

综述

孙晓建 (1977—), 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海血液学研究所研究员, 博士生导师, 医学基因组学国家重点实验室副主任。2005 年于中国科学院上海生命科学研究院获得博士学位。

从事造血和血液肿瘤的基因转录和表观遗传调控机制的研究。主要研究成果包括鉴定白血病相关转录因子复合物 AETFC 并解析其功能机制, 在国际上首先克隆鉴定组蛋白甲基转移酶 SETD2, 以及建立斑马鱼骨髓组织造血相关基因发育表达谱。入选 2015 年中央组织部青年千人计划、上海市教育委员会高峰高原学科建设计划, 获得美国洛克菲勒大学临床转化研究中心先导项目奖、美国斯塔尔癌症协作组访问学者奖、中国科学院宝洁优秀博士生等奖项。



用斑马鱼模型研究低氧应激在造血和血液疾病中的作用

张 凡, 黄秋花, 陈赛娟, 孙晓建

上海交通大学 医学院附属瑞金医院, 上海血液学研究所, 医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025

[摘要] 斑马鱼是研究造血和血液疾病的理想动物模型, 广泛应用于研究造血干细胞 (HSCs) 的发生和迁移、HSCs 与微环境的相互作用以及血液疾病的发病机制。研究表明, 低氧应激信号通路对于 HSCs 的体内发育及其体外培养和扩增都起到重要作用。该信号通路中的关键因子及其对下游基因的调控机制在人和斑马鱼之间具有很高的保守性。作为小鼠模型的互补, 用斑马鱼进行这方面的研究显示了一些独特的优势。利用斑马鱼模型研究低氧应激在造血和血液疾病中的作用, 将有助于进一步理解造血和血液疾病发生的机制, 并为血液疾病的治疗提供新的思路。

[关键词] 造血; 造血干细胞; 血液疾病; 低氧; 斑马鱼

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2016.08.025 **[中图分类号]** R363.1 **[文献标志码]** A

Utilization of the zebrafish model for studying the role of hypoxic stress in hematopoiesis and hematopoietic diseases

ZHANG Fan, HUANG Qiu-hua, CHEN Sai-juan, SUN Xiao-jian

State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Zebrafish, an ideal animal model for studying human hematopoiesis and hematopoietic diseases, has been widely used to study occurrence and migration of hematopoietic stem cell (HSC), interaction between HSCs and microenvironment, as well as pathogenesis of hematopoietic diseases. Recent studies revealed that the hypoxic stress signaling pathway plays an essential role in *in vivo* development and *in vitro* culture and expansion of HSCs. The key factors in this signaling pathway and the mechanisms of regulating downstream target genes are considerably conserved between human and zebrafish. As a complement to mouse models, zebrafish presents some distinct advantages for studies on this area. Utilization of the zebrafish model for studying the role of hypoxic stress in hematopoiesis and hematopoietic diseases should be helpful for further understanding the mechanisms of hematopoiesis and the occurrence of hematopoietic diseases and provide novel ideas for the treatment of hematopoietic diseases.

[Key words] hematopoiesis; hematopoietic stem cell; hematopoietic disease; hypoxia; zebrafish

低氧应激是指细胞/组织处于氧气不足的状态时发生 以至细胞/组织生理状态产生变化。这是一个精细调控的一种应激反应, 常伴随着细胞内特殊信号通路的激活, 过程, 其中一个重要转录因子是低氧诱导因子 (hypoxia

[基金项目] 国家重大科学研究计划 (2013CB966801); 国家自然科学基金面上项目 (81470316); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20152506) (National Key Basic Research Project of China, 2013CB966801; National Natural Science Foundation of China, 81470316; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20152506)。

[作者简介] 张 凡 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhangfanmedical@foxmail.com。

[通信作者] 孙晓建, 电子信箱: xjsun@sibs.ac.cn。



inducible factor, HIF), 其蛋白水平和转录活性受到低氧的调控, 进而控制特定靶基因的表达^[1]。生物体内的细胞在生理和病理条件下都可能处于低氧状态, 因此低氧应激与许多生物学过程密切相关, 其中包括组织/器官发生、肿瘤和炎症反应等^[2]。

血液循环是生物体氧气转运的主要途径, 而造血过程也受到低氧应激信号通路的调控。在这方面早期的研究工作主要集中于低氧对红细胞的影响^[3]。近期研究表明该信号通路对造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)的发育和功能也具有重要作用^[4-5]。整个造血系统建立于HSCs的基础之上: 一方面, HSCs能够通过分化形成血液系统中所有细胞类型; 另一方面, HSCs也具有自我更新的能力, 从而维持体内一定数量HSCs的多潜能干细胞状态^[6]。有证据表明体内的HSCs处于低氧环境^[7]; 而体外的高氧会降低HSCs的活性, 这可能是目前难以实现在体外长期培养和扩增HSCs的一个原因^[8]。另外, 低氧应激信号通路也在许多血液系统相关疾病的发生中发挥重要作用^[9-10]。因此, 进一步研究低氧应激在造血和血液疾病中的作用, 对我们理解造血调控的机制, 以及体外培养、扩增和重建HSCs具有重要意义, 并且可为寻找治疗血液疾病的靶点提供新的思路。

斑马鱼是研究造血和血液疾病的理想的动物模型, 具备许多优良的生物学特征: 它的生长速度快, 产卵多, 体积小, 容易养殖, 可以实现大规模突变筛选和药物筛选; 体外受精, 胚胎透明, 可以活体观察造血的全过程。斑马鱼作为一种脊椎动物, 其造血过程与人类相似^[11]。另外, 许多新技术(例如CRISPR-Cas9介导的基因组编辑技术)的建立使得这种模式生物更加高效^[12]。在研究低氧应激对造血和血液疾病的调控方面, 虽然小鼠是最常用的动物模型^[13-14], 但最近也有一些研究采用了斑马鱼模型, 显示了斑马鱼作为与小鼠互补的动物模型具备其独特的优势。本文主要基于斑马鱼模型, 论述低氧应激信号通路的保守性及其在造血和血液疾病中的作用机制, 并探讨斑马鱼模型在这方面研究上的一些优势。

1 低氧应激信号通路在人和斑马鱼之间的保守性

HIF是由HIF- α 和HIF- β 两个亚基组成的异源二聚体, 它们都属于具有bHLH(basic Helix-Loop-Helix)和PAS(Per-ARNT-AHR-Sim)结构域的转录因子蛋白家族^[15]。在功能上, HIF- α 亚基还具有氧依赖降解结构域(oxygen-dependent degradation, ODD)和转录激活结构域(transactivation domain, TAD), 它们可以分别被含有

脯氨酰羟化酶结构域(prolyl hydroxylase domain, PHD)的3个酶PHD1-3(也称为egl-9 family hypoxia-inducible factors, EGLNs)和天冬酰胺羟化酶FIH-1(factor-inhibiting HIF; 也称为HIF-1 α inhibitor, HIF1AN)羟基化。PHD和FIH均为依赖二价铁离子和酮戊二酸的加双氧酶, 其活性受氧调控。常氧时, HIF- α 亚基被PHD羟基化, 随后由E3泛素连接酶VHL(von Hippel Lindau)识别并介导泛素化, 最终被蛋白酶体(proteasome)降解^[1]。VHL与Cul-2、Rbx1和Elongin B/C等蛋白形成复合物, 调控HIF- α 的泛素化过程。这个过程还受到多梳蛋白Cbx4的调控^[16]。低氧时, PHD活性丧失, HIF- α 亚基不易被降解, 并转移至细胞核内, 与HIF- β 亚基形成二聚体, 与靶基因调控区域的低氧反应元件(hypoxia response elements, HREs)结合。低氧时FIH-1也失活, 不能对HIF- α 的C端TAD进行羟基化, 使得转录辅因子p300/CBP能够结合, 从而激活靶基因的转录^[17]。

人的基因组编码3种HIF- α 亚基(HIF-1 α 、HIF-2 α 和HIF-3 α)和2种HIF- β 亚基(HIF-1 β 和HIF-2 β , 也称为ARNT和ARNT2)。对应于人的3种HIF- α 亚基, 斑马鱼基因组共编码6个基因, 每种亚基都存在两个同源基因, 这可能是源于硬骨鱼类在进化过程中发生的全基因组复制事件^[18-21]。由于2个同源基因同时存在, 它们之间可能发生功能上的分工, 并协同发挥作用。斑马鱼和人的HIF- β 亚基仍然是一对一的关系, 可能是全基因组复制产生的2个同源基因中有1个在进化中丢失。斑马鱼的PHD基因家族包含4个同源基因, 其中2个基因(*egln1a*和*egln1b*)对应于人的PHD2/EGLN1, 而与人的PHD1/EGLN2和PHD3/EGLN3都是一一对应的关系。斑马鱼有1个*vhl*基因和1个*vhl-like*(*vhll*)基因^[22], 前者与人的VHL具有较高的同源性。虽然人的基因组中也有一个VHLL基因, 但它是否是一个转座子介导的假基因仍有争议, 与斑马鱼的*vhll*也没有直向同源关系, 因此斑马鱼的*vhll*可能也是全基因组复制事件的产物, 但其结构和功能在进化过程中发生了相对较大的变异。斑马鱼与人的FIH-1是一一对应关系。综上所述, 低氧应激的关键调控因子在人和斑马鱼之间具有较高的保守性, 但全基因组复制事件使得某些基因产生双拷贝并保留下来。这种相对复杂的基因对应关系, 要求我们在利用斑马鱼研究低氧应激调控机制时, 要对这些同源基因的功能进行区分, 但这也为分子机制研究提供了一些灵活性。

除此以外, 这些低氧应激信号通路的关键调控因子对下游基因的调控也具有保守性。已知许多受到低氧诱导表达的基因在血管生成、细胞增殖、迁移、代谢和炎症反

应等生物学过程中具有重要作用^[1]。这类基因的斑马鱼同源基因, 例如红细胞生成素 (erythropoietin, *epo*)^[23]、胰岛素样生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding protein 1, *IGFBP-1*)^[24-25]、生物周期蛋白 (*period1*)^[26] 等, 也都受到低氧应激的调控。与人和小鼠的基因一样, 斑马鱼的这些低氧应激下游基因的启动子或增强子区域也通常具有 HREs, 从而可以被 HIF 识别和调控^[25-26]。有的实验还表明, 在一些基因 (如 *vhl*) 缺陷的斑马鱼中异位表达人或小鼠的同源基因, 可以挽救其表型^[22], 这也显示了低氧应激信号通路在斑马鱼和人之间的保守性, 并使得这些斑马鱼模型可以用来直接研究人类基因的功能。Greenald 等^[27] 通过对斑马鱼全基因组水平的染色质免疫沉淀测序 (ChIP-seq) 分析和基因表达谱分析研究了 HIF-1 α , 系统地鉴定了斑马鱼 HIF-1 α 的靶基因, 显示 HIF-1 α 不仅可以激活靶基因的表达, 还可以抑制一些基因的表达, 而后者主要与脂类代谢相关, 其分子机制和生物学意义还有待于进一步研究。

2 低氧应激对造血的调控

人和斑马鱼的造血过程均可分为原始造血和定向造血^[28]。原始造血主要产生红系祖细胞, 而定向造血期开始出现多潜能的 HSCs。人的原始造血发生在卵黄囊的血岛, 而定向 HSCs 首先在主动脉-性腺-中肾区 (aorta-gonad-mesonephros, AGM) 产生, 随后迁移到胎肝、胸腺, 最后到骨髓并终身造血。斑马鱼的造血也有类似的造血部位的迁移, 其原始造血发生在中间细胞群 (intermediate cell mass, ICM), 定向造血从 AGM 迁移到尾部造血组织 (CHT) 以及胸腺, 最后在肾脏终身造血。除了在造血部位及其迁移过程的相似性, 我们早期的研究结果还显示了斑马鱼和人的造血调控基因的高度保守性^[11], 为利用斑马鱼研究造血调控和相关疾病奠定了基础。

已有证据表明小鼠的 HSCs 在骨髓中处于相对低氧的环境^[7]。HSCs 能保持静息状态与 HIF/VHL 通路相关^[13-14]。斑马鱼的造血也受到低氧应激信号通路的影响。首先, 斑马鱼在胚胎发育过程中以及成体的造血部位与哺乳类具有很大的相似性, 这些部位也可能具备相对低氧的环境。其次, 斑马鱼的造血过程受到低氧环境的影响。例如, 低氧可以增加斑马鱼 *epo* 基因的表达^[23]。再次, 低氧应激信号通路中关键基因的改变可以调控斑马鱼的造血过程。例如, *vhl* 的功能缺失性突变和敲低均可引起斑马鱼 HSCs 的增加^[22,29], 而过表达 HIF 的靶基因血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, *veg*f) 也能够增加斑马鱼的 HSCs^[30]。最后, 某些低氧应激信号通路中关键基因的变异引发的人类血液系统相关疾病可以在斑马鱼模型上得以重现^[31]。

在研究低氧应激对造血调控方面, 斑马鱼模型体现了它的优势, 并导致了一些有意义的发现。Harris 等^[29] 用葡萄糖处理斑马鱼胚胎后, 发现斑马鱼 AGM 区域的 HSCs 增加, 而且 HSCs 出现的时间也有所提前。通过检测细胞内的代谢物, 结合对代谢通路中关键酶的抑制或敲低等方法, 进一步的研究提示葡萄糖处理使得斑马鱼 HSCs 增加的分子机制涉及到葡萄糖的摄入和代谢、线粒体来源的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 增加、PHD 活性的抑制以及 HIF-VHL 低氧应激信号通路的激活。也有研究显示低氧处理可以影响斑马鱼的血液中的葡萄糖水平^[32]。这些研究说明糖代谢和低氧应激信号通路能够协同调控胚胎的造血过程, 但其中的分子机制还需要进一步研究。近年来, 研究发现血糖水平与急性白血病的发病率和存活率相关^[33-34]。因此, 斑马鱼葡萄糖处理模型和低氧应激信号通路激活的模型或许可以用于进一步研究血糖介导的低氧应激通路对 HSCs 增生及恶化的调控^[29,35]。

3 低氧应激与血液疾病的关系

低氧应激信号通路对正常造血过程具有重要的调控作用, 该通路关键基因的变异也会导致血液系统相关的疾病^[9-10]。有许多证据显示了低氧应激信号通路在血液肿瘤中的作用, 但其作用模式和机制尚存在争议。一方面, 在一个小鼠淋巴瘤模型和人急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 中, HIF-1 α 选择性高表达于肿瘤干细胞, 因此通过基因敲低和 HIF-1 α 抑制剂 echinomycin 抑制低氧应激信号通路可以有效地促使肿瘤干细胞凋亡^[36]。另一方面, 在 AML 中发生突变的异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase 1, IDH1) 的 R132H 突变型能够催化产生 R-2-羟戊二酸 (R-2-Hydroxyglutarate, R-2-HG) 从而增强 PHD 的活性, 并引起 HIF-1 α 的降解。在这种情况下, 较低的 HIF 活性促进肿瘤的发生^[37]。这些研究结果提示低氧应激信号通路调控血液肿瘤发生的机制具有复杂性, 可能与肿瘤的种类和肿瘤细胞的异质性有关, 但这也为血液肿瘤的精准治疗提供了多种潜在的思路。研究发现低氧模拟药物能够诱导 AML 细胞分化^[38-39], 而且间歇性地低氧处理小鼠 AML 模型可以延长其生存期^[40]。进一步的机制研究显示, HIF 转录活性所必需的 HIF-1 β 亚基

的敲低对 HIF-1 α 诱导的 AML 细胞分化没有影响,提示 HIF-1 α 诱导分化作用可能并不依赖于其转录活性,这为低氧应激在血液肿瘤的发生和治疗中的作用提供了新的机制^[41]。

低氧应激信号通路的异常还与先天性血液疾病相关。楚瓦什红细胞增多症(Chuvash polycythemia, CP)是一种罕见的常染色体隐性疾病,与 *VHL* 基因突变有关,突变常见于 R200W。该位点与 HIF 的结合和泛素化相关,因此突变后可激活低氧应激通路,临床上表现为血红蛋白和红细胞容积增高^[42]。通过 N-乙基-N-亚硝基脲(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU)诱导的突变筛选, van Rooijen 等^[22]建立了 2 株 *vhl* 截短型突变的斑马鱼,它们的纯合子和双杂合子均能重现红细胞增多症的表型,包括红细胞增多、*epo* 及其受体 *epor* 表达升高,以及下游 JAK/STAT 信号通路的激活等。该模型的白细胞也有明显增加,可能反映了 *vhl* 对 HSCs 的作用。有趣的是,在 *vhl* 突变的斑马鱼胚胎注射人的 *VHL* mRNA 可以挽救红系增多的表型,而注射具有 R200W 点突变的 mRNA 时,斑马鱼的表型没有恢复^[22]。这不仅说明了人和斑马鱼在氨基酸水平具有保守性,也说明该斑马鱼模型可用于在分子水平研究基因与表型的关系,并进行药物筛选^[31]。Metelo 等^[43]用 HIF-2 α 抑制剂处理 *vhl* 突变的斑马鱼可以有效地缓解其疾病表型,提示抑制 HIF-2 α 是治疗 *VHL* 疾病的一种有效策略。

4 斑马鱼模型的优势

在造血和血液疾病的低氧应激调控的研究方面,虽然与小鼠模型相比,目前斑马鱼在这方面的应用相对较少,但已经体现出了一些显著的优势。斑马鱼的胚胎在体外发育,所以可以通过控制培养系统的氧浓度或药物处理来引起其细胞/组织的低氧应激^[21],此时体内的血液细胞的数量和分布均可直接进行观察^[44]。Cao 等^[45-46]设计了一套低氧处理斑马鱼的设备,在密闭鱼缸中通过检测水中的氧气水平自动调节氮气的灌注,从而避免过低的氧浓度或过高的气压对斑马鱼造成的伤害。这种设备被用于研究斑马鱼的视网膜血管发育和肿瘤细胞的迁移等^[45-47]。低氧环境下培养的斑马鱼胚胎的发育出现一定程度的滞后,但当胚胎被转移到常氧环境以后这种滞后是可逆的。其中的分子机制可能是由于低氧诱导 *IGFBP-1* 的高表达,而 *IGFBP-1* 通过与胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)的相互作用抑制它们的活性。*IGFBP-1* 的敲低可以缓解低氧引起的发育发育滞后^[24]。这一发现对于应用斑马鱼研究

低氧应激具有一定意义,因为这提示调节 *IGFBP-1* 的表达水平可能有助于区分低氧应激的直接表型和由于发育滞后导致的间接表型。

斑马鱼由于其产卵多、体积小、胚胎透明、易养殖等特点,已经被广泛应用于各种基于大规模筛选的研究工作中。在造血和血液疾病研究方面,斑马鱼被成功地应用于遗传突变筛选(即正向遗传学筛选)^[48-51]、基因抑制或过表达筛选(即反向遗传学筛选)^[52-54]以及小分子化合物筛选^[55-59]等。其中有研究通过利用斑马鱼模型对化合物文库进行筛选,获得了 2 种二十烷类衍生物,即前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 和环氧二十碳烯酸(epoxyeicosatrienoic acid, EET),都能够促进斑马鱼和小鼠 HSCs 扩增和移植能力^[55,58]。由此可见,基于斑马鱼和哺乳类造血调控机制的保守性,利用斑马鱼筛选获得的基因或药物许多都可以直接应用于哺乳类。

5 结语和展望

HSCs 是成体干细胞研究领域的主要范式,数十年的研究积累已经使我们对 HSCs 的细胞起源、自我更新和分化的机制有了一定程度的理解。但目前仍有许多关键问题未能回答,例如,如何精确界定 HSCs 以及如何理解 HSCs 的异质性?如何通过扩增和重编程获得 HSCs?正常 HSCs 如何向白血病干细胞演化?为什么在白血病治疗过程中白血病干细胞难以被清除?进一步深入和拓展 HSCs 的研究将有助于最终回答这些问题。低氧应激对 HSCs 的发育和功能的调控可能与这些问题密切相关。相对于 HSCs 在体内的低氧环境,体外培养环境的高氧状态对 HSCs 活性的破坏,可能是目前未能实现高效的 HSCs 体外扩增的重要因素。因此,低氧环境维持 HSCs 的分子机制,以及如何抑制或逆转高氧对 HSCs 的破坏,都是需要进一步深入研究的重要科学问题。

利用斑马鱼模型进行低氧应激在造血和血液疾病中作用机制的研究具有一些独特的优势。例如,斑马鱼胚胎的体外发育使其可以直接进行低氧或药物处理并直接观察 HSCs 行为的变化;斑马鱼的体积小、数量多、易养殖等特点使其可被用于大规模遗传突变和药物筛选。这些特点都是小鼠模型所不能具备的,因此斑马鱼可作为小鼠模型的互补。充分利用不同模式生物的优势,并结合 HSCs 体外培养和扩增以及细胞重编程等技术,将使我们能够进一步理解造血和血液疾病发生的机制,解答其中未知的关键科学问题,并为血液疾病的治疗提供新的思路。

参·考·文·献

- [1] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(12): 967-975.
- [2] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine[J]. Cell, 2012, 148(3): 399-408.
- [3] Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(1): F1-F13.
- [4] Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(4): 298-310.
- [5] Imanirad P, Dzierzak E. Hypoxia and HIFs in regulating the development of the hematopoietic system[J]. Blood Cells Mol Dis, 2013, 51(4): 256-263.
- [6] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology[J]. Cell, 2008, 132(4): 631-644.
- [7] Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(13): 5431-5436.
- [8] Mantel CR, O'Leary HA, Chitteti BR, et al. Enhancing hematopoietic stem cell transplantation efficacy by mitigating oxygen shock[J]. Cell, 2015, 161(7): 1553-1565.
- [9] Gordeuk VR, Stockton DW, Pchral JT. Congenital polycythemia/erythrocytoses[J]. Haematologica, 2005, 90(1): 109-116.
- [10] Gezer D, Vukovic M, Soga T, et al. Concise review: genetic dissection of hypoxia signaling pathways in normal and leukemic stem cells[J]. Stem Cells, 2014, 32(6): 1390-1397.
- [11] Song HD, Sun XJ, Deng M, et al. Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(46): 16240-16245.
- [12] Gonzales AP, Yeh JR. Cas9-based genome editing in zebrafish[J]. Methods Enzymol, 2014, 546: 377-413.
- [13] Simsek T, Kocabas F, Zheng J, et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 380-390.
- [14] Takubo K, Goda N, Yamada W, et al. Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(3): 391-402.
- [15] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(12): 5510-5514.
- [16] Li J, Xu Y, Long XD, et al. Cbx4 governs HIF-1 α to potentiate angiogenesis of hepatocellular carcinoma by its SUMO E3 ligase activity[J]. Cancer Cell, 2014, 25(1): 118-131.
- [17] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch[J]. Science, 2002, 295(5556): 858-861.
- [18] Rojas DA, Perez-Munizaga DA, Centanin L, et al. Cloning of hif-1 α and hif-2 α and mRNA expression pattern during development in zebrafish[J]. Gene Expr Patterns, 2007, 7(3): 339-345.
- [19] Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model[J]. Blood, 2011, 118(3): 712-722.
- [20] Rytönen KT, Akbarzadeh A, Miandare HK, et al. Subfunctionalization of cyprinid hypoxia-inducible factors for roles in development and oxygen sensing[J]. Evolution, 2013, 67(3): 873-882.
- [21] Elks PM, Renshaw SA, Meijer AH, et al. Exploring the HIFs, butts and maybes of hypoxia signalling in disease: lessons from zebrafish models[J]. Dis Model Mech, 2015, 8(11): 1349-1360.
- [22] van Rooijen E, Voest EE, Logister I, et al. Zebrafish mutants in the von Hippel-Lindau tumor suppressor display a hypoxic response and recapitulate key aspects of Chuvash polycythemia[J]. Blood, 2009, 113(25): 6449-6460.
- [23] Paffett-Lugassy N, Hsia N, Fraenkel PG, et al. Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish[J]. Blood, 2007, 110(7): 2718-2726.
- [24] Kajimura S, Aida K, Duan C. Insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) mediates hypoxia-induced embryonic growth and developmental retardation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(4): 1240-1245.
- [25] Kajimura S, Aida K, Duan C. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: *in vitro* and *in vivo* analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(3): 1142-1155.
- [26] Egg M, Köblitz L, Hirayama J, et al. Linking oxygen to time: the bidirectional interaction between the hypoxic signaling pathway and the circadian clock[J]. Chronobiol Int, 2013, 30(4): 510-529.
- [27] Greenald D, Jeyakani J, Pelster B, et al. Genome-wide mapping of Hif-1 α binding sites in zebrafish[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 923.
- [28] Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis[J]. Development, 2013, 140(12): 2463-2467.
- [29] Harris JM, Esain V, Frechette GM, et al. Glucose metabolism impacts the spatiotemporal onset and magnitude of HSC induction *in vivo*[J]. Blood, 2013, 121(13): 2483-2493.
- [30] Burns CE, Galloway JL, Smith AC, et al. A genetic screen in zebrafish defines a hierarchical network of pathways required for hematopoietic stem cell emergence[J]. Blood, 2009, 113(23): 5776-5782.
- [31] van Rooijen E, Santhakumar K, Logister I, et al. A zebrafish model for VHL and hypoxia signaling[J]. Methods Cell Biol, 2011, 105: 163-190.
- [32] Marks C, Kaut KP, Moore FBG, et al. Ontogenetic oxygen changes alter zebra fish size, behavior, and blood glucose[J]. Physiol Biochem Zool, 2012, 85(6): 635-644.
- [33] Ali NA, O'Brien JM, Jr., Blum W, et al. Hyperglycemia in patients with acute myeloid leukemia is associated with increased hospital mortality[J]. Cancer, 2007, 110(1): 96-102.
- [34] Feltbower RG, McKinney PA, Greaves MF, et al. International parallels in leukaemia and diabetes epidemiology[J]. Arch Dis Child, 2004, 89(1): 54-56.
- [35] Santhakumar K, Judson EC, Elks PM, et al. A zebrafish model to study and therapeutically manipulate hypoxia signaling in tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2012, 72(16): 4017-4027.
- [36] Wang Y, Liu Y, Malek SN, et al. Targeting HIF1 α eliminates cancer stem cells in hematological malignancies[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4): 399-411.
- [37] Koivunen P, Lee S, Duncan CG, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation[J]. Nature, 2012, 483(7390): 484-488.
- [38] Huang Y, Du KM, Xue ZH, et al. Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Leukemia, 2003, 17(11): 2065-2073.
- [39] Jiang Y, Xue ZH, Shen WZ, et al. Desferrioxamine induces leukemic cell differentiation potentially by hypoxia-inducible factor-1 α that augments transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein- α [J]. Leukemia, 2005, 19(7): 1239-1247.
- [40] Liu W, Guo M, Xu YB, et al. Induction of tumor arrest and differentiation with prolonged survival by intermittent hypoxia in a mouse model of acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2006, 107(2): 698-707.
- [41] Song LP, Zhang J, Wu SF, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α -induced differentiation of myeloid leukemic cells is its transcriptional activity independent[J]. Oncogene, 2008, 27(4): 519-527.
- [42] Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, et al. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors[J]. Blood, 2004, 103(10): 3924-3932.
- [43] Metelo AM, Noonan HR, Li X, et al. Pharmacological HIF2 α inhibition improves VHL disease-associated phenotypes in zebrafish model[J]. J Clin Invest, 2015, 125(5): 1987-1997.
- [44] Schwerte T. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish Danio rerio incubated in hypoxic conditions *in vivo*[J]. J Exp Biol, 2003, 206(8): 1299-1307.
- [45] Cao Z, Jensen LD, Rouhi P, et al. Hypoxia-induced retinopathy model in adult zebrafish[J]. Nat Protoc, 2010, 5(12): 1903-1910.
- [46] Cao R, Jensen LD, Soll I, et al. Hypoxia-induced retinal angiogenesis in zebrafish as a model to study retinopathy[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2748.
- [47] Rouhi P, Jensen LD, Cao Z, et al. Hypoxia-induced metastasis model in embryonic zebrafish[J]. Nat Protoc, 2010, 5(12): 1911-1918.
- [48] Weinstein BM, Schier AF, Abdelilah S, et al. Hematopoietic mutations in the zebrafish[J]. Development, 1996, 123: 303-309.
- [49] Ransom DG, Haffter P, Odenthal J, et al. Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis[J]. Development, 1996, 123: 311-319.
- [50] Jing CB, Chen Y, Dong M, et al. Phospholipase C gamma-1 is required for granulocyte maturation in zebrafish[J]. Dev Biol, 2013, 374(1): 24-31.
- [51] Gao L, Li D, Ma K, et al. TopBP1 governs hematopoietic stem/progenitor cells survival in zebrafish definitive hematopoiesis[J]. PLoS Genet, 2015, 11(7): e1005346.
- [52] Huang HT, Kathrein KL, Barton A, et al. A network of epigenetic regulators guides developmental haematopoiesis *in vivo*[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(12): 1516-1525.
- [53] Bielczyk-Maczynska E, Serbanovic-Canic J, Ferreira L, et al. A loss of function screen of identified genome-wide association study Loci reveals new genes controlling hematopoiesis[J]. PLoS Genet, 2014, 10(7): e1004450.
- [54] Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Flynn CM, et al. Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish[J]. PLoS Biol, 2005, 3(8): e254.
- [55] North TE, Goessling W, Walkley CR, et al. Prostaglandin E2 regulates vertebrate haematopoietic stem cell homeostasis[J]. Nature, 2007, 447(7147): 1007-1011.
- [56] Cunningham L, Finckbeiner S, Hyde RK, et al. Identification of benzodiazepine Ro5-3335 as an inhibitor of CBF leukemia through quantitative high throughput screen against RUNX1-CBF β interaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(36): 14592-14597.
- [57] Ridges S, Heaton WL, Joshi D, et al. Zebrafish screen identifies novel compound with selective toxicity against leukemia[J]. Blood, 2012, 119(24): 5621-5631.
- [58] Li P, Lahvic JL, Binder V, et al. Epoxyeicosatrienoic acids enhance embryonic haematopoiesis and adult marrow engraftment[J]. Nature, 2015, 523(7561): 468-471.
- [59] Tamplin OJ, Durand EM, Carr LA, et al. Hematopoietic stem cell arrival triggers dynamic remodeling of the perivascular niche[J]. Cell, 2015, 160(1-2): 241-252.

