

## 综述

# 低氧诱导因子-脯氨酸羟化酶轴在肾性贫血中的作用机制研究进展

曹婧媛, 刘必成\*

东南大学肾脏病研究所/东南大学附属中大医院肾脏科, 南京 210009

**摘要:** 肾性贫血是慢性肾脏病患者最常见的并发症之一, 主要由促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)缺乏和功能性铁缺乏(functional iron deficiency, FID)引起。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是体内参与细胞低氧应答的主要转录因子, 而氧依赖性的脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD)是HIF降解反应的限速酶, 可羟基化HIF的脯氨酸残基, 使HIF被蛋白酶体降解, 这就是HIF-PHD氧传感途径, 亦称HIF-PHD轴。贫血情况下组织缺氧, 通过调节HIF-PHD轴可刺激EPO生成、调节铁代谢等, 这已成为治疗肾性贫血的新方法。近年来, 几种作为选择性HIF-PHD抑制剂的创新药物被成功开发, 其中一些药物正在进行临床试验。本文就HIF-PHD轴的概念、调节机制及其在肾性贫血中的作用机制研究进展进行综述。

**关键词:** 低氧诱导因子; 脯氨酸羟化酶; 低氧诱导因子-脯氨酸羟化酶轴; 肾性贫血

**中图分类号:** R339.5; R692.5; R556

## Current insights into the role of HIF-PHD axis in renal anemia

CAO Jing-Yuan, LIU Bi-Cheng\*

*Institute of Nephrology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China*

**Abstract:** Renal anemia, mainly caused by the deficiencies of erythropoietin (EPO) and iron metabolism disorder, is one of the most common complications of chronic kidney disease. Hypoxia-inducible factor (HIF) is a class of transcription factors responsible for maintaining homeostasis during oxygen deprivation. In normoxia, HIF is degraded by prolyl hydroxylase (PHD). While under hypoxic conditions, the hydroxylation activity of PHD is inhibited, and the cellular concentration of HIF is elevated, resulting in an increase in endogenous EPO production and iron absorption. Therefore, this regulating pathway, also termed as the HIF-PHD axis, has become a promising therapeutic target of treating renal anemia. Several innovative drugs acting as selective HIF-PHD inhibitors have been successfully developed in the past years, and some of them are undergoing clinical trials. In this review, we will introduce the definition and regulatory mechanism of HIF-PHD axis, as well as current insights into its physiologic and therapeutic role in renal anemia.

**Key words:** hypoxia inducible factor; prolyl hydroxylase; hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase axis; renal anemia

肾性贫血是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者最常见的并发症之一, 严重影响慢性肾功能衰竭 (chronic renal failure, CRF) 患者的生活质量和远期预后。一般认为, 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 的绝对或相对缺乏是导致肾性贫血的最主要原因。近期研究显示, 铁代谢紊乱、铁调素生成增加及清除减少、叶酸及 B 族维生素缺乏、

感染、炎症等亦均与肾性贫血发生有关。目前, 临床上主要使用 EPO 类似物 [如红细胞生成刺激剂 (erythropoiesis-stimulating agents, ESAs)] 联合铁剂注射<sup>[1]</sup>、输血等来治疗肾性贫血。但 ESA 具有升高血压、增加脑卒中几率<sup>[1, 2]</sup>、促进肿瘤进展<sup>[3]</sup>、导致单纯红细胞再生障碍性贫血等风险, 因此, 寻找其它副作用少且给药方便的新药来治疗肾性贫血具

Received 2018-01-28 Accepted 2018-05-07

\*Corresponding author. Tel: +86-25-83262422; E-mail: liubc64@163.com

有十分重要的意义。

低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 是一种在低氧条件下被激活的转录因子, 是细胞参与低氧应答的主要介质, 其在生物体内的水平主要取决于降解的速度。脯氨酸羟化酶 (prolyl hydroxylase, PHD) 是 HIF 降解反应的限速酶, 可羟基化 HIF 的脯氨酸残基, 后者与 E3 泛素连接酶结合, 继而被蛋白酶体降解, 这就是 HIF-PHD 氧传感途径, 亦称 HIF-PHD 轴。在低氧条件下, HIF 能够激活一系列低氧相关基因, 使细胞和组织适应低氧应激环境。贫血情况下组织缺氧, 通过 HIF 刺激 EPO 产生增加、促进红细胞生成、调节铁代谢, 故药理学激活 HIF 或减少 HIF 降解有可能成为治疗肾性贫血的新方法。本文就 HIF-PHD 轴的概念、调节机制及其在肾性贫血中的作用研究进展进行综述。

## 1 HIF-PHD轴

### 1.1 HIF概述及生物学功能

1992年, Semenza 和 Wang 采用体外实验研究 EPO 基因时, 发现了一个在低氧状态下可上调 EPO 表达的转录因子, 命名为 HIF-1<sup>[4]</sup>。1995年, Wang 等在 Hep3B 细胞中使用离子交换和 DNA 亲和色谱法明确了其结构并证实其 cDNA 序列<sup>[5]</sup>。起初, HIF-1 被认为是低氧情况下唯一增加 EPO 表达的转录因子, 后来学者们又陆续发现了 HIF-2 和 HIF-3 具有相似的作用<sup>[6]</sup>。

功能性的 HIF 是由  $\alpha$  和  $\beta$  亚基组成的异源二聚体, 两亚基均属于螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix)-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) 家族。其中 HIF- $\alpha$  是功能亚基, 决定了 HIF 的生物学活性; HIF- $\beta$  是结构亚基, 在细胞内持续表达。HIF- $\alpha$  有三种亚型 (即 HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  和 HIF-3 $\alpha$ ), 三者结构极为相似, 但是各自功能仍有区别: HIF-1 $\alpha$  主要负责转录糖酵解相关酶和凋亡调节蛋白<sup>[7]</sup>; 而 HIF-2 $\alpha$  则负责调控 EPO、细胞周期相关因子、转化生长因子  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ) 等因子的转录。在成人体内, EPO 合成以及铁代谢主要由 HIF-2 $\alpha$  调控<sup>[8]</sup>。HIF-3 $\alpha$  的功能研究仍不清楚, 一般认为其可能对 HIF-1 $\alpha$ /2 $\alpha$  起负性调节作用<sup>[9]</sup>。

动物实验证实, HIF-1 $\alpha$  在几乎所有物种的肾脏细胞中表达, 而 HIF-2 $\alpha$  主要在管周成纤维细胞中表达, 该细胞亦是肾源性 EPO 合成的主要细胞, 亦称肾 EPO 生成细胞 (renal EPO-producing cell,

REPC)<sup>[10]</sup>。HIF-2 $\alpha$  基因敲除小鼠的红细胞数量、血红蛋白 (hemoglobin, Hb)、EPO 水平均明显下降<sup>[11]</sup>; Paliege 等研究显示肾皮质中成纤维细胞的 EPO 与 HIF-2 $\alpha$  共表达<sup>[12]</sup>, 这些研究均提示 HIF-2 $\alpha$  是调控低氧应激反应的关键因子。HIF 能够调节 100 余种靶基因的表达<sup>[13]</sup>, 从而使机体与组织细胞适应外周环境氧浓度的变化。受 HIF 直接调节的重要因子有 EPO、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1)、诱导型 NO 合酶 (inducible NO synthase, iNOS)、葡萄糖转运体 (glucose transporter, GLUT)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 和转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 等<sup>[14]</sup>。

### 1.2 HIF-PHD轴调节

如前所述, HIF 是哺乳动物应对低氧环境的最重要调节因子, 其在生物体内的水平主要取决于降解的速度。真核细胞内蛋白质的降解途径主要有两种: 溶酶体途径、泛素-蛋白酶体途径。HIF 通过泛素-蛋白酶体途径降解。HIF-PHD 轴是体内降解 HIF- $\alpha$  亚基的关键通路。

在常氧状态下, HIF- $\alpha$  亚基的脯氨酸残基可以迅速地被 PHD 所羟化, 进而被 von Hippel-Lindau (VHL) 抑癌蛋白识别, 通过泛素-蛋白酶体系统降解<sup>[15]</sup>。在低氧或某些特定条件下, 氧敏感的 PHD 羟化活性被抑制, 导致 HIF- $\alpha$  与 E3 泛素连接酶分离, HIF- $\alpha$  得以从胞浆进入细胞核内, 与 HIF- $\beta$  形成异源二聚体。在转录共激活因子的共同作用下, 该异源二聚体直接结合在靶基因的低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 上, 调节下游基因 (如 EPO 基因等) 的转录<sup>[16]</sup>, 以减轻低氧损伤 (图 1)。

PHD 被称为“氧传感器”<sup>[17]</sup>, 因为其活性严格依赖于氧浓度。PHD 是 Fe<sup>2+</sup>、2-酮戊二酸 (2-oxoglutaric acid, 2-OG) 依赖的双加氧酶超家族成员, 依赖于分子氧、Fe<sup>2+</sup> 和 2-OG 来催化靶蛋白羟化; 各亚型 PHD 的 C 端催化区高度同源, N 端则明显不同, 致其均具有催化 HIF- $\alpha$  特定脯氨酸残基羟化的活性, 但在亚细胞定位、底物选择、组织分布等方面存在显著差异<sup>[18]</sup>。

目前已知的 PHD 主要有 4 种亚型: PHD1、PHD2、PHD3 和 PHD4。4 种亚型 PHDs 的功能是不同的, 这主要取决于它们在细胞内定位、是否低氧可诱导及其生化特性。研究表明, PHD1 (44 kDa) 只存在

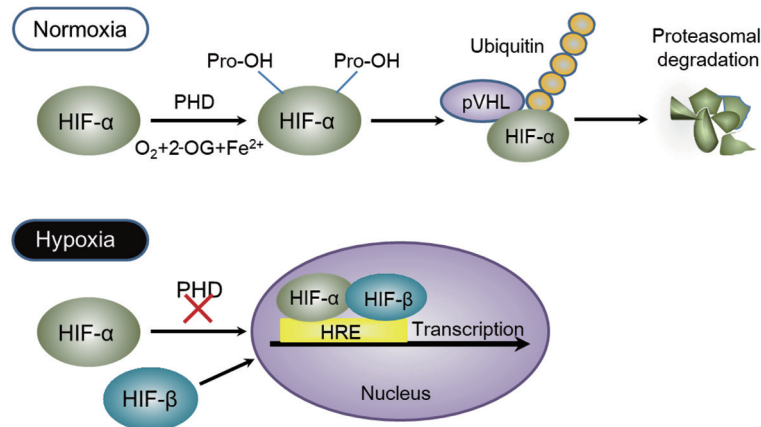


图 1. 低氧诱导因子-脯氨酸羟化酶(HIF-PHD)轴示意图

Fig. 1. Schematic diagram showing hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase (HIF-PHD) axis. Abbreviations: pVHL, von Hippel-Lindau protein; HRE, hypoxia response element.

于细胞核中，PHD2 (46 kDa) 主要存在于细胞质中，PHD3 (27.3 kDa) 则在细胞核与细胞质中均存在。PHD1 mRNA 在睾丸中高度表达，PHD2 mRNA 在各处均有表达，PHD3 mRNA 在心脏中表达水平较高<sup>[19]</sup>。PHD2 是 4 种 PHD 酶中最为重要的亚型，将其完全基因敲除后可致胚胎死亡，选择性基因敲除后动物可表现为 EPO 与 VEGF 表达增加、血管生成增多以及红细胞生成增多等<sup>[20]</sup>。在小鼠中抑制 PHD1、PHD3 的表达可上调 HIF-2 $\alpha$  在肝脏中的表达，部分敲除 PHD2 可同时促进 HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  表达增加<sup>[21]</sup>。关于 PHD4 的报道很少，PHD4 位于细胞内质网膜，活性位点在细胞管腔；PHD4 过表达可通过上调 TGF- $\alpha$  表达水平来抑制血管生成<sup>[22]</sup>。

在低氧条件或者 PHD 抑制剂 (PHD inhibitor, PHI) 存在时，PHD 催化活性减弱而引起 HIF- $\alpha$  稳定表达，可改善贫血，治疗组织缺血及组织损伤等疾病<sup>[15]</sup>。

## 2 调节HIF-PHD轴对肾性贫血的影响

HIF-PHD 轴通过影响 EPO 的合成、铁代谢及促进造血干细胞分化来改善肾性贫血 (图 2)。

### 2.1 调节HIF-PHD轴与EPO合成

EPO 主要由 REPC 合成，其通过结合骨髓中的红细胞前体细胞表面受体来介导红细胞成熟<sup>[10]</sup>。当肾脏损伤时，肾脏 REPC 不能分泌足够的 EPO 是 CKD 患者发生肾性贫血的主要原因。Gerl 等的研究证实，组织缺氧是机体产生 EPO 的主要刺激因素，

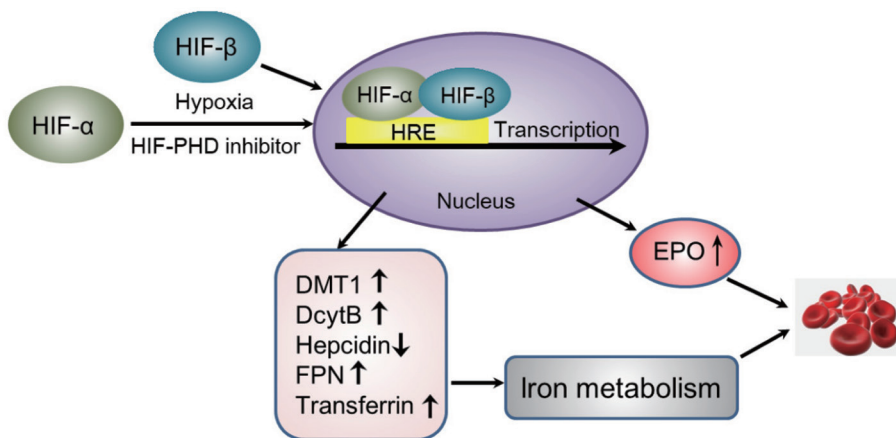


图 2. 调节低氧诱导因子-脯氨酸羟化酶(HIF-PHD)轴对肾性贫血的影响

Fig. 2. Schematic diagram showing that the regulation of hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase (HIF-PHD) axis can affect renal anemia. Abbreviations: HRE, hypoxia response element; EPO, erythropoietin; DMT1, divalent metal transporter 1; DcytB, duodenal cytochrome B; FPN, ferroportin.

在低氧情况下, 循环中 EPO 水平可增加 100 倍, 且 HIF 是调控这一低氧应激反应的主要转录因子<sup>[6]</sup>。

在常氧情况下, 仅少部分 REPC 合成 EPO; 而在低氧或者 PHI 存在时, HIF- $\alpha$  亚基可与 HIF- $\beta$  亚基直接结合并进入细胞核内, 与 EPO 增强子序列 (5'-TACGTGCT-3') 结合, 促使更多的 REPC 合成 EPO<sup>[23]</sup>, 从而促进 Hb 合成。在临床上, 轻度到中度的 HIF-PHD 轴调节即可导致红细胞增多<sup>[24]</sup>, 因此药理学激活 HIF 可以成为治疗肾性贫血的新策略。目前研究较多的是 PHI。PHI 通过与包含 Fe<sup>2+</sup> 的激活位点结合, 抑制 2-OG 共底物, 进而抑制 PHD 催化活性, 通过 HIF-PHD 轴调节, 模拟体内缺氧状态, 抑制 HIF- $\alpha$  降解, 从而稳定和提高了 HIF- $\alpha$  浓度; HIF- $\alpha$  浓度升高后, 跨膜进入细胞核内, 与 HIF- $\beta$  形成二聚体, 再激活 HRE, 从而促进包括 EPO 等在内的一系列基因表达, 协调一致地促进机体造血<sup>[13]</sup>。

## 2.2 调节 HIF-PHD 轴与铁代谢

铁是 Hb 的重要组分, 铁剂常和 EPO 联合应用于肾性贫血的治疗<sup>[1]</sup>。铁的吸收主要有两条途径: 巨噬细胞吞噬衰老红细胞; 十二指肠上皮细胞从食物中摄取。铁吸收过程需要肠上皮细胞膜上的十二指肠细胞色素 B (duodenal cytochrome B, DcytB)、二价金属转运体 (divalent metal transporter 1, DMT1)、HO-1、膜铁转运蛋白 (ferroportin, FPN) 等的参与。其中, DcytB 可以使肠道的 Fe<sup>3+</sup> 转化为 Fe<sup>2+</sup>, DMT1 主要负责将 Fe<sup>2+</sup> 转运至细胞内, HO-1 则可直接将血红素转化为铁供细胞利用。FPN 是迄今为止发现的唯一的细胞铁输出蛋白, 参与细胞内铁向血浆转运, 使铁在循环中结合转铁蛋白, 最终进入骨髓用于 Hb 合成。FPN 可以被铁调素 (hepcidin) 降解<sup>[25]</sup>。

铁调素是一种肝细胞分泌的由 25 个氨基酸残基组成的小分子活性肽激素<sup>[26]</sup>, 它可与细胞表面的 FPN 结合, 形成 Hecpudin-FPN 复合物, 诱导 FPN 的泛素化及降解, 从而抑制肠道铁的吸收以及机体储备铁的释放。因此, 铁调素是铁吸收、转运过程的核心调控分子。CKD 及相关的炎症均可引起铁调素水平升高, 从而导致肾性贫血<sup>[27, 28]</sup>。

研究表明, HIF-PHD 轴与铁代谢调节密切相关。一方面, HIF-2 $\alpha$  在铁的摄取中发挥重要作用, 在铁缺乏动物模型中, 它可以增加 DMT1 和 DcytB 基因转录<sup>[29]</sup>。铁缺乏时, 铁依赖的 PHD 活性下降, 导致 HIF-2 $\alpha$  产生增多<sup>[30]</sup>。铁浓度的急剧变化通过

HIF-2 $\alpha$  上调 FPN1 mRNA 表达, 从而促进细胞内铁转运至血浆中<sup>[31]</sup>。HIF 还可通过调节转铁蛋白、转铁蛋白受体、血浆铜蓝蛋白、HO-1、FPN 等来调节铁代谢<sup>[23]</sup>。

另一方面, HIF 可通过多种途径抑制铁调素的表达以增加循环铁含量, 其主要是通过 HIF-2 $\alpha$  上调 EPO 表达来抑制铁调素表达; 但有趣的是, Oshima 等的研究显示, 铁剂亦可在体外和体内实验中通过氧化应激依赖的 HIF-2 $\alpha$  失活来抑制 EPO 的表达<sup>[32]</sup>。此外, 体外细胞研究显示 HIF-1 $\alpha$  可将铁调素调节蛋白 (hemojuvelin, HJV) 剪切成可溶性片段, 竞争性结合骨形态发生蛋白 6 (bone morphogenetic protein 6, BMP6), 直接阻断下游铁调素的转录通路<sup>[33]</sup>; HIF-1 $\alpha$  还可通过刺激 EPO、生长分化因子 15 (growth differentiation factor 15, GDF15)、跨膜丝氨酸蛋白酶 6 (transmembrane protease, serine 6, TMPRSS6) 的表达抑制铁调素<sup>[34]</sup>。

## 2.3 调节 HIF-PHD 轴与造血干细胞

Takubo 等在 HIF-1 $\alpha$  基因敲除或过表达小鼠上的研究显示, HIF-1 $\alpha$  在造血干细胞的细胞周期调节中起重要作用<sup>[35]</sup>, 精确调节 HIF-1 $\alpha$  水平可维持造血干细胞的细胞周期静止。造血干细胞一般在骨髓中处于静止状态, 但其具有分化成造血祖细胞的潜能。当出现失血等特殊情况下, 造血干细胞可以迅速分化产生红细胞<sup>[36]</sup>。体内实验证实, PHI 可通过稳定 HIF-1 $\alpha$  来调节骨髓干细胞, 从而刺激造血。值得关注的是, 该过程不依赖于 EPO<sup>[36]</sup>。由此可见, 相较于 ESA, HIF-PHI 轴还可能通过其他途径来提高 Hb 水平。

## 3 HIF-PHD 轴调节在肾性贫血治疗中的意义

综上所述, HIF-PHD 轴有可能成为肾性贫血治疗的新靶点。HIF 稳定剂 (主要是 PHI) 是目前研究的热点, 口服的 PHI 已经被证实可以促进贫血患者的内源性 EPO 生成和改善患者的 Hb 水平<sup>[37]</sup>。

目前根据 PHI 的作用机制不同, 将 PHI 分为亚铁离子竞争性 PHI、亚铁离子螯合型 PHI、脯氨酸衍生物 PHI、2-OG 类似物 PHI、喹啉类及其类似物、吡啶类及其类似物和不含 2-OG 的 PHI 等。其中 Roxadustat (FG-4592)<sup>[38, 39]</sup>、Vadadustat (AKB-6548)<sup>[40]</sup>、Daprodustat (GSK1278863)<sup>[41, 42]</sup>、Molidustat (BAY 85-3934)<sup>[43]</sup> 均已进入 II 期或 III 期临床试验阶段。

这些临床试验以非透析的慢性肾脏病 (nondialysis-

dependent chronic kidney disease, NDD-CKD)、血液透析 (hemodialysis, HD) 或腹膜透析 (peritoneal dialysis, PD) 患者为研究对象。Besarab 等通过开放、随机对照的 IIb 期临床试验探讨了 FG-4592 对改善 HD 患者贫血的影响, 结果显示即使不使用铁剂, FG-4592 亦能明显改善患者贫血 (95.7% 患者 Hb 升高幅度  $\geq 1$  g/dL), 这提示 FG-4592 改善 CKD 患者贫血, 不需要再补充铁剂<sup>[44]</sup>。而另一项以 145 例 NDD-CKD 3~4 期贫血患者为研究对象的多中心、开放、随机对照 IIb 期临床试验结果显示, FG-4592 可明显改善 92% 的患者贫血状况, 并且能明显降低血清铁调素和总胆固醇; 该研究还显示, 服用 FG-4592 引起的 Hb 升高不受患者炎症 (C-反应蛋白) 和铁代谢相关指标的影响<sup>[38]</sup>。

综上所述, PHI 改善 CKD 患者肾性贫血有多方面的优点, 如促进内源性 EPO 产生、不受铁代谢异常和机体炎症状态的影响、对血压没有明显影响、可以降低胆固醇、可以口服等, 因此 PHI 可能显著克服现有 ESAs 使用过程中的一些局限性。当然, PHI 在治疗肾性贫血中也有一些潜在的问题值得重视<sup>[45]</sup>。例如, HIF 可能参与血管紧张素调节, 促进肺动脉高压的发生<sup>[46]</sup>; 另外, VEGF 是受 HIF 调节的重要细胞因子, 其在促进血管的发生和肿瘤转移中具有重要作用<sup>[47]</sup>, PHI 的长期应用对肿瘤患者是否会产生影响, 值得关注。

#### 4 展望

HIF-PHD 轴是体内重要的氧依赖调节系统, 大量研究表明, 它们与低氧情况下机体的适应性反应有密切关系。机体缺氧或某些药物可通过调节 HIF-PHD 轴起到上调 EPO 基因表达、促进肠道对铁的摄取、下调铁调素、促进造血干细胞分化等作用来纠正贫血, 且这些过程不受炎症反应等的影响, 故 HIF-PHD 轴极有可能成为肾性贫血治疗的新靶点。目前, 基于 HIF-PHD 轴调节开发的 PHI 药物已完成 II 期临床试验, III 期临床试验正在进行。相信随着这些临床试验的完成, PHI 将会成为肾性贫血新的治疗手段。

\*                      \*                      \*

**致谢:** 本综述受国家自然科学基金 (No. 81470997, 81670696, 81720108007) 和江苏省医学科技支撑计划 (No. BL2014080) 资助。

#### 参考文献

- Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355(20): 2085–2098.
- Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, Feyzi JM, Ivanovich P, Kewalramani R, Levey AS, Lewis EF, McGill JB, McMurray JJ, Parfrey P, Parving HH, Remuzzi G, Singh AK, Solomon SD, Toto R; TREAT Investigators. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2009; 361(21): 2019–2032.
- Aapro M, Jelkmann W, Constantinescu SN, Leyland-Jones B. Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *Br J Cancer* 2012; 106(7): 1249–1258.
- 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.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5510–5514.
- Gerl K, Miquerol L, Todorov VT, Hugo CP, Adams RH, Kurtz A, Kurt B. Inducible glomerular erythropoietin production in the adult kidney. *Kidney Int* 2015; 88(6): 1345–1355.
- Wu Y, Jiang Z, You Q, Zhang X. Application of *in-vitro* screening methods on hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2017; 25(15): 3891–3899.
- Bonomini M, Del Vecchio L, Sirolli V, Locatelli F. New treatment approaches for the anemia of CKD. *Am J Kidney Dis* 2016; 67(1): 133–142.
- Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: complexities and emerging themes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310(4): C260–C269.
- Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen J, Wiesener M, Hörstrup J, Frei U, Ratcliffe P, Maxwell P, Bachmann S, Eckardt K. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and -2 $\alpha$  in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7): 1721–1732.
- Gruber M, Hu CJ, Johnson RS, Brown EJ, Keith B, Simon MC. Acute postnatal ablation of *Hif-2 $\alpha$*  results in anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(7): 2301–2306.
- Paliege A, Rosenberger C, Bondke A, Sciesielski L, Shina A, Heyman SN, Flippin LA, Arend M, Klaus SJ, Bachmann S.

- Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. *Kidney Int* 2010; 77(4): 312–318.
- 13 Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(2): F271–F281.
- 14 Chen SY, Sang NL. Hypoxia-inducible factor-1: a critical player in the survival strategy of stressed cells. *J Cell Biochem* 2016; 117(2): 267–278.
- 15 Chan MC, Holt-Martyn JP, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Pharmacological targeting of the HIF hydroxylases--A new field in medicine development. *Mol Aspects Med* 2016; 47–48: 54–75.
- 16 Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *EMBO J* 1998; 17(22): 6573–6586.
- 17 Fraisl P, Aragonés J, Carmeliet P. Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(2): 139–152.
- 18 Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 2008; 30(4): 393–402.
- 19 Higashijima Y, Tanaka T, Nangaku M. Structure-based drug design for hypoxia-inducible factor prolyl-hydroxylase inhibitors and its therapeutic potential for the treatment of erythropoiesis-stimulating agent-resistant anemia: raising expectations for exploratory clinical trials. *Expert Opin Drug Discov* 2013; 8(8): 965–976.
- 20 Takeda K, Cowan A, Fong GH. Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation* 2007; 116(7): 774–781.
- 21 Minamishima YA, Moslehi J, Bardeesy N, Cullen D, Bronson RT, Kaelin WG Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure. *Blood* 2008; 111(6): 3236–3244.
- 22 Klotzsche-von Ameln A, Prade I, Grosser M, Kettelhake A, Rezaei M, Chavakis T, Flamme I, Wielockx B, Breier G. PHD4 stimulates tumor angiogenesis in osteosarcoma cells via TGF- $\alpha$ . *Mol Cancer Res* 2013; 11(11): 1337–1348.
- 23 Koury MJ, Haase VH. Anaemia in kidney disease: harnessing hypoxia responses for therapy. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11(7): 394–410.
- 24 Haase VH. Oxygen-dependent Regulation of Erythropoiesis. New York: Humana Press, 2011.
- 25 Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274(34): 24147–24152.
- 26 Atkinson MA, Warady BA. Anemia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2018; 33(2): 227–238.
- 27 Ashby DR, Gale DP, Busbridge M, Murphy KG, Duncan ND, Cairns TD, Taube DH, Bloom SR, Tam FW, Chapman RS, Maxwell PH, Choi P. Plasma hepcidin levels are elevated but responsive to erythropoietin therapy in renal disease. *Kidney Int* 2009; 75(9): 976–981.
- 28 Zumbrennen-Bullough K, Babitt JL. The iron cycle in chronic kidney disease (CKD): from genetics and experimental models to CKD patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29(2): 263–273.
- 29 Taylor M, Qu A, Anderson ER, Matsubara T, Martin A, Gonzalez FJ, Shah YM. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  mediates the adaptive increase of intestinal ferroportin during iron deficiency in mice. *Gastroenterology* 2011; 140(7): 2044–2055.
- 30 Ramakrishnan SK, Shah YM. Role of intestinal HIF-2 $\alpha$  in health and disease. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 301–325.
- 31 Xu M, Wang J, Xie J. Regulation of iron metabolism by hypoxia-inducible factors. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2017; 69(5): 598–610.
- 32 Oshima K, Ikeda Y, Horinouchi Y, Watanabe H, Hamano H, Kihira Y, Kishi S, Izawa-Ishizawa Y, Miyamoto L, Hirayama T, Nagasawa H, Ishizawa K, Tsuchiya K, Tamaki T. Iron suppresses erythropoietin expression via oxidative stress-dependent hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  inactivation. *Lab Invest* 2017; 97(5): 555–566.
- 33 Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood* 2008; 111(2): 924–931.
- 34 Song HJ, Yin DL, Liu ZH. GDF-15 promotes angiogenesis through modulating p53/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway in hypoxic human umbilical vein endothelial cells. *Mol Biol Rep* 2012; 39(4): 4017–4022.
- 35 Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 391–402.
- 36 Forristal CE, Winkler IG, Nowlan B, Barbier V, Walkinshaw G, Levesque JP. Pharmacologic stabilization of HIF-1 $\alpha$  increases hematopoietic stem cell quiescence *in vivo* and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* 2013; 121(5): 759–769.
- 37 Maxwell PH, Eckardt KU. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(3): 157–168.
- 38 Provenzano R, Besarab A, Sun CH, Diamond SA, Durham JH, Cangiano JL, Aiello JR, Novak JE, Lee T, Leong R,

- Roberts BK, Saikali KG, Hemmerich S, Szczech LA, Yu KH, Neff TB. Oral hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor roxadustat (FG-4592) for the treatment of anemia in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11(6): 982–991.
- 39 Provenzano R, Besarab A, Wright S, Dua S, Zeig S, Nguyen P, Poole L, Saikali KG, Saha G, Hemmerich S, Szczech L, Yu KH, Neff TB. Roxadustat (FG-4592) versus epoetin alfa for anemia in patients receiving maintenance hemodialysis: a phase 2, randomized, 6- to 19-week, open-label, active-comparator, dose-ranging, safety and exploratory efficacy study. *Am J Kidney Dis* 2016; 67(6): 912–924.
- 40 Martin ER, Smith MT, Maroni BJ, Zuraw QC, deGoma EM. Clinical trial of vadadustat in patients with anemia secondary to stage 3 or 4 chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2017; 45(5): 380–388.
- 41 Akizawa T, Tsubakihara Y, Nangaku M, Endo Y, Nakajima H, Kohno T, Imai Y, Kawase N, Hara K, Lepore J, Cobitz A. Effects of daprodustat, a novel hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor on anemia management in Japanese hemodialysis subjects. *Am J Nephrol* 2017; 45(2): 127–135.
- 42 Holdstock L, Meadowcroft AM, Maier R, Johnson BM, Jones D, Rastogi A, Zeig S, Lepore JJ, Cobitz AR. Four-week studies of oral hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor GSK1278863 for treatment of anemia. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(4): 1234–1244.
- 43 Beck H, Jeske M, Thede K, Stoll F, Flamme I, Akbaba M, Erguden JK, Karig G, Keldenich J, Oehme F, Militzer HC, Hartung IV, Thuss U. Discovery of molidustat (BAY 85-3934): a small-molecule oral HIF-prolyl hydroxylase (HIF-PH) inhibitor for the treatment of renal anemia. *Chem Med Chem* 2018; 13(10): 988–1003.
- 44 Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, Chan DT, Leong R, Poole L, Zhong M, Saikali KG, Franco M, Hemmerich S, Yu KH, Neff TB. Roxadustat (FG-4592): correction of anemia in incident dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(4): 1225–1233.
- 45 Haase VH. Therapeutic targeting of the HIF oxygen-sensing pathway: Lessons learned from clinical studies. *Exp Cell Res* 2017; 356(2): 160–165.
- 46 Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148(3): 399–408.
- 47 Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 2011; 12(1): 9–22.