反而抑制HIF-1 α mRNA表达,从而缓解肾脏损伤^[10]。miR-34a-5p/Sirt1/HIF-1 α 信号通路则促进了糖尿病肾病的发展^[11]。在翻译水平,HIF-1 α 与HIF-2 α mRNA皆是mTOR的作用靶点,mTOR作为细胞感受能量状态机制的一环,可以调节糖代谢。细胞外的信号经AKT与之耦联,增加mTOR的磷酸化程度,而AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)被AMP和ADP诱导生成后则抑制mTOR的磷酸化。磷酸化后的mTOR可增加HIF-1 α 的表达^[12]。HIF-2 α 与mTOR的相关性研究则较少,其表达主要受铁调节蛋白(iron regulatory proteins, IRPs)的影响。IRPs通过结合EPAS1(HIF-2A最初的名称)的mRNA 5'端非编码区中的铁反应元件(iron-responsive element, IRE)来特异性干扰其翻译^[13]。

翻译后水平的调节则主要依赖于HIF脯氨酰羟化酶[又称脯氨酰羟化结构域蛋白(prolyl hydroxylase domain, PHD)]以及HIF抑制性因子(factor inhibiting HIF, FIH)的活性状态。前者分为PHD1、2、3,主要负责羟化HIF- α 上的脯氨酸残基^[14]。FIH催化的位点为天冬氨酸残基,其比PHD的低氧耐受性更好。Ratcliffe团队和Kaelin团队先后于1999年和2000年发现并证实了pVHL与氧感受的联系^[15,16]。

在常氧条件下, PHD 与 FIH 皆有功能, 羟基化后的 HIF- α 被泛素 E3 连接酶复合物的 pVHL 识别, 结合活化后立即被蛋白酶水解^[16] (图 1)。中度低氧状态类似于 PHD 抑制剂 (PHD inhibitor, PHI) 的效果。该情况下的 HIF- α 亚基失去了 PHD 的羟基化作用。虽然此时 FIH 对天冬氨酸残基的羟基化作用依旧存在, 但是仍然有部分 HIF- α 与 HIF-1 β 异二聚体结合成为转录复合体, 从而激活低氧相关靶基因的转录^[13]。重度低氧时, PHD 与 FIH 的羟基化作用皆受到抑制^[13]。此时, 除 HIF 异二聚体形成外, 还出现乙酰转移酶 p300 与环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CBP) 的相互作用, 从而促进后者与 HIF- α 的 C-端结构域结合, 也促进 FIH 敏感的 HIF 靶基因的转录^[18]。

2 酶类氧感受机制

除了 HIF, 酶类氧传感器也在氧感受机制中发挥重要调节作用。它们主要是 PHD 和天冬氨酰羟基化酶。

2.1 PHD

随着对 HIF 研究的深入, 人们发现了促进 HIF- α 亚基特定残基羟基化作用的酶, 其中占主导作用的是 PHD。最初研究显示, pVHL 与 HIF- α 具有铁离子相关性的直接相互作用, 并且影响着 HIF- α 亚基的水解作用^[15]。进一步研究证实, pVHL

作为 E3 泛素连接酶复合物的识别成分与 HIF- α 结合, 且结合在 HIF- α 亚基的氧不稳定性区域, 从而在氧充足条件下使 HIF- α 被分解^[19]。该发现促使人们进一步探究其促进或抑制因素, 继而发现了促进氧调节的关键过程, 即 HIF- α 特定区域的羟基化作用。研究显示, 脯氨酸残基的氧依赖性反式-4-羟基化过程使其与 pVHL 的亲合力增加了 1 000 倍以上^[20]。如上所述, HIF- α 与 pVHL 有效结合才能保证常氧条件下体内的 HIF- α 被分解, 因此 PHD 也是一种氧分子感受器, 在一定氧含量范围内确保 HIF 亚基的羟基化过程。而当氧含量不足以维持细胞正常生理功能时则 PHD 失效, 使 HIF- α 不能羟基化, 从而调节体内 HIF- α 含量, 形成 HIF 转录复合体, 调控靶基因的表达, 此为 PHI 的治疗性研究提供了基础, 如全球首个小分子 PHI 罗沙司他 (Roxadustat) 就是基于这个原理研发出来的。该药物通过模拟 PHD 的底物酮戊二酸来竞争性结合 PHD, 从而抑制 HIF- α 降解, 增加 HIF 转录复合体形成, 诱导低氧应答靶基因的转录, 达到纠正贫血的目的^[21, 22]。

PHD 属于 2-氧戊二酸 (2-OG) 依赖性双加氧酶超家族, 包含 PHD1、2、3 三种亚型, 分别由三类同源基因 (*EGLN1*、*EGLN2* 和 *EGLN3*) 编码^[23], 三者各有特性。研究显示, 参与 HIF 调控的 PHD 中, PHD2 广泛表达于各种细胞类型。尤其对于 HIF-1

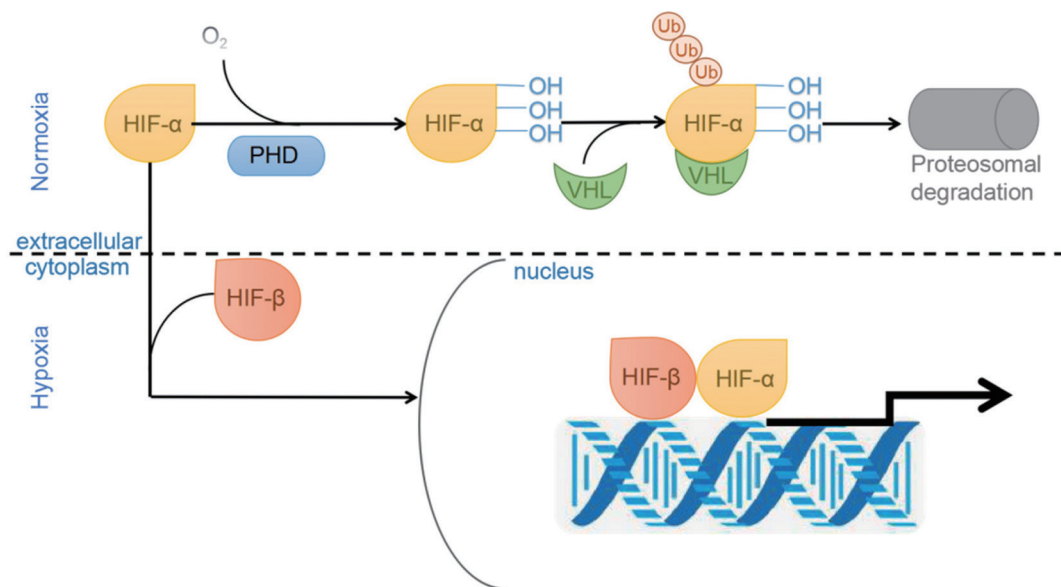


图 1. 低氧诱导因子氧感受机制

Fig. 1. Hypoxia-induced factor (HIF) oxygen sensing mechanism. VHL, von Hippel-Lindau; PHD, prolyl hydroxylase domain. The figure was reproduced from reference^[17] with adjustment.

而言, PHD2 是调节其活性的主要因子^[24]。最近研究显示, PHD2 可能参与一些疾病的发生和发展, 例如: 影响紫绀型先天性心脏病预后^[25]、通过 Akt-mTOR 通路抑制黑色素细胞瘤发生^[26]、介导骨质疏松与骨关节炎^[27]等。对于 HIF-2 的调节, PHD1 和 PHD3 的活性相对较高, 但二者皆对分子氧浓度降低敏感, 低氧条件下失活。由于 HIF- α 拥有多个目标残基, PHD 的活性分别依赖于 PHD 对 HIF 不同脯氨酸残基的选择性结合。PHD 偏向结合于 HIF 亚基的 C-端序列, 其中偏好程度最高为 PHD3, 其次为 PHD1 和 PHD2^[19]。PHD 对底物的选择取决于其中一个流动环所包含的序列, 其介导了 HIF 中残基与 PHD 催化位点的结合^[28]。

PHD 的活性除了受底物影响以外, 还与 2-OG 依赖性双加氧酶超家族的共性有关。该蛋白家族进行氧化还原反应的机制与 HIF- α 中脯氨酸残基的氧化反应相耦联。2-OG 与其底物反应后需脱掉一分子水并结合一分子氧, 接着生成氧化还原产物及副产物二氧化碳和琥珀酸。然而, 使用重组 PHD 蛋白的研究显示其与分子氧的结合异常缓慢。因为 PHD2 本身与 Fe^{2+} 和 2-OG 稳定结合, 不易置换水分子, 而将结合 Fe^{2+} 的天冬氨酸残基替换成谷氨酸后, 则催化中心结合力降低, 这时观察到 PHD 结合氧的速度增加了 5 倍^[29]。

PHD 的活性具备可调节性。首先, 上文所述 PHD 与氧分子的慢反应是因为需要替换稳定结合物中的水分子。研究显示, 酸性条件下的水分子质子丢失与 PHD 的高催化性相关, 即环境 pH 值可影响 PHD 的催化活性^[30]。再者, 氧化应激也可调节其活性。许多 2-OG 都需要抗坏血酸, 通过调节催化铁中心来催化 PHD 的完全活性。而作为强力抗氧化剂, 抗坏血酸会在氧化应激条件下失活。然而, 该现象是否会影响氧化应激状态下的 PHD 活性仍不清楚。有研究显示, 抗坏血酸在 HepG2 肝癌细胞培养中对 HIF 及其靶基因 *CA9* 和 *NDRG1* 的表达有显著抑制作用; 但是在坏血病大鼠体内实验研究中, 添加抗坏血酸并未对 EPO 的生成产生有效影响^[31]。再者, 相对于其他 2-OG 酶类, PHD 酶对 Fe 的亲合力相对较高, 从而可以保护自身不受 Fe 依赖性氧化还原过程的损害, 使 PHD 酶对 Fe 催化中心的氧化作用产生较强的抵抗力^[13]。

2.2 HIF天冬氨酸羟化酶

另一种常见的 HIF 羟化酶为天冬氨酸羟化酶,

即 FIH。不同于 PHD, FIH 与底物的结合位点空间更大, 而且更能耐受一定程度的低氧。FIH 可介导包含锚定蛋白重复结构域 (ankyrin repeat domain, ARD) 的羟基化过程。其中, 天冬氨酸是 FIH 的靶向氨基酸残基。此外, HIF 也可以介导 ARD 羟基化, 且与含有 ARD 蛋白的亲合力低于 FIH。因此 FIH 的浓度会对 HIF 的羟基化效果产生影响^[32]。

目前已知的机制可分为 HIF 复合体形成前和形成后两阶段。首先, FIH 的作用位点为 HIF- α 的 C-末端天冬氨酸残基, 位于 HIF- α 与转录协同激活剂 p300/CBP 形成的复合物的疏水区中。因此, HIF- α -p300/CBP 的相互作用已成为近年来的研究热点, 其抑制剂已作为肿瘤治疗药物进行临床研究^[33]。再者, HIF 转录复合体形成之后, 诱导靶基因转录。大多数 HIF 诱导低氧基因的启动子上都有 RNA 聚合酶 II, 无论是常氧还是低氧状态, 其启动转录过程称为启动子的暂停解除。因此, 有研究者认为 FIH 通过参与影响该过程中间复合物的募集来抑制 HIF 启动靶基因转录。该假设还有待进一步证实^[12]。此外, 有研究证实 FIH 主要作用于 HIF-1 亚型^[34]。

然而, 同为羟化酶, PHD 与 FIH 有着不同的特性。PHD 与 FIH 失活的氧条件和作用位点不同, 因此针对 PHD 的抑制剂无法对 FIH 起作用。研究显示, 随着氧水平的降低, PHD 活性先降低^[35], 此时 FIH 还能发挥作用。而氧水平处于极低状态时 (氧含量 $\leq 0.1\%$, 时间 ≤ 4 h), FIH 开始活性降低, 从而大幅度激活 HIF, 发挥其低氧诱导反应^[35]。

2.3 其他2-OG加氧酶在氧感受中的作用

在低氧适应机制中不仅仅有 PHD、FIH 及其底物在发挥作用。研究显示, 除 HIF 外, 不同的 PHD 酶有超过 20 种作用底物, 作为 PHI 的非预期低氧生理效应出现。有研究者认为, 这些非 HIF 的底物很有可能与 HIF 竞争性结合 PHDs 来影响和调节 HIF 诱导的靶基因转录活性^[13]。但是最新的非 HIF 底物的重组酶研究并不支持这一观点。该研究并未发现非 HIF 底物上存在 PHDs 活性, 而且实验本身无法排除非重组型 PHD 脯氨酸羟基化作用^[36]。这是 PHI 药物开发应当进一步考虑的问题, 即如何控制药物的特异性, 减少不必要的副作用。

此外, 2-OG 加氧酶催化的反应不仅仅是蛋白的羟基化, 还包括 DNA、RNA 和组蛋白的去甲基化等^[37, 38]。由此猜测, 2-OG 加氧酶还参与低氧基因表达的多个环节。最近研究显示, 组蛋白去甲基

化酶对低氧高度敏感, 是一种非 HIF 依赖的氧感受机制^[39]。

3 总结

氧感受与适应机制的发现为理解众多疾病的发生提供新的视角, 同时也为有关疾病治疗提供了新的靶点。罗沙司他作为第一个基于低氧调控机制而成功开发的 HIF 稳定剂已在我国成功上市, 并应用于肾性贫血的治疗。临床研究表明, 它不仅能够通过间断诱导内源性生理浓度的 EPO 表达而快速升高血红蛋白水平, 而且显著减低铁调素, 改善机体的铁吸收和利用^[40]。更为有意义的是, 对于因炎症而对 EPO 抵抗的患者该药仍然可能有效, 显示出其在肾性贫血治疗中独特优势和巨大潜力。目前 HIF-PHI 正如同雨后春笋般问世, 已经有 7 个产品相继进入临床试验, 其长期应用的效果和安全性仍有待临床检验。未来它们对慢性肾病进展及其他低氧相关性疾病如心肌梗死、脑卒中等治疗价值也有待进一步探讨, 同时其对肿瘤患者的潜在风险也需积极评估。

参考文献

- 1 Semenza GL, Wang GL. 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. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12): 5447–5454.
- 2 Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997; 11(1): 72–82.
- 3 Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(2): 1721–1732.
- 4 Li ZL, Lv LL, Tang TT, Wang B, Feng Y, Zhou LT, Cao JY, Tang RN, Wu M, Liu H, Crowley SD, Liu BC. HIF-1 α inducing exosomal microRNA-23a expression mediates the cross-talk between tubular epithelial cells and macrophages in tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int* 2018; 95(2): 388–404.
- 5 Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L, Pählman S. Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10(5): 413–423.
- 6 Tanaka T, Michael W, Wanja B, Kai-Uwe E, Christina W. The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochem J* 2009; 424(1): 143–151.
- 7 Ivan M, Kaelin WG Jr. The EGLN-HIF O₂-sensing system: multiple inputs and feedbacks. *Mol Cell* 2017; 66(6): 772–779.
- 8 Li ZL (李作林), Lv LL, Liu BC. Advances in the role of hypoxia-inducible factor-related microRNAs in renal disease. *Int J Urol Nephrol* (国际泌尿系统杂志) 2018; 38(1): 157–161 (in Chinese).
- 9 Mathew LK, Lee SS, Skuli N, Rao S, Keith B, Nathanson KL, Lal P, Simon MC. Restricted expression of miR-30c-2-3p and miR-30a3p in clear cell renal cell carcinomas enhances HIF2 α activity. *Cancer Discov* 2014; 4: 53–60.
- 10 Liu LL, Li D, He YL, Zhou YZ, Gong SH, Wu LY, Zhao YQ, Huang X, Zhao T, Xu L, Wu KW, Li MG, Zhu LL. miR-210 protects renal cell against hypoxia-induced apoptosis by targeting HIF-1 α . *Mol Med* 2017; 23: 258–271.
- 11 Li A, Peng R, Sun Y, Liu HD, Peng HM, Zhang Z. LincRNA 1700020I14Rik alleviates cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via miR-34a-5p/Sirt1/HIF-1 α signaling. *Cell Death Dis* 2018; 9(5): 461.
- 12 Baik SH, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim JI, Mook-Jung I. A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metabolism* 2019; 30(3): 493–507.
- 13 Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol* 2019; 15(10): 641–659.
- 14 Liu BC (刘必成), Li ZL. New advances in hypoxia-inducible factor and the inhibitor of prolyl hydroxylase. *Chin J Nephrol* (中华肾脏病杂志) 2017; 33(12): 951–955 (in Chinese with English abstract).
- 15 Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399(6733): 271–275.
- 16 Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292(5516): 464–468.
- 17 Li ZL, Liu BC. Hypoxia and renal tubulointerstitial fibrosis. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1165: 467–485.
- 18 Lindström I, Andersson E, Dogan J. The transition state structure for binding between TAZ1 of CBP and the disor-

- dered Hif-1 alpha CAD. *Sci Rep* 2018; 8(1): 7872.
- 19 Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von hippel-lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2000; 275(33): 25733–25741.
- 20 Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP. Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002; 296(5574): 1886–1889.
- 21 Li ZL (李作林), Liu BC. The role of oral HIF stabilizer in the treatment of renal anemia. *Natl Med J China (中华医学杂志)* 2017; 97(34): 2706–2709 (in Chinese with English abstract).
- 22 Dhillon S. Roxadustat: First global approval. *Drugs* 2019; 79(5): 563–572.
- 23 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzén 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.
- 24 Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *EMBO J* 2003; 22(16): 4082–4090.
- 25 Zhou Y, Ouyang N, Liu L, Tian J, Huang X, Lu T. An EGLN1 mutation may regulate hypoxic response in cyanotic congenital heart disease through the PHD2/HIF-1A pathway. *Genes Dis* 2018; 6(1): 35–42.
- 26 Liu S, Zhang G, Guo J, Chen X, Lei J, Ze K, Dong L, Dai X, Gao Y, Song D, Ecker BL, Yang R, Feltcher C, Peng K, Feng C, Chen H, Lee RX, Kerestes H, Niu J, Kumar S, Xu W, Zhang J, Wei Z, Martin JS, Liu X, Mills G, Lu Y, Guo W, Sun L, Zhang L, Weeraratna A, Herlyn M, Wei W, Lee FS, Xu X. Loss of Phd2 cooperates with BRAFV600E to drive melanomagenesis. *Nat Commun* 2018; 9(1): 5426.
- 27 Lindsey RC, Cheng S, Mohan S. Vitamin C effects on 5-hydroxymethylcytosine and gene expression in osteoblasts and chondrocytes: Potential involvement of PHD2. *PLoS One* 2019; 14(8): e0220653.
- 28 Chowdhury R, Leung IK, Tian YM, Abboud MI, Ge W, Domene C, Cantrelle FX, Landrieu I, Hardy AP, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Claridge TD, Schofield CJ. Structural basis for oxygen degradation domain selectivity of the HIF prolyl hydroxylases. *Nat Commun* 2016; 7: 12673.
- 29 Tarhonskaya H, Chowdhury R, Leung IK, Loik ND, McCullagh JS, Claridge TD, Schofield CJ, Flashman E. Investigating the contribution of the active site environment to the slow reaction of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase domain 2 with oxygen. *Biochem J* 2014; 463(3): 363–372.
- 30 Flagg SC, Giri N, Pektas S, Maroney MJ, Knapp MJ. Inverse solvent isotope effects demonstrate slow aquo release from hypoxia inducible factor-prolyl hydroxylase (PHD2). *Biochemistry* 2012; 51(33): 6654–6666.
- 31 Nytko KJ, Maeda N, Schläfli P, Spielmann P, Wenger RH, Stiehl DP. Vitamin C is dispensable for oxygen sensing *in vivo*. *Blood* 2011; 117(20): 5485–5493.
- 32 Schmierer B, Novak B, Schofield CJ. Hypoxia-dependent sequestration of an oxygen sensor by a widespread structural motif can shape the hypoxic response—a predictive kinetic model. *BMC Syst Biol* 2010; 4: 139.
- 33 Wei J, Yang Y, Lu M, Lei Y, Xu L, Jiang Z, Xu X, Guo X, Zhang X, Sun H, You Q. Recent advances in the discovery of HIF-1 α -p300/CBP inhibitors as anti-cancer agents. *Mini Rev Med Chem* 2018; 18(4): 296–309.
- 34 Bracken CP, Fedele AO, Linke S, Balrak W, Lisy K, Whitelaw ML, Peet DJ. Cell-specific regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha stabilization and transactivation in a graded oxygen environment. *J Biol Chem* 2006; 281(32): 22575–22585.
- 35 Tian YM, Yeoh KK, Lee MK, Eriksson T, Kessler BM, Kramer HB, Edelmann MJ, Willam C, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Differential sensitivity of hypoxia inducible factor hydroxylation sites to hypoxia and hydroxylase inhibitors. *J Biol Chem* 2011; 286(15): 13041–13051.
- 36 Cockman ME, Lippl K, Tian YM, Pegg HB, Figg WD Jr, Abboud MI, Heilig R, Fischer R, Myllyharju J, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Lack of activity of recombinant HIF prolyl hydroxylases (PHDs) on reported non-HIF substrates. *Elife* 2019; 8: e46490.
- 37 Ge W, Wolf A, Feng T, Ho CH, Sekirnik R, Zayer A, Granatino N, Cockman ME, Loenarz C, Loik ND, Hardy AP, Claridge TDW, Hamed RB, Chowdhury R, Gong L, Robinson CV, Trudgian DC, Jiang M, Mackeen MM, McCullagh JS, Gordiyenko Y, Thalhammer A, Yamamoto A, Yang M, Liu YP, Zhang Z, Schmidt-Zachmann M, Kessler BM, Ratcliffe PJ, Preston GM, Coleman ML, Schofield CJ. Oxygenase-catalyzed ribosome hydroxylation occurs in prokaryotes and humans. *Nat Chem Biol* 2012; 8(12): 960–962.
- 38 Feng T, Yamamoto A, Wilkins SE, Sokolova E, Yates LA, Münzel M, Singh P, Hopkinson RJ, Fischer R, Cockman ME, Shelley J, Trudgian DC, Schödel J, McCullagh JS, Ge W, Kessler BM, Gilbert RJ, Frolova LY, Alkalaeva E, Ratcliffe PJ, Schofield CJ, Coleman ML. Optimal translational termination requires C4 lysyl hydroxylation of eRF1. *Mol Cell* 2014; 53(3): 645–654.

- 39 Chakraborty AA, Laukka T, Myllykoski M, Ringel AE, Booker MA, Tolstorukov MY, Meng YJ, Meier SR, Jennings RB, Creech AL, Herbert ZT, McBrayer SK, Olenchock BA, Jaffe JD, Haigis MC, Beroukhi R, Signoretti S, Koivunen P, Kaelin WG Jr. Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate. *Science* 2019; 363(6432): 1217–1222.
- 40 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.