

· 综述 ·

低氧诱导因子-1 的病理生理及相关药物研究进展

冯世杰, 马秀娟, 宗 英, 毛 煜, 张晓冬, 弓雪莲, 张晓芳, 陆国才 (第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factors, HIF-1)是介导哺乳动物和人体细胞低氧适应性反应的主要核转录因子,是专一调节氧稳态的关键物质。HIF-1对胚胎的正常发育,软骨及骨的形成等多种生理过程起保护及促进作用,也与肿瘤、糖尿病及其并发症等多种缺血低氧性疾病密切相关。HIF-1在这些疾病中的分子机制已成为目前的研究热点,笔者就HIF-1的结构特征、调控机制、生物学效用及在药物研发等方面进行综述。

[关键词] 低氧诱导因子-1;低氧反应原件;氧稳态平衡;活性调节;抑制剂

[中图分类号] R73 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)03-0161-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.03.001

Progress in pathophysiology and related drug development of hypoxia-inducible factor-1

FENG Shijie, MA Xiujuan, ZONG Ying, MAO Yu, ZHANG Xiaodong, GONG Xuelian, ZHANG Xiaofang, LU Guocai (Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a critical nuclear transcriptional factor mediating cell adaptive response to hypoxia in mammalian and human. It is the key mediator which modulates oxygen homeostasis exclusively. In the one hand, HIF-1 can protect and promote kinds of physiological processes, such as embryo normal development, cartilage and bone formation. In the other hand, it is also involved in lots of human deceases which is caused by ischemia and hypoxia, such as tumor, diabetes and its complications. The molecular mechanisms of HIF-1 involved in these diseases have become a research hotspot and such studies will provide the new therapeutic means for these diseases, recent new drug researches have been focused on HIF-1 related signal pathway inhibitors, HIF-1 activity inhibitors, HIF-1 targeted therapy, etc.

[Key words] hypoxia-inducible factor-1; hypoxia-response element; oxygen homeostasis; activity regulation; inhibitor

1992年, Semenza等^[1]对经低氧处理的Hep3B细胞株的核提取物进行电泳移分析时,首先发现了低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1),随后在1997和1998年又相继发现了HIF-2及HIF-3,目前认为HIF在体内可能存在一个家族。现已知的HIFs家族成员HIF-1、HIF-2和HIF-3都是由低氧敏感的 α 亚基和构成性表达的 β 亚基构成的异源二聚体,低氧均能诱导HIFs的转录、翻译及激活,在体内结合目的基因的低氧反应原件而发挥病理或生理作用。其中HIF-1 α 和HIF-2 α 在氨基酸序列上具有50%的序列同源性,但两者在组织分布、靶基因及功能上存在显著差异^[2]。目前对HIF-3 α 的认识不够深入,认为其可能对低氧诱导相关基因的表达和HIF-1

的活性起负性调节作用。HIFs家族中维持细胞氧稳态平衡的主要分子是HIF-1,对HIF-1的研究也最多、最深入。本文就HIF-1的结构与调控、生物学效应及相关药物研究进展作简要综述。

1 HIF-1 结构与调控

1.1 HIF-1 结构特征 HIF-1是由胞质内相对分子质量(M_r)为120 000的 α 亚单位和细胞核内 M_r 为91 000~94 000的 β 亚单位构成的异源二聚体转录因子。两个亚单位的氨基末端均包括碱性-螺旋-环-螺旋(basic-helix-hoop-helix, bHLH)-PAS(per-ARNT-AHR-Sim)源结构域,介导DNA的结合与异二聚化,它们同属于bHLH-PAS超家族的成员。

人HIF-1 α 亚基位于14号染色体(14q21~q24),是HIF-1的主要调节亚基和活性亚基,其稳定性和转录活性受细胞内氧浓度的严密调控^[3]。HIF-1 α 蛋白由4个功能结构域组成,4个功能结构域分别是:①bHLH域,介导与靶基因低氧反应元件(hypoxia

[基金项目] 科技部重大专项“重大新药创制”(2010ZX0900X-005),上海市公共卫生重点实验室建设计划(12GWZX0501)。

[作者简介] 冯世杰,女,硕士研究生。(021)81871035, E-mail:fxiaojie1120@126.com。

[通讯作者] 陆国才。Tel:(021)81871032, E-mail:newdrug@smmu.edu.cn。

response element, HRE) DNA 结合和二聚化;②PAS 结构域,与 bHLH 共同构成蛋白异二聚化功能界面;③氧依赖性降解域(oxygen-dependent degradation domain, ODDD),介导常氧时 HIF-1 的泛素-蛋白酶体途径降解;④羧基末端的两个转录激活结构域(terminal transactivation domain, TAD), N-TAD(与 ODDD 部分重合)和 C-TAD,负责与转录起始复合物结合和参与转录活化,两者之间互为抑制结构域(inhibitory domain, ID),能降低该分子 TAD 的活性,常氧条件下该抑制作用明显。此外, HIF-1 α 羧基、氨基末端各含一个核定位信号序列(nuclear localization signal-C, NLSC 和 nuclear localization signal-N, NLSN),低氧时, HIF-1 α 必须在 NLS 介导下才能入核,与 HIF-1 β 异二聚化形成有活性的 HIF-1,从而调节多种基因的转录。

HIF-1 β 亚基又称芳香烃受体核转位子,为哺乳动物芳香烃受体复合物的亚型,是很多转录因子共有的亚基,由 bHLH、PAS 和 TAD 三个结构域组成。研究表明其在细胞核内稳定过量表达,不受细胞氧浓度的调节,并可与其他 bHLH 蛋白形成二聚体^[4]。

1.2 HIF-1 的调控 HIF-1 在体内的表达和活性调节受 mRNA 水平、蛋白质水平、核转位水平、二聚化水平和转录激活水平等多因素调控。目前认为, HIF-1 的调控主要发生于蛋白水平^[5],涉及蛋白的合成与降解,其合成是稳定性调控机制,而降解则属于氧依赖性调控机制。HIF-1 β 表达稳定,因此 HIF-1 的调控主要是对 HIF-1 α 亚基的调节。

1.2.1 HIF-1 α 的氧依赖调节 研究发现, HIF-1 α 蛋白表达量和转录活性受细胞内氧浓度的严密调节,其中两种羟化酶起到了关键作用。

关键酶之一是脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylases, PHD)。目前已知的 PHD 有 3 种, PHD2 在常氧条件下起关键作用, PHD1、PHD3 在慢性缺氧条件下起一定的生理作用。常氧条件下, PHD2 可将 HIF-1 α ODD 区的第 402 位和第 564 位脯氨酸残基羟化,羟化后的脯氨酸残基能被希佩尔-林道肿瘤抑制蛋白(von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL)特异性识别,并发挥泛素连接酶的作用,使 HIF-1 α 与泛素依赖的 26 S 蛋白酶体复合物结合而被该酶降解。所以,常氧下 HIF-1 α 不稳定,半衰期很短,为 5~10 min。如除去此 ODD 区, HIF-1 α 则不再降解,而是自发地异二聚化、DNA 结合和反式活化。此外, PHD 的羟化作用还需要 O₂、Fe²⁺、 α -酮戊二酸的参与。低氧则抑制了 ODD 区域的脯氨酸残基羟化,导致 HIF-1 α 不能与 pVHL 结合,而与热休克蛋白 90(HSP 90) heat shock protein 结合,增强

其稳定性,从而阻断了 HIF-1 α 的泛素-蛋白酶体途径降解,使得其在胞质内稳定表达,通过积聚、活化、转位入核,与 HIF-1 β 结合形成 HIF-1,致使其表达量在细胞内呈几何级数增加。此外,二价钴离子、锰离子、镍离子以及铁离子螯合剂,都可以阻断 HIF-1 α 亚基的羟化,妨碍 HIF-1 α 的水解,进而增加了 HIF-1 的稳定性。

另一个关键酶是天冬氨酸羟化酶,又称 HIF-1 抑制因子(factor inhibiting HIF-1, FIH)。FIH 对于逃脱了蛋白酶体降解途径的 HIF-1 α 起二级负向调控作用。HIF-1 α 的 TAD 必须与转录辅因子结合,才能发挥转录激活作用。常氧下, FIH 可将 HIF-1 α 亚基 TAD 的第 803 位天冬氨酸残基羟化,从而阻止 c-TAD 与转录辅因子的反应,进而抑制 HIF-1 α 的转录活性。与 PHD 类似, FIH 活性作用的发挥依赖环境中的氧分子、二价铁离子、 α -酮戊二酸。因此,在低氧或有铁离子螯合剂存在时, FIH 的活性受抑制, HIF-1 的转录增加。除此以外, FIH 还可以通过与 pVHL 和组蛋白脱乙酰基酶的反应间接抑制 c-TAD 的转录激活功能。

1.2.2 HIF-1 α 的非氧依赖调节途径 除了低氧刺激外,细胞内还存在 HIF-1 α 的一些非氧依赖性调节途径。如抑癌基因也在调节 HIF-1 α 稳定性、失活及信号转导通路上发挥重要作用。如 P53 可通过直接抑制 HIF-1 α 转录活性和通过促进鼠双微体 2(Murine Double Minutes2, MDM 2)蛋白介导的 HIF-1 α 泛素化-蛋白酶降解两种形式调节 HIF-1 α 。一些生长因子和细胞因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素(insulin)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、白介素-1 β 等可与其受体蛋白酪氨酸激酶结合后进一步激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI₃K)或丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径,进而使 HIF-1 α 蛋白表达增加,增强 HIF-1 的 DNA 连接活性,促进 HIF-1 靶基因的表达。当 HIF-1 α 蛋白合成速度超过降解速度时,未降解的 HIF-1 α 进入细胞核与 HIF-1 β 结合形成有功能的 HIF-1。另外,还有一些非氧因素,如铁离子螯合剂、钴、镍、温度、细菌内毒素脂多糖、一氧化氮、活化的 Ras 等对 HIF-1 α 也有调节作用。

2 HIF-1 的生物学效应

低氧时, HIF-1 在多种组织细胞中都有表达,包括肾、肝、肺、脑、心等,近年来还发现其对骨形成也有一定的作用;同时 HIF-1 α 也是多种病理反应的中介因子,介导多种病理作用的发生与发展。目前已

经发现 100 多种受其靶向调控的基因,涉及红细胞生成、血管增生、血流供应、氧化和能量代谢等。

2.1 HIF-1 介导的保护作用

2.1.1 HIF-1 与胚胎发育 除了与外界直接相通的呼吸道之外,成人机体内组织、器官的氧分压远远低于大气压,氧浓度范围在 3% ~ 5%。而当胚胎开始发育时,氧气浓度为 1% ~ 5%,胚胎组织处在生理性低氧微环境中。Yoon 等研究发现,基因敲除(HIF-1 α ^{-/-})小鼠在胚胎期 10.5 d 时,由于心脏发育畸形、心血管和红细胞发育缺陷而死亡,表明 HIF-1 α 与血液循环系统正常发育密切相关^[6]。条件性敲除特定细胞系内的 HIF-1 α ^{-/-} 基因,则会不同程度的影响软骨及脂肪形成、B 淋巴细胞生长、T 淋巴细胞分化和先天性免疫功能等,进而影响胚胎正常发育。HIF-1 α ^{-/-} 小鼠在发育过程中出现发育不良现象,但是当低氧诱导的 HIF-1 活性过强时,也能导致胚胎发育失调及畸胎。

2.1.2 HIF-1 与软骨及骨形成 构成肢体的大部分骨骼是经软骨内化骨的方式发生,其中,血管侵入是骨形成和骨代替软骨组织的标志。正常生理情况下,成人关节软骨组织内无直接的血液供应,生长板软骨虽有血液供应,但远不能满足细胞需要,因此,软骨细胞处于低氧微环境。体外敲除生长板软骨细胞内 HIF-1 α ^{-/-} 基因,发现 HIF-1 α ^{-/-} 软骨细胞增殖低于 HIF-1 α ^{+/+} 细胞^[7]。运用 Cre-Loxp 方法条件性敲除小鼠软骨细胞内 HIF-1 α ^{-/-} 基因,导致软骨发育障碍,并因支气管塌陷和肋骨畸形引起呼吸困难,在出生前即死亡。另外,软骨细胞分泌、合成的细胞外基质也相应减少,造成躯体支架结构发育障碍,胚胎出生前死亡^[8]。进一步敲除生长板中心软骨细胞 HIF-1 α 时,软骨细胞大量凋亡、无软骨特有的 II 型和 IX 型胶原表达;而未敲除的生长板外周细胞 HIF-1 α 代偿性表达增加。

软骨内化为骨时,HIF-1 α 作为上游调控基因,能直接或间接地促进血管入侵到软骨中,促进骨的形成。目前已知的机制包括:①激活血管内皮生长因子(vascular epithelial growth factor, VEGF)促进血管增生;②诱导成纤维细胞表达核结合因子(core binding factor, CBF)以介导成骨细胞早期分化;③诱导胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor-2, IGF-2)以利于骨功能形成;④诱导转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)和骨钙蛋白以利于骨转换^[9]。

2.1.3 HIF-1 与缺氧性脑血管疾病 大脑对缺血及随之而来的缺氧十分敏感,在全脑缺血模型、局灶性脑缺血模型中,均发现脑组织中 HIF-1 α 的大量表达

和激活增加^[10]。Bergeron 等对新生大鼠给予 8% 低氧预处理,3 h 后发现 HIF-1 α mRNA 水平及 HIF-1 α 和 HIF-1 β 蛋白水平在整个脑组织中的表达显著增加。HIF-1 的上调具有脑保护作用^[11],其作用机制主要是通过调控一系列下游靶基因的转录激活,通过改善脑缺血后的能量代谢障碍、促进血流动力学恢复、抑制兴奋性氨基酸的神经毒性、减少细胞凋亡等发挥脑保护作用^[12]。其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因和促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因是明确具有脑保护作用的 HIF-1 靶基因。此外 HIF-1 α 表达增加还能促进葡萄糖的转移、利用及酵解,为脑组织提供能量、减少细胞凋亡以减轻脑损伤。但很多研究还发现,HIF 除了可以促进神经细胞存活,还可以启动凋亡途径,多种促凋亡因子如 P53 也受 HIF-1 α 调控,轻度低氧不能使 P53 聚集,长时间严重缺氧能去磷酸化 HIF-1 α 进而导致 P53 稳定性增加,介导神经细胞死亡,可见, HIF 在神经系统疾病中发挥双重作用。

2.1.4 HIF-1 与缺血性心血管疾病 冠状动脉粥样硬化引起的血管狭窄或痉挛会导致心肌血流灌注不足,进而引发心肌组织氧和能量供给不足,加重心脏疾病。为改善心肌缺血,机体会代偿性重构侧支血管,以增加血流,并主动绕过血管狭窄区域。Resan 等^[13]研究基因调控水平对冠脉侧支循环发育的影响时,发现 HIF-1 多态性与缺血性心脏病患者的侧支循环形成有重要关系。约 2/3 冠状动脉严重狭窄的患者体内都有一条甚至多条侧支血管,当粥样硬化斑块弥漫阻塞冠脉、诱发心脏病时,有侧支血管的患者梗死面积较小、更易存活。在冠脉严重狭窄的患者中,与未生成侧支血管的患者相比,有侧支血管的患者其 HIF-1 α 第 582 位脯氨酸残基变成丝氨酸残基的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)增加 5 倍。

缺血预处理可以增强心肌的缺血适应性并产生保护作用,大量研究发现 HIF-1 α 参与了缺血预适应启动的心肌保护作用,是缺血预适应的一个标志^[14]。给小鼠注射 CoCl₂ 来模拟缺氧反应,抑制 HIF-1 α 的降解,发现经 CoCl₂ 预处理的心脏模型的心梗面积显著降低,同时心肌 HIF-1 α 的 DNA 活性也显著增加。HIF-1 α ^{+/+} 小鼠则完全没有这种预适应现象^[15]。HIF-1 不仅是心肌低氧而且也是心肌应激的主要调控因子,促进 VEGF、EPO、iNOS 等基因的转录,引起一系列适应性病理生理反应。

2.2 HIF-1 介导的病理作用

2.2.1 肿瘤 肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞的大量增殖、转移和凋亡减少有关,其中肿瘤细胞的高速增

殖和肿瘤源性结构、功能异常性血管增生导致肿瘤组织持续处于低氧微环境。有研究表明,低氧可触发肿瘤产生一系列应激性保护反应,使得肿瘤细胞在低氧状态下免受损伤或死亡。而 HIF-1 α 是调节肿瘤细胞适应低氧的核心转录因子,目前已在多种恶性肿瘤及癌前病变组织中检测到 HIF-1 α 蛋白高表达,表明 HIF-1 α 参与调节多种肿瘤低氧适应靶基因的转录激活、靶蛋白表达增加,导致肿瘤细胞生物学特性发生改变^[16]。HIF-1 α 有 100 多种目的基因,与肿瘤关系密切的包括肿瘤干细胞维持^[17]、细胞增殖与凋亡相关因子、内皮-间质转换^[18]、遗传稳定性、肿瘤的血管形成、葡萄糖代谢^[19]、肿瘤侵袭与转移及放疗抵抗等相关基因。研究发现,HIF-1 α 表达水平增加,会促进肿瘤生长,而当 HIF-1 活性丧失时,肿瘤生长速率降低^[20]。HIF-1 α 促进肿瘤发展的生物学机制包括:①促进肿瘤新生血管形成。VEGF 基因是 HIF-1 α 最重要的靶基因之一,亦是新生血管的关键调控因子。在组织缺氧时,HIF-1 α 不仅可以促进 VEGF 基因转录,还能增加 VEGF 的 mRNA 稳定性,从而上调 VEGF 表达^[21]。VEGF 对血管内皮细胞有特异性促分裂增殖作用,有很强的血管通透性并与细胞外基质相联系,有利于肿瘤血管生成和浸润。②提高细胞的糖酵解水平。HIF-1 α 在缺氧时可增加与能量代谢相关的基因的表达,主要包括葡萄糖载体 1,3 以及与糖酵解有关的酶。这些靶基因表达的增加可使肿瘤细胞摄取和利用葡萄糖的能力增加,为肿瘤在缺氧状态下提供足够的能量供应,以维持肿瘤的生长。另外,糖酵解的增加还可减少有氧代谢中活性氧对细胞 DNA 快速复制的破坏。③影响肿瘤细胞的凋亡。肿瘤细胞凋亡有 p53 依赖性和非 p53 依赖性途径。HIF-1 α 可与 p53 共同作用启动凋亡基因而诱导肿瘤细胞的凋亡。研究发现,HIF-1 α 可通过抑制 MDM2 介导的 p53 泛素化和阻断 MDM2 介导的 p53 向核外转运而稳定 p53,提高肿瘤的侵袭和转移能力。某些肿瘤基因改变,如肾癌透明细胞中 pVHL 功能缺失,也能激活 HIF-1^[22]。有些肿瘤细胞中,HIF-1 的活性在富氧条件下表达也升高,使这些肿瘤更难治疗和控制。近年的研究还表明,HIF-1 表达增加与肿瘤患者的预后不良呈正相关。

2.2.2 肺动脉高血压 罹患慢性肺部疾病的患者肺泡长期暴露于缺氧微环境,诱发肺部血管重塑、肺收缩反应增强,最终引发肺动脉高压及右心室肥大,若长期持续低氧还将导致右心功能衰竭。现已在肺动脉平滑肌细胞中发现多个 HIF-1 靶基因,它们在缺氧应激中发挥重要作用^[23],且低氧时 HIF-1 α ^{+/+}

小鼠未患低氧性肺动脉高血压,表明 HIF-1 α 对缺氧导致的肺动脉高血压有促进作用。内皮素-1(endothelin, ET-1)是 HIF-1 的靶基因,它是缺氧时由肺血管内皮细胞产生的,可引起血管内皮平滑肌细胞的收缩和增生,在肺血管重构中起关键作用,Semanz 通过特异性敲除小鼠 HIF-1 α 基因,使得 ET-1 不能被激活转录,由缺氧诱导的肺血管重构现象明显受到了抑制。还有实验发现,慢性梗阻性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)患者肺部组织中 HIF-1 α 的 mRNA 及蛋白表达均明显增加。因此,HIF-1 α 在缺氧性肺动脉高压形成中起重要作用,可把 HIF-1 作为靶点来研制其抑制剂,以降低或阻断肺血管的重构,从而抑制肺动脉高压的形成。

2.2.3 糖尿病及其并发症 缺氧在糖尿病及其并发症的病理过程中发挥重要作用。糖尿病是由于胰岛素分泌不足或胰岛素抵抗引起的以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性疾病^[24],长期血糖控制不良的糖尿病患者易于合并多系统器官的慢性并发症。HIF-1 α 参与调节缺氧相关基因的表达,缺氧状态下可以在肾、肝、脑、肺、心和视网膜等多种组织细胞中表达,是缺氧状态下许多细胞发生糖酵解和新生血管形成的关键因素^[25]。研究表明在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的发展中视网膜缺氧与超微结构改变和 HIF-1 α 异常表达密切相关^[26]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的微血管并发症,大量实验证实,DN 大鼠模型上存在新生血管生成,而缺氧时微血管病变对肾病进展起着重要作用。在 DN 初期即有肾组织局部血流下降及氧供应量下降,且 DN 患者的活组织检查中也有 HIF 表达。在肾缺氧时,HIF-1 α 在肾小管和乳突状间质细胞中积累,通过 HIF-1 α /低氧反应元件(hypoxia response element, HRE)途径调控下游基因^[27],促进了肾纤维化过程^[28]。同时,对定向敲除 VHL 基因小鼠的研究证明,加速 HIF-1 α 的降解能抑制或减缓小鼠肾纤维化进程。

3 针对 HIF-1 的新药研发

3.1 HIF-1 靶向抑制剂 鉴于 HIF-1 参与了机体多种疾病的形成,尤其是肿瘤的进展过程,针对 HIF-1 活性抑制的药物及治疗方法的研究越来越多,其中大多数药物通过降低 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白水平,影响 HIF-1 与 DNA 的结合活性,或者下调受 HIF-1 调节的靶基因的转录活性等达到抑制 HIF-1 α 活性的目的。同时,鉴于 HIF-1 在促进肿瘤血管生成和肿瘤增殖中所扮演的重要角色,HIF-1 转录复合物本身便是一个很有意义的治疗靶点。因

此,阻断 HIF-1 通路及抑制 HIF-1 α 的表达成为目前抗肿瘤研究的热点之一。当前正在研究的抑制 HIF-1 活性药物大体可分为两类:HIF-1 相关信号转导通路抑制剂和 HIF-1 活性抑制剂。

3.1.1 HIF-1 相关信号转导通路抑制剂 HIF-1 α 自身活性调节主要发生在两条信号途径:PI₃K/AKT 信号转导通路和 MEK/MAPK 信号转导通路。前者主要介导调控 HIF-1 α 蛋白稳定性,后者则介导 HIF-1 α 反式激活功能调控。这两条通路还分别独立又协调地调控 HIF-1 α 的转录活性。一些信号转导通路抑制剂,如酪氨酸激酶抑制剂 (herceptin、iressa、herbimycin),PKC 抑制剂 (calphostin C),PI₃K 抑制剂 (wortmannin、LY294002),MAPK 抑制剂 (PD98059),雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂 (rapamycin) 等分子靶向药物能够抑制 HIF-1 α 的合成。

3.1.2 小分子 HIF-1 活性抑制剂 目前已有多种药物作用于不同环节,干扰 HIF-1 的合成、稳定性、异二聚化、DNA 结合及转录激活等,从而阻断其生物效应,有的和化疗、放疗联合应用时还表现出协同效应。

3.1.2.1 降低 HIF-1 α 蛋白水平的药物 降低 HIF-1 α 蛋白水平主要是通过减少 HIF-1 α 蛋白的合成和加快 HIF-1 α 的降解来完成。其中影响蛋白合成的药物包括:①心肌糖苷类。Zhang 等发现心肌糖苷类药物,包括地高辛、毒毛花苷 G (strophanthin)、海葱次苷 A (proscillaridin A) 等均能抑制肿瘤细胞 HIF-1 α 蛋白的合成和靶基因的表达,并且认为其主要是通过抑制 HIF-1 转录而减少蛋白质合成,但确切机制尚不清楚^[29]。②mTOR 抑制剂。哺乳动物体内存在雷帕霉素靶蛋白途径,雷帕霉素通过抑制 mTOR 以阻止 HIF-1 蛋白合成,mTOR 是丝/苏氨酸激酶,与生长激素共同调控细胞周期进程。体内存在两种不同的 mTOR 大分子复合物 mTORC1 及 mTORC2,前者对雷帕霉素敏感。近期临床研究发现,如将癌细胞持续暴露于雷帕霉素中,mTORC1、mTORC2 的功能都会被抑制^[30]。这些 mTOR 复合物的下游靶标有 HIF-1 α 和 HIF-2 α 、细胞周期蛋白 D1、PKC- α ,与多种细胞内过程的激活相关,促使细胞增殖、血管增生、转移及化学抵抗。临床三期实验结果显示,雷帕霉素类药物如依维莫司对肾细胞癌的治疗效果显著^[31]。③拓扑异构酶抑制剂。体内存在拓扑异构酶 I (topoisomerase I, TOP1) 和拓扑异构酶 II (topoisomerase II, TOP2) 两种拓扑异构酶。非小细胞肺癌治疗药物 TOP1 抑制剂托泊替康 (topotecan) 和 TOP2 抑制剂依托泊苷 (etoposide) 明显阻断低氧诱导的 HIF-1 α 蛋白积聚,

并且抑制程度呈时间和剂量依赖性^[32],其机制可能与促进蛋白酶体降解和抑制 AKT 磷酸化相关。④钙黏神经素抑制剂。钙黏神经素是一种丝/苏氨酸磷酸酶,使活化的蛋白激酶 C 受体 (receptor of activated protein kinase C, RACK1) 脱磷酸化而促进 HIF-1 α 表达。RACK1 位于钙黏神经素催化区域,其上的 elongin-C 结合点与 pVHL 有高度序列相似性,使之有类似 pVHL 的功能,它能够独立添加 elongin-C 泛素连接酶复合体使 HIF-1 α 泛素化后被蛋白酶体识别。钙黏神经素抑制剂则通过抑制 RACK1 脱磷酸化,抑制 HIF-1 α 表达,降低 HIF-1 α 蛋白水平,代表药物有环孢素等。⑤可溶性鸟苷酸环化酶抑制剂。如 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole 即 YC-1,能够有效抑制 HIF-1 α 表达,且能够抑制 VEGF 的表达,减弱血管化作用。

3.1.2.2 影响 HIF-1 α 蛋白稳定性的药物 热休克蛋白 90 (HSP90) 抑制剂。HSP90 是很多条件性激活或表达的信号蛋白 (如 HIF-1) 的分子伴侣,对其分子稳定性和功能发挥起重要作用。HSP90 抑制剂引起 HSP 结合的靶蛋白失活、失稳并最终被降解,其抗癌活性在临床前模型中已得到证实^[33]。其代表药物 17-AAG 已经完成了临床一期试验,二期试验正在进行中。

3.2 基因治疗 除了药物治疗外,在 HIF-1 α 转录水平实行靶向基因治疗也逐渐引起人们的重视。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 和反义 RNA (antisense RNA) 等都能在 mRNA 水平降低 HIF-1 α 表达。Ruan^[34] 把自杀基因 Bax 和反义 RNA 导入 HRE 的下游,在缺氧状态下转染了自杀基因质粒的细胞优先凋亡。另外可以通过利用反义 RNA 来抑制 HIF-1 的活性,利用 RNA 干扰配合放疗。

4 展望

HIF-1 作为一种核转录因子,在哺乳动物的生长发育、生理和病理反应过程中发挥重要的作用。HIF-1 活性的调节,可能是治疗很多疾病的切入点。HIF-1 的活性上调,可以提高细胞在低氧和局部缺血状况下的生存能力,增加缺氧组织的血管生成;相反,HIF-1 抑制剂则能够阻止血管生成,降低缺氧或炎症组织的存活能力。因此,HIF-1 抑制剂可广泛应用于治疗各种与 HIF-1 过表达相关的疾病。已有越来越多的研究将 HIF-1 α 用于生物治疗,如前列腺癌、恶性胶质细胞瘤、肺癌等多种肿瘤的靶点。利用上调 HIF-1 活性治疗急性心肌梗死、糖尿病、脑梗死等局部缺血 (缺氧) 性疾病的研究仍在进行中。尽管如此,对 HIF-1 α 的研究还远远不够,HIF-1 α 的

mRNA 与蛋白水平、蛋白合成间调控与稳定性以及活性调节相关机制还有待于进一步深入研究。

【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[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(12) : 5447-5454.
- [2] Duval E, Ieclercq S, Elisalde JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation; hypoxia not only induces type collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes [J]. *Arth Rheum*, 2009, 60(10) : 3038-3048.
- [3] Lee YK, Kim EJ, Lee JE, *et al.* Hypoxia induces connective tissue growth factor mRNA expression [J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24(Suppl) : S176-S182.
- [4] Li L, Madu CO, Lu A, *et al.* HIF-1 alpha promotes a hypoxia-independent cell migration[J]. *Open Biol J*, 2010, 3(1) : 8-14.
- [5] Uniacke J, Holterman CE, Lachance G, *et al.* An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery [J]. *Nature*, 2012, 486(7401) : 126-129.
- [6] Yoon D, Ponka P, Prchal JT. Hypoxia and hematopoiesis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(6) : C1215-C1223.
- [7] Saito T, Fukai A, Mabuchi A, *et al.* Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development [J]. *Nat Med*, 2010, 16(6) : 678-686.
- [8] Pelletier J, Dayan F, Durivault J, *et al.* The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis [J]. *Oncogene*, 2012, 31(24) : 2989-3001.
- [9] Glotzer DJ, Zelzer E, Olsen BR. Impaired skin and hair follicle development in Runx2 deficient mice [J]. *Dev Biol*, 2008, 315(2) : 459-473.
- [10] Yuan LB, Dong HL, Zhang HP, *et al.* Neuroprotective effect of orexin-A is mediated by an increase of hypoxia-inducible factor-1 activity in rat [J]. *Anesthesiology*, 2011, 114(2) : 340-354.
- [11] Du F, Wu XM, Gong Q, *et al.* Hyperthermia conditioned astrocyte-cultured medium protects neurons from ischemic injury by the up-regulation of HIF-1 alpha and the increased anti-apoptotic ability [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 666(1) : 19-26.
- [12] Eckle T, Kehler D, Lehmann R, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection; a new paradigm for ischemic preconditioning [J]. *Circulation*, 2008, 118(2) : 166-175.
- [13] Resar JR, Roguin A, Voner J, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 alpha polymorphism and coronary collaterals in patients with ischemic heart disease [J]. *Chest*, 2005, 128(2) : 787-791.
- [14] Rohwer N, Dame C, Haugstelter A, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF kappaB [J]. *PLOS One*, 2010, 5(8) : e12038-e12045.
- [15] Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, *et al.* Complete loss of ischemic preconditioning induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1alpha [J]. *Cardiovas Res*, 2008, 77(3) : 463-470.
- [16] Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors [J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(2) : 145-152.
- [17] Wang Y, Liu Y, Malek SN, *et al.* Targeting HIF-1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4) : 399-411.
- [18] Mak P, Leav I, Pursell B, *et al.* ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization; implications for Gleason grading [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(4) : 319-332.
- [19] Luo W, Hu H, Chang R, *et al.* Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Cell*, 2011, 145(5) : 732-744.
- [20] Semenza GL. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics [J]. *Oncogene*, 2010, 29(5) : 625-634.
- [21] Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling [J]. *Cardiovas Res*, 2010, 86(2) : 236-242.
- [22] Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2) : 294-309.
- [23] Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease [J]. *Respi Crit Care Med*, 2011, 183(2) : 152-156.
- [24] Gartner V, Eigentler TK. Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy [J]. *Clin Nephrol*, 2008, 70(1) : 1-9.
- [25] Sumual S, Saad S, Tang O, *et al.* Differential regulation of Snail by hypoxia and hyperglycemia in human proximal tubule cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(10) : 1689-1697.
- [26] Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008, 9(4) : 315-327.
- [27] Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, *et al.* Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: a possible role of HIF-1alpha expression and oxygen metabolism [J]. *Diabetes*, 2011, 60(3) : 981-992.
- [28] Leon GF, Jill TN. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics, progression of renal disease [J]. *Kidney Int*, 2008, 74(7) : 867-872.
- [29] Zhang H, Qian DZ, Tan YS, *et al.* Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 alpha synthesis and block tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50) : 19579-19586.
- [30] Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis [J]. *Nature*, 2012, 485(7396) : 55-61.
- [31] Wysocki PJ. mTOR in renal cell cancer: modulator of tumor biology and therapeutic target [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2009, 9(3) : 231-241.
- [32] Choi YJ, Rho JK, Lee SJ, *et al.* HIF-1alpha modulation by topoisomerase inhibitors in non-small cell lung cancer cell lines [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(8) : 1047-1053.
- [33] Kourtis N, Nikolettou V, Tavernarakis N. Small heat-shock proteins protect from heat-stroke-associated neurodegeneration [J]. *Nature*, 2012, 490(7419) : 213-218.
- [34] Ruan H, Wang J, Hu L, *et al.* Killing of brain tumor cells by hypoxia-responsive element mediated expression of BAX [J]. *Neoplasia*, 1999, 1(5) : 431-437.

[收稿日期] 2013-03-19 [修回日期] 2013-10-18
[本文编辑] 陈 静