

遗传性红细胞增多症相关HIF2 α 基因点突变对人CD34+造血干祖细胞体外红系分化的影响

赵慧娟 王文天 李园 魏晓晶 杨洋 牛琳 段永娟 胡晓*

(中国医学科学院北京协和医学院血液病医院, 血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

摘要 该文旨在研究与遗传性红细胞增多症相关的低氧诱导因子HIF2 α 基因点突变对人造血干祖细胞红系分化的影响。通过构建人HIF2 α 基因编码区、携带疾病相关的两个点突变体(M535V和G537R)以及文献中报道的HIF2 α 基因阳性对照突变(P531A)慢病毒表达载体, 分别包装病毒并感染人脐血来源的CD34+造血干祖细胞, 并进行常氧及5%低氧条件下的红系定向诱导分化培养。利用FACS流式分析比较红系分化进程特征分子CD71和CD235a的表达变化, 结合荧光定量PCR检测HIF2 α 调控的红系分化相关的靶基因表达水平。结果显示, 构建的HIF2 α 及突变体的慢病毒载体经病毒包装后感染K562细胞可在RNA和蛋白水平实现过表达; 与对照组相比, 感染表达HIF2 α 基因或其突变体病毒后的脐血CD34+HSPC在常氧及5% O₂条件下诱导红系分化培养的细胞CD71和CD235a的表达动态均无明显改变, 但HIF调控的红系分化相关基因EPOR和VEGFA的表达水平有一定升高。综上, 在体外红系分化培养体系中, 慢病毒介导的HIF2 α 及突变体的过表达不直接影响造血干祖细胞的红系分化进程, 提示疾病相关的HIF2 α 基因突变造成的红系分化异常增多的细胞内外调控机制需要更进一步的深入研究。

关键词 遗传性红系增多症; HIF2 α 基因及突变体; 低氧应答通路; 体外红系分化; EPO/EPOR

Effects of Congenital Erythrocytosis Related HIF2 α Mutants on *In Vitro* Erythroid Differentiation of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

Zhao Huijuan, Wang Wentian, Li Yuan, Wei Xiaojing, Yang Yang, Niu Lin, Duan Yongjuan, Hu Xiao*

(State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

Abstract The direct effects of congenital erythrocytosis related hypoxia-inducible factor HIF2 α mutations on erythroid differentiation of human hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) is not clear yet, to investigate this question, we have constructed the lentiviral vectors of human HIF2 α CDS and two disease related HIF2 α mutants, M535V and G537R, and a reported HIF2 α gain of function mutant P531A. The umbilical cord blood-derived HSPCs were infected with lentivirus carrying different HIF2 α genes and induced into erythroid differentiation under 21% O₂ and 5% O₂ culture condition respectively. The progression of erythroid differentiation was measured by the expression of CD71 and CD235a via FACS. The results demonstrated that lentiviral vectors for HIF2 α and

收稿日期: 2018-05-17

接受日期: 2018-06-13

国家自然科学基金(批准号: 81170459、81500084)和国家重大新药创制项目(批准号: 2017ZX09304024)资助的课题

*通讯作者。Tel: 022-2399401, E-mail: xiaohu@ihcams.ac.cn

Received: May 17, 2018

Accepted: June 13, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170459, 81500084) and National Major Scientific and Technological Special Project for "Significant New Drugs Development" (Grant No.2017ZX09304024)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23909401, E-mail: xiaohu@ihcams.ac.cn

网络出版时间: 2018-08-24 10:52:25

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180824.1052.012.html>

individual mutants were successfully constructed, forced expression of *HIF2 α* and its mutants in the CD34+ HSPCs had no detectable effect on the progression of *in vitro* erythroid differentiation. On the other hand, the expression of *HIF2 α* downstream genes, such as *EPOR* and *VEGFA*, was increased modestly. We concluded that forced expression of *HIF2 α* and the erythrocytosis related mutants does not directly enhancing *in vitro* erythroid differentiation, the cellular and molecular mechanisms resulting in overproducing erythroid cells in the patients require further systematic research.

Keywords erythrocytosis; *HIF2 α* gene and mutants; HIF pathway; *in vitro* erythroid differentiation; EPO/EPOR

低氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)是生物体缺氧应激的重要转录因子,属于 β 碱性螺旋环螺旋(BHLH-PAS)转录因子超家族,由 α 和 β 两个亚基构成同源二聚体来发挥功能。其中, β 亚基在细胞核内稳定表达; α 亚基由HIF1 α 、HIF2 α 及HIF3 α 这3个家族成员组成,其蛋白水平受氧浓度严格调控。在常氧条件下,位于 α 亚基氧依赖降解区(oxygen-dependent degradation, ODD)的脯氨酸(在HIF1 α 为第402和564,在HIF2 α 为第405和531位脯氨酸)被脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain protein, PHDs, 主要是PHD2)羟基化,进而被下游E3泛素连接酶(von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein, VHL)识别并进行泛素依赖的蛋白质降解。在低氧条件下,PHD酶活性受阻,使得 α 蛋白稳定表达,进而与细胞核内稳定表达的 β 亚基组成二聚体,识别靶基因编码序列上的低氧应答元件(hypoxia response element, HRE),激活下游靶基因,调控细胞对氧的应答。

自2008年以来,在一些无*JAK2*、*PHD2*、*VHL*等基因突变的遗传性红细胞增多症(congenital erythrocytosis)患者体内相继发现位于*HIF2 α* 的外显子区的多个点突变,这些突变主要集中在*HIF2 α* 基因的第12个外显子区,造成第374^[1]、535^[2-3]、537^[4-5]位等氨基酸的变异。Frank团队^[5-6]利用小鼠模型发现,靠近第531位脯氨酸的氨基酸突变(G536W)阻止了PHD2对HIF2 α 羟基化作用,从而影响VHL与HIF2 α 的结合,阻滞HIF2 α 蛋白的降解;进一步的研究表明,突变的HIF2 α 同样具有激活基因的功能。到目前为止,在*HIF1 α* 或*HIF3 α* 基因中尚未发现与红细胞增多症相关的突变位点。

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是调控机体红系生成的关键细胞因子,也是HIF(主要是HIF2)转录调控的靶基因^[7-8]。现有研究认为,*HIF2 α* 突变引起的红系增多症主要是由于肾脏、肝脏中*EPO*基因的

持续激活表达所导致^[8]。然而,2013年Perrotta等^[9]发现,携带*HIF2 α* 突变的红细胞增多症患者体内检测到的EPO水平处于正常范围内,而患者外周血祖细胞中其他HIF下游靶基因如*VEGF*^[10]、*TfRC*^[11]的表达均显著升高;且体外培养的条件下,细胞增殖速度加快,培养基中VEGF以及可溶性TfRC的水平均明显高于正常人^[9]。由此提示,*HIF2 α* 突变引起的红系增多可能存在不依赖系统性EPO高表达的调控机制。

在本研究中,我们利用慢病毒表达载体携带相关*HIF2 α* 点突变基因,研究突变对CD34+造血干祖细胞(hematopoietic stem/progenitor cells, HSPCs)自身的红系分化功能是否有影响。由于体内HSPCs处于氧浓度较低(0~5%)的生理低氧环境中^[12],因此,本实验设置在21% O₂和5% O₂两种氧浓度下进行红系诱导分化,通过检测红系分化进程中特征性细胞表面CD71+和CD235a分子的表达变化以及HIF通路调控的红系分化相关基因的表达,来研究*HIF2 α* 基因点突变对HSPCs红系分化功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

慢病毒表达载体pCEP及病毒包装质粒pLP1、pLP2、pLP/VSVG均从Addgene公司(美国)购买并由本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司。

PCR试剂购自TaKaRa公司。限制性内切酶、T4连接酶购自NEB公司。质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。胶回收试剂盒购自OMEGA公司。细胞转染用试剂Lipofectamine 2000、逆转录试剂盒、TRIzol、带有ROX的Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG为Invitrogen公司产品。胎牛血清、RPMI1640培养基购自Gibco公司。ACTB抗体购自Bio-Rad公司。HIF2 α 抗体购自CST公司。辣

根过氧化物酶标记的二抗购自Jackson ImmunoResearch Laboratories公司。ECL发光液购自威格拉斯生物技术有限公司。PE-Cy7标记的CD71抗体、APC标记的CD235a抗体购自ebioScience公司。寡聚核苷酸引物合成和DNA测序由华大基因股份有限公司提供服务。HEK 293T、K562白血病细胞株由中国医学科学院血液学研究所细胞库提供。胎儿脐带血采集获得血液学研究所伦理委员会批准并经本人签订知情同意协议后自正常健康分娩的产妇收集(天津中心妇产医院)。CD34分选磁珠购自Miltenyi公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒表达载体的构建及鉴定 从GenBank中得到HIF2 α 的mRNA序列(NM-001430.4),设计克隆引物,上下游引物分别引入限制性内切酶Xba I和Not I识别位点。经Primer Premier 5.0确定被扩增区域内无其他相同的酶切位点。引物具体序列如下。上游引物F: 5'-GGG CCC TCT AGA GCC ACC ATG ACA GCT GAC AAG GAG AA-3';下游引物R: 5'-CCC GGG GCG GCC GCT CAG GTG GCC TGG TCC AGG G-3'。以HEK 293T cDNA为模板进行PCR扩增,扩增条件为: 94 °C预变性1 min; 94 °C变性1 min, 60 °C退火40 s, 72 °C延伸4 min, 35个循环; 72 °C延伸5 min。

PCR产物纯化后与pCEP载体进行Xba I/Not I双酶切。酶切产物纯化后用T4 DNA连接酶进行连接反应。连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态。进行初步菌液PCR鉴定,选取阳性克隆送华大基因股份有限公司测序。测序成功后进行质粒提取。

构建HIF2 α 的3个突变体。设计含有突变位点的中间引物,引物合成序列见表1。

构建突变体的策略如图1A所示。以测序正确的HIF2 α 质粒为模板,分别以HIF2 α 的上游引物F和

各突变体Inseq-R以及HIF2 α 的下游引物和各突变体Inseq-F合成突变体的上下游两个片段(Fra1和Fra2);利用搭桥PCR扩增出HIF2 α 的3个突变体的全长,必要时胶回收2.6 Kb的片段,将获得的突变体全长克隆至pCEP载体上,测序并提质粒。

1.2.2 慢病毒包装 将HIF2 α 及其突变体表达质粒和慢病毒包装质粒共转染细胞汇合度达到90%以上的HEK 293T细胞。转染8 h后换成新鲜的DMEM培养基(含10% FBS、1% Glutamax和1%双抗)。分别收取换液后24、48、72 h的病毒上清,4 °C、20 000 r/min离心2 h以浓缩病毒,弃上清,300~500 μ L PBS重悬病毒,-80 °C保存。

1.2.3 慢病毒感染K562细胞 K562细胞用RMI 1640培养液(含10% FBS、1% Glutamax和1%双抗)于37 °C、5% CO₂条件下培养。感染前铺6孔板,每孔细胞 1×10^6 ,加入新鲜的浓缩病毒。感染48~72 h后加终浓度为2 μ g/mL的嘌呤霉素(Puro)筛选3天,观察空白组细胞全部死亡判定Puro筛选彻底,此时撤去实验组Puro,得到病毒感染阳性细胞。

1.2.4 脐血来源的造血干祖细胞分离及病毒感染 脐带血经密度梯度离心获得单个核细胞,按照Miltenyi CD34 MicroBead Kit说明书进行CD34+造血干祖细胞的分离。CD34+细胞先用Stemspan无血清培养基并分别添加终浓度为40 ng/mL的SCF、Flt-3L和TPO细胞因子培养4天后进行慢病毒感染,感染60 h后加终浓度为0.5 μ g/mL的Puro进行筛选。细胞由扩增体系转入体外红系分化体系时记为E0D,细胞分别置于常氧及5% O₂进行红系诱导分化。体外红系诱导分化培养体系为Stemspan培养基添加因子SCF(20 ng/mL)、Flt-3L(20 ng/mL)、IL-3(5 ng/mL)、EPO(5 ng/mL)。

1.2.5 qRT-PCR检测细胞基因表达 TRIzol法提

表1 三种突变体PCR引物序列

Table 1 PCR primers of the three variants

名称 Name	中间上游引物(5'→3') Inseq-F (5'→3')	中间下游引物(5'→3') Inseq-R (5'→3')
P531A	GAC TTG GAG ACA CTG GCA <u>GCC</u> TAT ATC CCC ATG GAC GGG	CCC GTC CAT GGG GAT ATA GGC TGC CAG TGT CTC CAA GTC
M535V	CTG GCA CCC TAT ATC CCC <u>GTG</u> GAC GGG GAA GAC TTC CAG	CTG GAA GTC TTC CCC GTC CAC GGG GAT ATA GGG TGC CAG
G537R	CCC TAT ATC CCC ATG GAC <u>AGG</u> GAA GAC TTC CAG CTA AGC	GCT TAG CTG GAA GTC TTC CCT GTC CAT GGG GAT ATA GGG

“▲”标出位点为突变碱基。

The bases underlined with “▲” demonstrated the mutant points.

取细胞总RNA。以Oligo dT为引物, M-MLV反转录酶合成cDNA, 用Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG试剂盒通过qRT-PCR扩增目的基因。以 β -actin表达水平作为内部参照, 用基因相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算各组基因相对表达倍数, 每个基因做3个复孔, 取平均值。PCR反应条件为: 95 °C预变性10 min, 95 °C变性15 s, 60 °C退火1 min, 40次循环。PCR引物序列如下。内参 β -actin的上游引物序列为: 5'-CAC CCA GCA CAA TGA AGA TC-3'; 下游引物序列为: 5'-GTC ATA GTC CGC CTA GAA GC-3'。HIF2 α 上游引物为: 5'-GGG AGA ACA GCA AGA GCA G-3'; 下游引物为: 5'-GGC AGC AGG TAG GAC TCA A-3'。TfRC上游引物为: 5'-GAG GTA CAA CAG CCA ACT GCT T-3'; 下游引物为: 5'-TCT GGA AGT AGC ACG GAA GAA G-3'。VEGFA上游引物为: 5'-TCA CCA AGG CCA GCA CAT-3'; 下游引物为: 5'-CGC TCC AGG ACT TAT ACC G-3'。EPOR上游引物为: 5'-TCA TCC TCG TGG TCA TCC TG-3', 下游引物为: 5'-GGC AGC CAT CAT TCT GGT AC-3'。

1.2.6 Western blot检测蛋白表达水平 将收集的

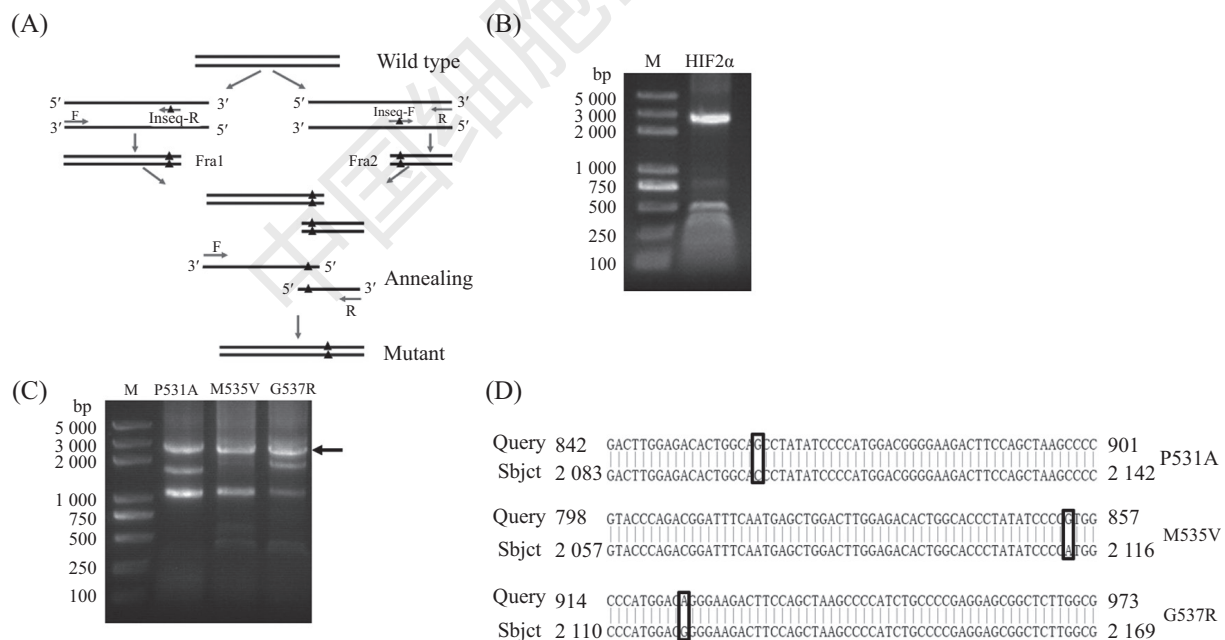
细胞加入RIPA进行细胞裂解, 100 °C处理5 min后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。采用半干转法将蛋白转至PVDF膜。以2% BSA封闭2 h, 加入1:1 000稀释的兔抗人HIF2 α 一抗, 4 °C孵育过夜, 洗膜后加入HRP标记的小鼠抗兔的二抗(1:2 000), 室温孵育2 h。荧光/化学发光成像分析仪自动曝光。

1.2.7 流式细胞术检测红系分化细胞表面分子标志 造血干祖细胞置于红系诱导分化体系中培养。分化培养过程中, 每间隔1天收集大约 1×10^5 细胞, 利用CD71和CD235a的抗体标记细胞并利用流式细胞仪进行检测。各组细胞数量一致并控制在 1×10^5 以内。加PBS清洗1遍, 弃上清。加入预混有CD71和CD235a抗体(各1 μ L)的PBS约30 μ L, 室温避光孵育30 min。加PBS清洗, FACS进行数据采集, 利用Flowjo 10软件分析分化进程细胞表达CD71和CD235a的百分比。

2 结果

2.1 人HIF2 α CDS及其点突变体慢病毒表达载体的构建

构建人HIF2 α 及包含点突变CDS序列的流程如图1A所示。从GenBank中查询HIF2 α 的mRNA序列



A: 搭桥PCR获得突变体全长的流程图; B: PCR扩增目的片段HIF2 α cDNA; C: 搭桥PCR获得突变体P531A、M535V和G537R的全长片段; D: 突变体表达载体测序结果(方框表示突变位点)。

A: the strategy of constructing the HIF2 α mutants through overlap extension PCR (the triangles demonstrate the mutant points); B: PCR result of amplification HIF2 α CDS from cDNA library of 293T cell; C: successfully annealed full length fragments of three variants (P531A, M535V and G537R); D: sequence alignments between each variant and the standard sequence (the boxes demonstrate the mutation points of the variants).

图1 人HIF2 α CDS及其点突变体慢病毒表达载体的构建

Fig.1 Construction of the lentiviral vectors for HIF2 α and the three variants

(NM-001430.4), 利用PCR技术从HEK 293T细胞cDNA中扩增其全长, 经电泳检测获得与预期大小一致约2.6 Kb的DNA片段(图1B), 将扩增后的DNA片段回收并克隆到慢病毒表达载体pCEP上。测序结果显示, 插入的DNA序列与NCBI收录的HIF2 α 基因CDS序列完全一致。以构建成功的pCEP-HIF2 α 为模板, 先利用PCR技术获得携带突变并与预测一致的扩增片段Fra1和Fra2; 再利用搭桥PCR扩增出HIF2 α 的3个突变体的全长片段(图1C)。测序结果显示, 突变碱基与实验设计完全一致(图1D)。

2.2 携带HIF2 α 及其突变体的慢病毒载体验证

将构建好的HIF2 α 及突变体和空载pCEP分别包装慢病毒, 感染K562细胞, 加入2 μ g/mL的嘌呤霉素筛选出稳定表达外源基因的细胞。分别提取RNA和蛋白。用qRT-PCR及Western blot检测各组HIF2 α mRNA和蛋白水平的表达。结果显示, 各实验组HIF2 α mRNA和蛋白水平均明显高于对照组(图2)。

2.3 HIF2 α 及其突变体对CD34+造血干祖细胞红系定向分化的影响

细胞表面分子CD71和CD235a的时序性表达是表征红系分化进程的重要分子。FACS结果显示, 在常氧(图3B)和5% O₂(图3C)条件下, 各组细胞分化无明显区别; 且低氧条件较常氧细胞分化速度加快。我们检测了常氧分化下各组间下游基因的表达, 结果显示, EPOR及VEGFA的表达较对照组有所升高, TfRC的表达无明显变化(图3D)。

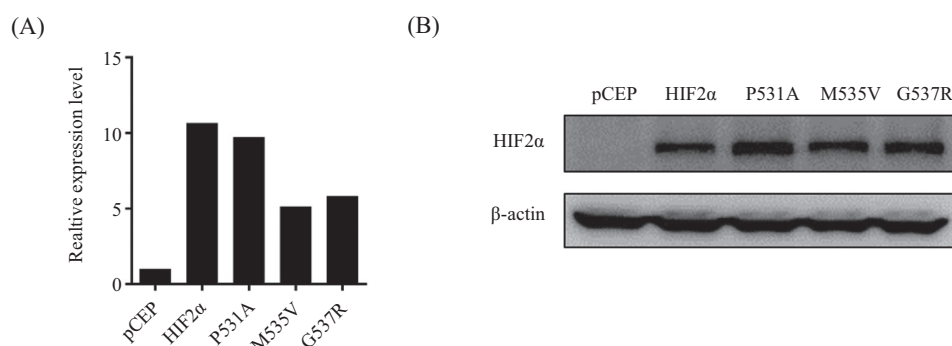
3 讨论

本文旨在研究携带HIF2 α 基因点突变的造血干

祖细胞(HSPCs)其红系分化功能是否受到影响。通过构建携带HIF2 α 及遗传性红细胞增多症相关的突变体的慢病毒表达载体, 感染脐血来源的HSPC, 在常氧及5% O₂两种氧浓度条件下诱导其体外红系分化, 发现HIF2 α 的点突变对造血干祖细胞的体外红系分化进程无直接影响; 分析HIF通路调控的下游相关基因发现, EPOR及VEGFA的基因表达较对照组有所升高, TfRC的基因表达无明显变化。其中, VEGFA的mRNA表达升高与文献中用ELISA检测病人红系祖细胞体外培养上清中VEGFA的升高结果一致; TfRC的表达可能由于检测手段及指标(文献中检测可溶性TfRC)的不同结果有一定差别^[9]; 突变体引起的EPOR基因的mRNA表达升高是首次发现, 其在临床病人中的相关性有待今后的研究验证。

自2008年以来, 陆续在遗传性红细胞增多症病人中报道HIF2 α 的外显子区存在多种点突变。2013年, Frank团队^[13]构建了小鼠的HIF2 α G536W missense mutation(human G537W)疾病模型, 发现小鼠的血容量、血红蛋白、红细胞数量、血小板等均显著升高, 小鼠呈现红细胞增多的症状, 证实了HIF2 α 的突变与红细胞增多症的发生存在直接联系。现在的研究观点主要认为, HIF2 α 调控红系分化主要通过EPO合成调控实现。我们的研究结果也表明, 携带HIF2 α 基因点突变的造血干祖细胞自身在红系分化的能力并未发生显著性的改变, 但携带HIF2 α 突变所导致的与红系分化调控有关的基因如EPOR和VEGFA等的表达异常则可能与其他系统性因子(如EPO)共同作用对红系生成异常产生协同功能。

HIF作为低氧诱导条件下的重要转录因子, 直

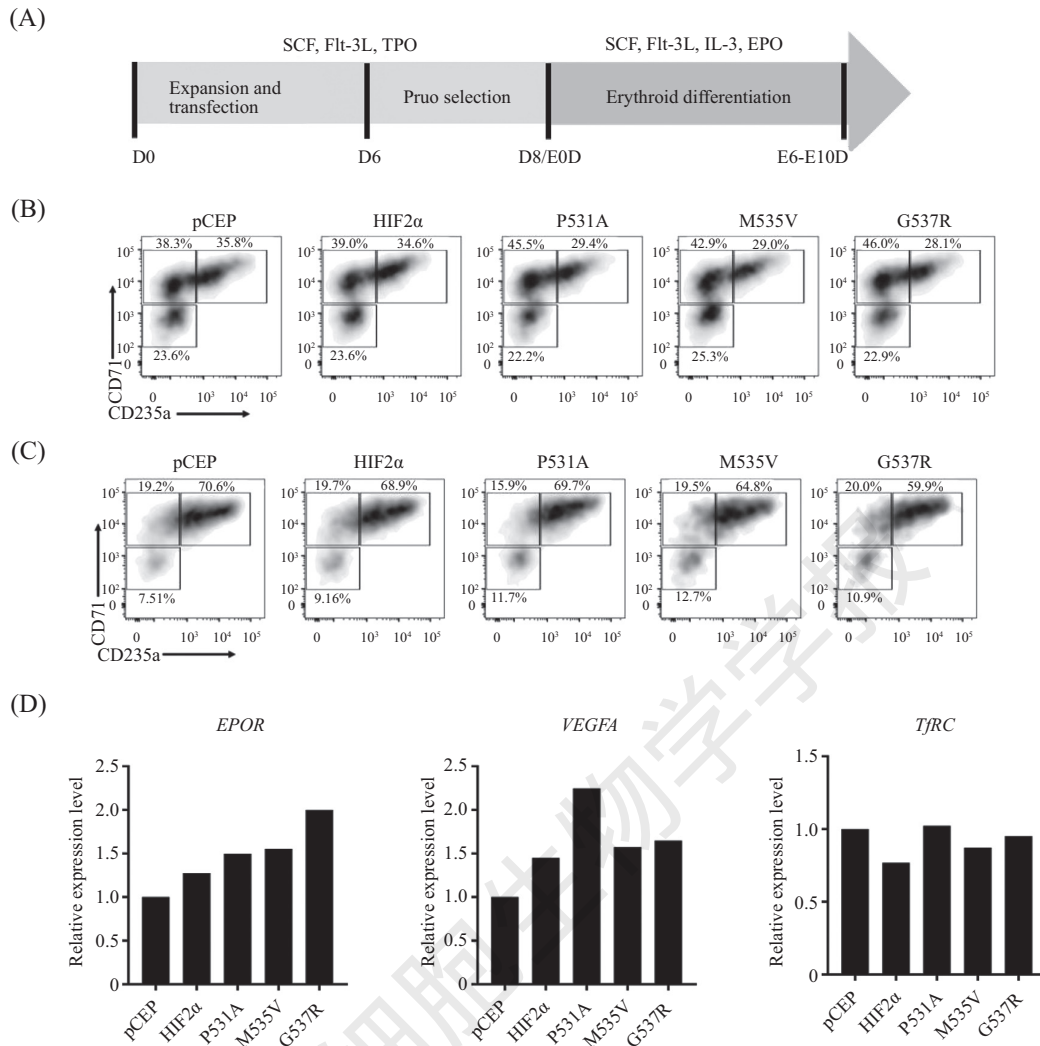


A: qRT-PCR分析感染各HIF2 α 及其突变体慢病毒载体细胞中HIF2 α 基因表达; B: Western blot分析感染各HIF2 α 及其突变体慢病毒载体细胞中HIF2 α 蛋白表达。

A: qRT-PCR quantification of the expression level of HIF2 α and the variants; B: Western blot quantification of the expression level of HIF2 α and the variants.

图2 K562细胞中HIF2 α 及其突变体慢病毒载体过表达验证

Fig.2 Verification of gene expression from lentiviral vectors of HIF2 α and its mutants in K562 cells



A: 慢病毒感染HSPC及体外诱导红系分化流程图; B: 常氧培养条件下分化第5天流式分析细胞表面红系分子CD71/CD235a的表达; C: 5%低氧条件下分化第5天流式分析红系分CD71/CD235a的表达; D: qRT-PCR分析HIF通路下游相关基因表达(常氧条件)。

A: the flowchart of HSPC induced differentiation towards erythropoiesis; B: FACS analysis of erythroid marker CD71/CD235a expression on E5D under normoxia; C: FACS analysis of erythroid marker CD71/CD235a expression on E5D under 5% O₂; D: qRT-PCR analysis of downstream genes in different groups (normoxia).

图3 过表达HIF2α或其突变体的CD34+造血干祖细胞的红系定向分化及HIF靶向基因表达分析
Fig.3 In vitro erythroid differentiation and HIF targeted erythroid gene expression in CD34+ HSPCs overexpressing HIF2α or its mutants

接调控许多下游基因。这些下游产物参与到细胞存活与增殖、细胞凋亡、血管生成、葡萄糖代谢及肿瘤发生等多个重要生理病理过程。对于造血来说,正常的造血微环境本身存在低氧分布以及供氧不均,与造血相关的组织包括髓、胸腺以及淋巴结均存在低氧分压区。然而,HIF在正常和病理性造血中的作用尚不明确。自2010年以来,陆续有多项研究报道HIF1α或HIF2α在HSC干性维持中的作用,目前这些研究尚无一致结论^[14-17]。除此,HIF也与病理性造血存在密切联系^[18]。如在CML中,*BCR-ABL*融合基因可显著上调HIF1α及下游基因*VEGF*的表达^[19];

ALL患者骨髓单个核细胞中HIF-1α高表达,可能与患者化疗耐药及复发相关^[20];在JAK2-STAT5通路持续激活的真性红细胞增多症(PV)患者中,HIF2α作为STAT5的靶基因^[21],在PV发病机制中的作用值得进一步深入探究;HIF2α能够保护AML病人细胞避免由内质网应激带来的凋亡^[16],等等。总之,低氧通路及其基因在血液疾病发生发展中的作用尚未得到完全阐释。

虽然本研究扩展了HIF2α基因突变体的红系分化功能研究,需要指出的是,通过慢病毒介导外源突变基因表达进行疾病模拟存在相当的局限性。近年

来, 诱导多能干细胞技术和CRISPR-Cas9基因编辑技术的快速发展为原位研究基因突变对疾病发生发展机制提供了极大的便利^[22]。通过CRISPR-Cas9技术在HSPCs或人多能干细胞(hESCs)中构建HIF2 α 点突变模型, 也可以从携带突变的病人细胞建立相应的iPSC细胞系, 这些都可能获得更好的细胞模型, 从而深入研究HIF2 α 基因点突变在造血干祖细胞水平与红系增多症发生之间的关系, 深入揭示HIF基因在造血分化尤其是红系分化过程中的调控功能及其分子机制。

参考文献 (References)

- Lorenzo FR, Yang C, Fui MN, Vankayalapati H, Zhuang ZP, Huynh T, *et al.* A novel EPAS1/HIF2A germline mutation in a congenital polycythemia with paraganglioma. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91(4): 507-12.
- Percy MJ, Beer PA, Campbell G, Dekker AW, Green AR, Oscier D, *et al.* Novel exon 12 mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Blood* 2008; 111(11): 5400-2.
- Martini M, Teofili L, Cenci T, Giona F, Torti L, Rea M, *et al.* A novel heterozygous HIF2A M535I mutation reinforces the role of oxygen sensing pathway disturbances in the pathogenesis of familial erythrocytosis. *Haematologica* 2008; 93(7): 1068-71.
- Gale DP, Harten SK, Reid CD, Tuddenham EG, Maxwell PH. Autosomal dominant erythrocytosis and pulmonary arterial hypertension associated with an activating HIF2 α mutation. *Blood* 2008; 112(3): 919-21.
- Percy MJ, Furlow PW, Lucas GS, Path FRC, Li XP, Lappin TRJ, *et al.* A gain-of-function mutation in the HIF2A gene in familial erythrocytosis. *N Engl J Med* 2008; 358(2): 162-8.
- Furlow PW, Percy MJ, Sutherland S, Bier C, McMullin MF, Master SR, *et al.* Erythrocytosis-associated HIF-2 α mutations demonstrate a critical role for residues C-terminal to the hydroxyl-acceptor proline. *J Biol Chem* 2009; 284(14): 9050-8.
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, *et al.* Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin *in vivo*. *J Clin Invest* 2007; 117(4): 1068-77.
- Lee FS, Percy MJ. The HIF pathway and erythrocytosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 165-92.
- Perrotta S, Stiehl DP, Punzo F, Scianguetta S, Borriello A, Ben-civenga D, *et al.* Congenital erythrocytosis associated with gain-of-function HIF2A gene mutations and erythropoietin levels in the normal range. *Haematologica* 2013; 98(10): 1624-32.
- Pedersen M, Löfstedt T, Sun J, Holmquist-Mengelbier L, Pählman S, Rönnstrand L. Stem cell factor induces HIF-1 α at normoxia in hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(1): 98-103.
- Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999; 274(34): 24147-52.
- Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, *et al.* Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 2013; 15(5): 533-43.
- Tan Q, Kerestes H, Percy MJ, Pietrofesa R, Chen L, Khurana TS, *et al.* Erythrocytosis and pulmonary hypertension in a mouse model of human HIF2A gain of function mutation. *J Biol Chem* 2013; 288(24): 17134-44.
- Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, *et al.* Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 391-402.
- Milica V, Catarina S, Chithra S, Amelie VG, Jasmine M, Lewis A, *et al.* Adult hematopoietic stem cells lacking Hif-1 α self-renew normally. *Blood* 2016; 127(23): 2841-6.
- Rouault-Pierre K, Lopez-Onieva L, Foster K, Anjos-Afonso K, Lamrissi-Garcia I, Serrano-Sanchez M, *et al.* HIF-2 α protects human hematopoietic stem/progenitors and acute myeloid leukemic cells from apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cell Stem Cell* 2013; 13(5): 549-63.
- Guitart AV, Subramani C, Armesilla-Diaz A, Smith G, Sepulveda C, Gezer D, *et al.* Hif-2 α is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood* 2013; 122(10): 1741-5.
- Rouault-Pierre K, Hamilton A, Bonnet D. Effect of hypoxia-inducible factors in normal and leukemic stem cell regulation and their potential therapeutic impact. *Expert Opin Biol Ther* 2016; 16(4): 463-76.
- Zhang HJ, Li HW, Xi HS, Li SG. HIF1 α is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2012; 119(11): 2595-607.
- 云清英, 徐刚. HIF-1 α 在成人急性淋巴细胞白血病患者骨髓单个核细胞中的表达及意义. *中国现代医学杂志(Yun Qingying, Xu Gang. Expression and significance of HIF-1 α in bone marrow mononuclear cells of adult patients with ALL. China Journal of Modern Medicine)* 2017; 27(21): 49-53.
- Fatrai S, Wierenga AT, Daenen SM, Vellenga E, Schuringa JJ. Identification of HIF2 α as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood* 2011; 117(12): 3320-30.
- 沈阳坤, 郑志泉, 蔡少丽. CRISPR/Cas9系统在疾病模型和基因治疗中的应用. *中国生物化学与分子生物学报(Shen Yangkun, Zheng Zhiquan, Cai Shaoli. The application of CRISPR/Cas9 system in Disease models and gene therapy. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology)* 2015; 31(8): 786-94.