

# M2 型丙酮酸激酶在糖尿病视网膜病变中的作用

田雅静<sup>1</sup>, 曹鑫<sup>1</sup>, 段程伟<sup>2</sup>, 王晓乐<sup>1</sup>, 华玲艳<sup>1</sup>, 宋愈<sup>1</sup>

引用: 田雅静, 曹鑫, 段程伟, 等. M2 型丙酮酸激酶在糖尿病视网膜病变中的作用. 国际眼科杂志 2022;22(2):249-254

基金项目: 南通市科学技术局项目 (No. JC2021188, MSZ21084)

作者单位: (226001) 中国江苏省南通市, 南通大学第二附属医院<sup>1</sup>眼科; <sup>2</sup>临床医学研究中心

作者简介: 田雅静, 南通大学在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病性视网膜病变。

通讯作者: 宋愈, 毕业于南通大学医学院, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 白内障、眼底病. songyuleye@126.com

收稿日期: 2021-06-14 修回日期: 2021-12-28

## 摘要

糖尿病视网膜病变 (DR) 是一种糖尿病中最常见的高度特异性微血管并发症, 是全球 20~65 岁人群视力障碍和失明的主要原因, 主要表现为视网膜内微血管的异常及新生血管的形成。糖酵解过程是从葡萄糖分解开始到丙酮酸生成的过程, 可以为机体迅速提供能量, 内皮细胞多数通过糖酵解产生的 ATP 来维持其功能, 包括维持紧密连接和屏障作用。丙酮酸激酶 (PK) 的 M2 亚型 (PKM2) 作为糖酵解的关键酶, 在机体的大多数组织中均有表达。内皮细胞和光感受器细胞作为视网膜中的重要细胞成分, 在 DR 的发生发展过程中发挥重要作用。研究表明, PKM2 通过代谢和非代谢方式调节内皮细胞和光感受器的功能, 在 DR 发展中发挥重要作用。因此, 本文将重点通过内皮细胞和光感受器细胞两个方面来综述 PKM2 在糖尿病视网膜病变中的研究进展, 从而为 DR 的诊断和治疗提供新思路。

**关键词:** 糖尿病视网膜病变; M2 型丙酮酸激酶; 内皮细胞; 光感受器; 有氧糖酵解

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.2.15

## Role of M2 isoform of pyruvate kinase in diabetic retinopathy

Ya-Jing Tian<sup>1</sup>, Xin Cao<sup>1</sup>, Cheng-Wei Duan<sup>2</sup>, Xiao-Le Wang<sup>1</sup>, Ling-Yan Hua<sup>1</sup>, Yu Song<sup>1</sup>

**Foundation items:** Nantong Science and Technology Bureau Project (No. JC2021188, MSZ21084)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup>Clinical Medical Research Center, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Yu Song. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. songyuleye@126.com

Received: 2021-06-14 Accepted: 2021-12-28

## Abstract

• Diabetic retinopathy (DR), one of the most common diabetes-specific microvascular complications, is classically described by intraretinal microvascular abnormalities and neovascularization. It is the main reason why visual impairment and blindness in people aged 20 - 65 years worldwide. Glycolysis can provide energy by converting glucose into pyruvate. Endothelial cells mainly utilize glycolysis to produce ATP to maintain the function, including forming tight junctions and barrier functions. Pyruvate kinase (PK) M2 (M2 isoform of pyruvate kinase) is a key enzyme of glycolysis and is widely expressed in most tissues. As major cellular components in the retina, endothelial cells and photoreceptor cells play a crucial role in the occurrence and development of DR. Studies have shown that PKM2 takes part in the development of DR by regulating the function of endothelial cells and photoreceptors in metabolic and non-metabolic ways. Therefore, this article overviews the role of PKM2 in DR from the direction of endothelial cells and photoreceptor cells and provides new insight into the diagnosis and treatment of DR.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; M2 isoform of pyruvate kinase; endothelial cells; photoreceptor; aerobic glycolysis

**Citation:** Tian YJ, Cao X, Duan CW, et al. Role of M2 isoform of pyruvate kinase in diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(2):249-254

## 0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种与持续高血糖相关的慢性、进行性、潜在危害视力的高度特异性的视网膜微血管疾病, 主要病理改变包括视网膜炎、视网膜微血管病变及增殖期新生血管的形成<sup>[1-2]</sup>。有氧糖酵解是肿瘤细胞重要特征之一, 指即使在氧气充足的条件下, 细胞仍可以通过糖酵解产生能量, 也称为 Warburg 效应<sup>[3]</sup>, 不仅可以迅速为机体提供能量, 还可以产生大量的中间产物促使生物合成。最近的研究发现, 内皮细胞多数通过糖酵解产生的 ATP 来维持其功能<sup>[4]</sup>。M2 型丙酮酸激酶 (M2 isoform of pyruvate kinase, PKM2) 作为糖酵解途径的关键酶, 通过糖酵解作用调节内皮细胞的功能, 亦可转移进入细胞核, 作为蛋白激酶发挥转录调控等非糖酵解作用<sup>[5]</sup>, 进一步在 DR 等多种炎症性疾病中发挥作用。

## 1 PKM2 简介

丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK) 作为糖酵解过程中的最后一个限速酶, 将磷酸烯醇式丙酮酸 (phosphoenolpyruvic acid, PEP) 转化为丙酮酸并产生 ATP,

在调节细胞代谢中起着关键作用<sup>[6]</sup>。研究发现,PKR 和 PKM 两种基因编码 PK 的四种亚型,由于基因的选择性剪切,不同亚型的表达和分布可反映其组织特异性<sup>[7]</sup>。PKR 基因编码的 PKL 和 PKR 亚型分别在肝脏和红细胞中表达;PKM 基因在其他多数组织中都有表达,可选择性剪切形成 PKM1(包含 9 外显子)或 PKM2(包含 10 外显子)亚型。M1 型丙酮酸激酶(M1 isoform of pyruvate kinase, PKM1)主要表达于骨骼肌、大脑和心脏;PKM2 主要表达在增殖细胞,如胚胎细胞和肿瘤细胞等<sup>[7-8]</sup>,近几年研究表明,PKM2 在内皮细胞等非增殖细胞中也有表达。PKM1 只有稳定的四聚体形式,发挥经典的 PK 活性;而 PKM2 则以单体、二聚体和四聚体等不同形式存在<sup>[9]</sup>,从而发挥不同的功能。PKM2 的活性可以通过稳定或破坏四聚体的构型来控制,其四聚体的形式受多种修饰调节,如磷酸化、氧化及去乙酰化等,还受其上游的糖酵解中间体——果糖 1-6-二磷酸(fructose-1-6-diphosphate,FBP)的变构激活<sup>[10]</sup>。与 FBP 结合形成的四聚体构型,仅限于胞浆,发挥经典的 PK 活性,促进糖酵解通量,限制有氧糖酵解,促进氧化磷酸化<sup>[10]</sup>。PKM2 经过翻译后修饰,以对底物亲和力低的二聚体形式存在,具有低 PK 活性,可以转移到细胞核中,发挥蛋白激酶活性,不仅可以促进有氧糖酵解,导致糖酵解中间体的积累,有助于合成代谢所需的生物大分子<sup>[10-12]</sup>,还可以调控炎症相关基因的转录,促进细胞周期进展及细胞增殖等<sup>[13]</sup>;此外,非糖酵解代谢物、氨基酸和小分子化合物等其他的内源性调节因子也影响 PKM2 的活性。其中小分子 DASA-58 和 TEPP-46 作为 PKM2 的高度特异性激活剂,主要是通过稳定四聚体构型,使 PKM2 的动力学参数几乎与 PKM1 相同,作为催化糖酵解最后一步的限速酶,为三羧酸循环提供丙酮酸,该过程可以逆转 PKM2 第 105 位酪氨酸位点(Y105)磷酸化的效应<sup>[11]</sup>。在没有变构激活剂的情况下,PKM2 主要以二聚体或单体形式存在,由于缺乏酶活性,会导致糖酵解中间体的积累,从而利于被激活或增殖细胞合成需要<sup>[11,14]</sup>。

PKM2 具有糖酵解和非糖酵解功能:一方面,它可以通过其糖酵解功能为增殖细胞优化能量供应和促进底物的合成,糖酵解增多引起的局部酸性微环境促进血管生成;另一方面,在表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)或白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)等上游因素的刺激下,PKM2 会发生二聚化并转移到核内,作为组蛋白激酶或转录辅激活因子发挥非代谢作用<sup>[15]</sup>。在肿瘤的相关研究中表明,PKM2 可通过直接结合并磷酸化信号转导与转录激活因子 3(signal transduction and transcriptional activators, STAT3),增强其与受调控基因的启动子结合,促进基因的转录及细胞周期的进展<sup>[11]</sup>。PKM2 作为磷酸酪氨酸结合蛋白,受到低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的调控,同时,核内 PKM2 可以直接与 HIF-1 $\alpha$  的转录激活结构域结合<sup>[16]</sup>,形成一个 PKM2/HIF-1 $\alpha$  正反馈回路,从而在核 PKM2 诱导的细胞周期进程和细胞糖酵解通量中起重要作用。PKM2 可以在 JMJD5 的调控作用下进一步促进 HIF-1 $\alpha$  的转录活性,增强 HIF-1 $\alpha$  下游的基因转录,包括乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDHA)和葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1),促进有氧糖酵解,以及促进炎症相

关因子如白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )的表达<sup>[17]</sup>。此外,核内 PKM2 还可以通过激活  $\beta$ -连环蛋白参与糖酵解相关酶的调控,促进 Warburg 效应<sup>[18]</sup>,或者通过参与组蛋白 H3 的乙酰化调控某些特定基因的表达<sup>[19]</sup>。近年来,PKM2 在 DR 等炎症性疾病的作用引起了广泛的关注。研究发现,PKM2 在氧化应激作用下会发生二聚化并转移进入线粒体中,通过稳定 Bcl2 调节氧化应激诱导的细胞凋亡<sup>[20]</sup>。在 DR 中,与高血糖诱导的细胞炎症和损伤密切相关的膜蛋白——STEAP4(six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 4),可以通过抑制 HIF-1 $\alpha$ /PKM2 信号通路,减少高血糖诱导的视网膜血管内皮细胞的损伤和凋亡<sup>[21]</sup>。在肾脏疾病的研究中,二聚体形式的 PKM2 通过核移位诱导上皮-间充质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)和有氧糖酵解,从而参与肾脏纤维化<sup>[22]</sup>。高糖条件下诱导 HUVECs 的体外模型表明,PKM2 可以二聚并转移到细胞核中,通过 STAT3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路进一步调节 ICAM-1 的表达水平,从而参与 2 型糖尿病肾病的炎症调控<sup>[23]</sup>。HIF-1 $\alpha$  作为血管生成和糖酵解的重要环节之一,在缺氧的胰腺肿瘤中,PKM2 可以移位到细胞核通过 HIF-1 $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B 共同调节 VEGFA 的转录和分泌,从而参与血管生成<sup>[24]</sup>。此外,Zhang 等<sup>[25]</sup>发现 FOXM1D(Fork head box M1)作为一种转录因子,可以与 PKM2、importin4、NF- $\kappa$ B 和 VPS11 等多种蛋白相互作用,它通过与 PKM2 组装异位聚合体来促进有氧糖酵解,通过增加 VEGF 的表达和释放来促进血管生成。因此,PKM2 的二聚体形式可通过核移位与重要的转录因子如 STAT3、HIF-1 $\alpha$ 、Erk1/2 及 Bcl-2 相互作用,进而调控细胞增殖、凋亡及血管生成<sup>[11]</sup>,在炎症性疾病中发挥重要作用。

## 2 DR 简介

DR 是糖尿病最常见的一种高度特异性并发症,是由持续高血糖引起的伴有血管病变的代谢性疾病<sup>[26-29]</sup>。DR 在全球糖尿病患者中的发病率约为 1/3,其中约 1/10 的患者表现为威胁视力的糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema, DME)或增殖性糖尿病视网膜病变(proliferative diabetic retinopathy, PDR)<sup>[29]</sup>。视网膜微血管病变是 DR 的基本病理过程<sup>[30]</sup>,视网膜血管基底膜增厚是 DR 的一个组织学特征<sup>[31]</sup>,血视网膜屏障(blood retinal barrier, BRB)的破坏,包括紧密连接的毛细血管内皮细胞构成的视网膜内屏障,及由视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)组成的视网膜外屏障,也作为其病理变化之一<sup>[32]</sup>。DR 的发病机制复杂,涉及到炎症、免疫激活及氧化应激,包括晚期糖基化终产物(AGEs)的增加、过氧化物产物的升高、内质网应激和蛋白激酶 C 的激活、白介素的升高<sup>[33]</sup>。近来研究表明,基因、环境及表观遗传学也在其中发挥重要作用。大量研究表明,糖尿病的持续时间和高血糖的严重程度在 DR 中起着重要作用<sup>[34]</sup>。持续高血糖引起视网膜缺血缺氧,导致 HIF-1 $\alpha$  表达增加,可进一步增加 VEGF 的表达,从而促进 DR 的新生血管形成<sup>[34-36]</sup>。在之前的体内体外研究表明,DR 不仅具有血管生成疾病的许多特征,而且具有低级别炎症性疾病的许多特征<sup>[37]</sup>。糖尿病引起的视网膜损伤与持续高血糖介导的慢性低级别炎症状态,会引起视网膜毛细血管周细胞的选择性丢

失,周细胞(perithelial cells,PCs)作为BRB的重要组成部分,维持内皮细胞间紧密连接<sup>[38]</sup>,PCs的丢失或功能障碍会相应地伴随着毛细血管内皮细胞的丧失<sup>[39]</sup>,导致视网膜屏障破坏及渗透性增加,引起血管功能障碍<sup>[40]</sup>。高血糖条件下的代谢异常,会导致氧化应激的增加,进一步促进NF- $\kappa$ B和HIF-1 $\alpha$ 的活化,此外,炎症细胞因子、趋化因子和黏附分子活性的增加亦可导致毛细血管闭塞和微血管渗漏引起视网膜缺血,从而加重糖尿病引起的黄斑水肿和新生血管形成<sup>[41]</sup>。越来越多的证据表明,内皮细胞代谢障碍在DR等眼部新生血管性疾病中起着重要的作用<sup>[42]</sup>。糖酵解是内皮细胞增殖和血管生成的驱动力,同时是维持视网膜进行光转导和神经传递的重要能量来源<sup>[43]</sup>,PKM2作为糖酵解的关键调控因子,在维持细胞的功能及炎症性疾病中发挥重要作用,因此我们推测PKM2可能参与糖尿病视网膜病变的发生和发展过程。

### 3 PKM2与DR

#### 3.1 PKM2通过内皮细胞参与DR的进展

**3.1.1 PKM2在内皮细胞中的表达** 内皮细胞(endothelial cells,ECs)位于血管和血管壁的交界面,作为血管的组成部分,在控制血管的张力和内稳态方面发挥重要作用<sup>[44]</sup>。一方面,大多数ECs基本上是静止的,分布在血管壁上,为溶质提供屏障,维持血流内稳态<sup>[8]</sup>。静止的ECs与癌细胞明显不同:它们退出细胞周期,进入静止状态,并受到接触抑制,通过形成紧密连接来发挥屏障作用<sup>[8]</sup>。另一方面,ECs可以通过生理刺激或创伤、炎症、肿瘤等病理刺激被激活,迅速增殖,侵入缺氧和缺血组织,参与血管重建,这一过程被称为血管生成<sup>[8]</sup>。ECs通过增殖、迁移和管状结构的形成在血管生成过程中起中心作用<sup>[4,16]</sup>。最近的研究表明,ECs具有高糖酵解率,在生理状态下,这些细胞在无氧条件下代谢近90%的葡萄糖以产生乳酸<sup>[4,45]</sup>。PKM2作为糖酵解途径的关键酶,在调节细胞代谢中起着关键作用。研究发现,在小鼠和人类的增殖细胞和静止细胞以及大血管和微血管系统中,PKM2都是PK的主要异构体<sup>[8]</sup>,即使是静止的ECs也主要表达PKM2而不是PKM1<sup>[8]</sup>,以维持血管完整性和内皮生长<sup>[44]</sup>。此外,研究发现,ECs像肿瘤细胞一样,通过糖酵解消耗大量的葡萄糖,即使有氧气存在,也会通过糖酵解产生能量,这种现象在肿瘤生物学中被称为有氧糖酵解或Warburg效应<sup>[46]</sup>,其主要表现为葡萄糖摄取和乳酸生成增加,它既提供细胞功能所需的ATP,也提供中间代谢物,为其他生物大分子合成提供营养<sup>[47]</sup>。PKM2作为有氧糖酵解的关键调控因子之一<sup>[48]</sup>,与PKM1相比,具有更高的有氧糖酵解率。研究人员<sup>[49]</sup>通过对H1299细胞稳定沉默PKM2,发现PKM2是有氧糖酵解和癌细胞增殖所必需的。既往大多致力于PKM2在肿瘤细胞中的研究,近年来PKM2在ECs中的作用也得到了广泛的关注。PKM2是ECs糖酵解所必需的,PKM2表达降低的ECs,糖酵解受损,siPKM2显著抑制ECs的糖酵解通量<sup>[8]</sup>。研究者<sup>[50]</sup>在淋巴管畸形的相关研究中,采用紫草素及通过shRNA-PKM2转染抑制人真皮淋巴内皮细胞(human dermal lymphatic endothelial cells, HDLECs)中PKM2表达,检测发现糖酵解相关指标均下调,进一步分析表明过表达PKM2促进HDLECs的增殖、迁移和管的形成,从而表明PKM2可能通过糖酵解在淋

巴管畸形中发挥重要作用。尽管大量的证据表明PKM2介导的糖酵解与快速增殖疾病密切相关,比如肿瘤,ECs通过增殖、迁移和管的形成参与血管生成,如前所述,HDLECs中的PKM2通过参与淋巴管生成在淋巴管畸形中发挥重要作用,但PKM2是否通过ECs参与DR等炎症性疾病的血管生成,其具体的作用机制还需要进一步探索。

**3.1.2 PKM2参与ECs的紧密连接** ECs功能障碍在DR的发病过程中发挥重要作用,静止的ECs可通过分泌基底膜,招募PCs,促进钙黏素(VE-cadherin)的表达上调形成紧密连接,维持血管屏障功能。VE-cadherin位于内皮细胞连接处,是ECs间连接形成和稳定的主要调控因子,PKM2活性及其介导的局部ATP的产生调节钙黏素的动态和内化,从而参与血管屏障功能的维持,PKM2沉默破坏连接的稳定性,导致紧密连接和屏障功能的退化<sup>[4]</sup>。Kim等<sup>[8]</sup>通过体内体外实验证明,在融合接触抑制的内皮细胞中,PKM2是血管屏障功能所必需的,进一步表明PKM2通过抑制NF- $\kappa$ B和ANGPT2的表达来维持血管屏障功能,这一作用独立于PK活性。MMP-1是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的家族成员之一,作为加速糖尿病血管疾病进展的重要危险因素,可以损伤血管内皮细胞的屏障功能。唐磊等<sup>[19]</sup>通过体外培养人脐带静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVECs),采用PKM2激活剂TEPP-46处理细胞,表明PKM2具有调节MMP-1表达的作用,进一步证明高糖通过上调mTORC2的表达,促进PKM2磷酸化,进而促进其二聚化并且核转位来调控MMP-1的表达,参与ECs血管屏障损害。PKM2对于ECs介导的血管屏障的维持是必不可少的,因此我们推测PKM2可能通过参与视网膜毛细血管内皮间的紧密连接,在DR的发生发展中发挥作用。

**3.1.3 PKM2参与ECs的增殖和迁移** PDR最核心的表现为视网膜新生血管的形成。新生血管的萌生是一个多步骤的过程,包括ECs的增殖、细胞外基质蛋白的水解、ECs向缺氧刺激部位的迁移、管样结构的形成、环路的发育以及周边细胞的招募等<sup>[51]</sup>。既往研究表明,这一级联反应受到血管生成因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的严格控制。在视网膜血管生成中,持续的VEGF梯度最终将到达现有的血管前端,与内ECs中的VEGFR2结合,使这些ECs成为尖端细胞,进一步延伸形成新芽,参与血管生成<sup>[33,52]</sup>。但新的概念表明,ECs在代谢途径中的变化也调节血管生成<sup>[53]</sup>。糖酵解被认为是ECs增殖和血管生成的驱动力,PKM2作为糖酵解的关键酶,其PK活性对于内皮细胞增殖和集体迁移是不可避免的<sup>[8]</sup>。Zhang等<sup>[54]</sup>在肺动脉高压(PAH)患者及PAH模型中证明PKM2激活可抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移。Li等<sup>[55]</sup>研究发现,血液循环中的PKM2通过增加血管ECs迁移和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)附着,促进肿瘤血管生成。糖酵解增加而引起的乳酸水平上调也可通过促进HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达,进一步通过VEGFA/VEGFR2信号通路最终诱导血管生成<sup>[33]</sup>。大量研究致力于PKM2在肿瘤血管生成中的作用,然而,它在正常增殖细胞如血管常驻内皮祖细胞

(VR-EPCs)中的作用尚不清楚, Ren等<sup>[56]</sup>从SD大鼠心脏中分离出VR-EPCs,分别采用PKM2激活剂(DASA-58)及PKM2抑制剂(compound 3K, C3K)探讨PKM2在大鼠中的作用,发现PKM2通过调节糖酵解、线粒体分裂和融合调节VR-EPCs的血管生成。PKM2的丢失限制了ECs的生长并触发先天免疫信号,为了了解PKM2对血管生成发芽的功能重要性, Stone等<sup>[45]</sup>评估了ECs、原代细胞、斑马鱼和小鼠的迁移和增殖,发现PKM2的缺失损害了EC在体内的增殖和迁移,结果表明PKM2是内皮迁移和增殖的关键调控因子,其缺失会抑制血管扩张,阻碍血管新生。为了研究PKM2在ECs参与的血管新生中的作用, Gómez-Escudero等<sup>[41]</sup>通过采用紫草素及2-DG等抑制PKM2后进行血管生成相关实验,结果表明PKM2沉默破坏ECs的集体迁移,PKM2活性参与新生血管的调节,从而说明PKM2是体内体外血管新生所必需的,而这一作用主要是通过介导ATP的产生调节ECs集体迁移实现的。这一结论与之前的研究是一致的,即在出生后的小鼠中,PKM2沉默和紫草素处理后,小鼠的视网膜发生血管缺陷。PKM2是Warburg效应的关键调控因子之一,最近研究表明,抑制VEGF诱导的HUVECs的糖酵解,对管的形成和迁移有明显的抑制作用,白藜芦醇(resveratrol, RST)通过调控ECs中Erk1/2磷酸化介导的PKM2核易位来抑制有氧糖酵解,进一步抑制血管生成<sup>[16]</sup>。对于依赖PKM2的有氧糖酵解,主要是通过二聚体形式的蛋白激酶活性调控的<sup>[12]</sup>。EGFR磷酸化PKM2,促进PKM2二聚化并转移进细胞核,作为蛋白激酶发挥作用,上调c-Myc及cyclin D1的表达,进而促进有氧糖酵解和细胞周期的进展<sup>[57]</sup>。因此,PKM2可以通过其经典的PK作用参与血管新生;在某些刺激作用下,亦可通过二聚体核易位发挥蛋白激酶作用,促进血管生成。

### 3.2 PKM2通过光感受器细胞参与DR的进展

**3.2.1 PKM2在光感受器细胞中的表达及作用** 视网膜的感光功能主要在视网膜的神经上皮内完成,是由视网膜光感受器介导的,主要包括视杆细胞和视锥细胞。视网膜是高度代谢的,其光感受器细胞的外节不断脱落,需要RPE细胞持续吞噬、代谢<sup>[58]</sup>,为了满足代谢需求,它们需要不断的视紫红质转换,所需要的能量来源于有氧糖酵解<sup>[59]</sup>。糖酵解对于感光细胞的存活是必不可少的,该通路的消融导致视网膜变性,而该通路上调具有神经保护作用,可防止视锥细胞变性<sup>[60]</sup>。作为糖酵解的重要调控因子<sup>[48]</sup>,PKM2主要表达于光感受器的内节和外丛状层<sup>[61]</sup>。在视网膜中,PKM2介导的有氧糖酵解不仅为细胞提供能量,而且为细胞增殖和血管生成方面提供物质基础,包括核酸、蛋白质等。对视网膜感光细胞的研究表明,PKM2在杆状和锥状细胞中都是主要的亚型,以代谢和非代谢形式调节感光细胞,在感光细胞的功能和存活中发挥重要作用<sup>[62]</sup>。

### 3.2.2 PKM2通过调节光感受器细胞参与DR的进展

DR通常伴有进行性视力丧失<sup>[63]</sup>。在许多视网膜疾病中,光感受器细胞死亡是视力丧失的最终原因<sup>[64]</sup>。在DR中,随着疾病的进展,RPE细胞之间的紧密连接复合体被拆解,引起视网膜外屏障的破坏,导致血管渗漏<sup>[58]</sup>,引起视力丧失。PKM2作为一种糖酵解酶,发挥代谢作用,其

活性的调节可导致糖酵解中间体的积累,并增加戊糖磷酸途径的通量,与光感受器的存活密切相关。在主要表达PKM2的细胞中,ML-265可将PK活性提高到与仅表达PKM1亚型的细胞相当的水平,研究人员<sup>[65]</sup>通过玻璃体腔将ML-265注射到大鼠眼睛,利用661W锥形细胞,发现ML-265可以在细胞环境中增加PK活性,从而规避光感受器凋亡<sup>[64]</sup>。Qi等<sup>[66]</sup>研究发现,糖尿病条件下的高血糖会通过磺化作用降低小鼠肾小球和培养的足细胞中PKM2四聚体的形成和活性,PKM2激活可防止糖尿病性肾小球病变和线粒体功能障碍的进展。因此,糖尿病患者视力下降可能是由于糖尿病引起PKM2的PK活性水平降低<sup>[66]</sup>。此外,PKM2还具有非代谢作用,Rajala等<sup>[67]</sup>有条件地敲除杆状细胞光感受器中的PKM2,发现杆状细胞中PKM1的表达代偿性增加,体外分析也表明PKM2能够调控磷酸二酯酶6 $\beta$ (phosphodiesterase 6 $\beta$ , Pde6 $\beta$ )启动子调节视觉功能的转录活性,参与调节光感受器的功能,从而说明PKM2的代谢和转录调节功能可能有助于光感受器的结构、功能和活力。该研究组通过类似研究表明PKM2在锥细胞的合成代谢过程中是至关重要的,以保持它们的正常功能和支持锥细胞结构<sup>[60]</sup>。之前有研究报道,PKM2在肿瘤中发挥代谢和非代谢作用,为了进一步研究PKM2在DR的代谢和非代谢作用,Rajala等<sup>[62]</sup>采用具有肥胖和2型糖尿病表型的小鼠模型,发现PKM2表达降低而PKM1表达不变,因此推测PKM1在PKM2水平降低时代偿性增高可能是db/db小鼠视网膜中PK活性升高的原因。最近研究表明<sup>[68]</sup>,在视网膜脱离(retinal detachment, RD)中,视网膜外部会出现急性营养缺乏,在自噬存在的情况下,会导致PKM2的酪氨酸磷酸化降低,从而提高了PK活性,可能促进分解代谢和ATP的产生,以防止细胞死亡,而自噬的缺失使得PKM2保持磷酸化并处于低活性状态,不利于光感受器的存活。视网膜脱离同时也作为DR的晚期表现之一,PKM2通过代谢及非代谢作用参与DR的进展,然而,其具体的作用机制还需要进一步研究,PKM2可能作为治疗DR的一个靶点。

### 4 总结与展望

目前对于PKM2参与DR的研究主要集中于光感受器方面,其驱动的糖酵解对于光感受器功能维持是至关重要的。众所周知,DR是由慢性高血糖引起的微血管并发症,持续的高血糖及其介导的慢性低度炎症在DR的病理机制中发挥重要作用。ECs在血管生成各个步骤中发挥重要作用,越来越多的证据表明,ECs代谢障碍在DR的发生发展过程中起着重要的作用。近年来,PKM2在糖尿病肾病等炎症性疾病中的作用受到广泛关注。如前所述,PKM2可以通过代谢和非代谢作用参与内皮细胞及光感受器细胞的功能。最近研究表明,自噬是光感受器在DR中维持自身稳态和提高存活率所必需的,这一作用可能是自噬通过改变糖酵解中的关键酶包括HK2和PKM2实现的,然而具体的机制还需要进一步研究。目前,对于PKM2通过内皮细胞参与DR的相关研究还在进展阶段,研究人员仅提出STEAP4可以抑制HIF-1 $\alpha$ /PKM2信号通路降低高血糖诱导的视网膜血管内皮细胞的凋亡。VEGFA作为HIF-1 $\alpha$ 的靶分子,同时也是血管生成的重要调控因子,研究表明,PKM2/HIF-1 $\alpha$ 正反馈通路在肿

瘤的血管生成过程中发挥重要作用,肿瘤中的血管生成与DR中的血管生成类似,均表现为微血管异常生长,因此我们猜测PKM2/HIF-1 $\alpha$ 可能在DR的血管生成过程中发挥重要作用,其具体的作用机制还值得进一步探讨。因此,PKM2是否会通过参与血管新生在DR的进展中发挥重要作用,及其具体的作用机制还值得进一步探讨,而其深入的研究,对于DR的诊断和治疗具有一定的指导意义。

#### 参考文献

- 1 Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight* 2017;2(14):e93751
- 2 Wong TY, Cheung CM, Larsen M, et al. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16012
- 3 Supabphol S, Seubwai W, Wongkham S, et al. High glucose: an emerging association between diabetes mellitus and cancer progression. *J Mol Med (Berl)* 2021;99(9):1175-1193
- 4 Gómez-Escudero J, Clemente C, García-Weber D, et al. PKM2 regulates endothelial cell junction dynamics and angiogenesis via ATP production. *Sci Rep* 2019;9(1):15022
- 5 Zhang Z, Deng X, Liu Y, et al. PKM2, function and expression and regulation. *Cell Biosci* 2019;9:52
- 6 Apostolidi M, Vathiotis IA, Muthusamy V, et al. Targeting pyruvate kinase M2 phosphorylation reverses aggressive cancer phenotypes. *Cancer Res* 2021;81(16):4346-4359
- 7 Alquraishi M, Puckett DL, Alani DS, et al. Pyruvate kinase M2: a simple molecule with complex functions. *Free Radic Biol Med* 2019;143:176-192
- 8 Kim B, Jang C, Dharaneeswaran H, et al. Endothelial pyruvate kinase M2 maintains vascular integrity. *J Clin Invest* 2018;128(10):4543-4556
- 9 Shirai T, Nazarewicz RR, Wallis BB, et al. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *J Exp Med* 2016;213:337-354
- 10 Wang Y, Liu J, Jin X, et al. O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect. *PNAS* 2017;114(52):13732-13737
- 11 Alves-Filho JC, Pålsson-Mcdermott EM. Pyruvate kinase M2: a potential target for regulating inflammation. *Front Immunol* 2016;7:145
- 12 Yang P, Li Z, Fu R, et al. Pyruvate kinase M2 facilitates colon cancer cell migration via the modulation of STAT3 signalling. *Cell Signal* 2014;26(9):1853-1862
- 13 时蒙昆, 时雨, 王群, 等. 肿瘤中M2型丙酮酸激酶的表达、功能及调节. *复旦学报(医学版)* 2017;44(2):217-223
- 14 Hu K, Xu J, Fan K, et al. Nuclear accumulation of pyruvate kinase M2 promotes liver regeneration via activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Life Sci* 2020;250:117561
- 15 Yang W, Zheng Y, Xia Y, et al. ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect. *Nat Cell Biol* 2012;14:1295-1304
- 16 Wu H, He L, Shi J, et al. Resveratrol inhibits VEGF-induced angiogenesis in human endothelial cells associated with suppression of aerobic glycolysis via modulation of PKM2 nuclear translocation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;45(12):1265-1273
- 17 Wang HJ, Hsieh YJ, Cheng WC, et al. JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1 $\alpha$ -mediated glucose metabolism. *PNAS* 2014;111(1):279-284
- 18 Zhang R, Shen M, Wu C, et al. HDAC8-dependent deacetylation of PKM2 directs nuclear localization and glycolysis to promote proliferation

- in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 2020;11(12):1036
- 19 唐磊, 徐逸洲, 刘晓靖, 等. 高糖通过mTORC2-PKM2信号通路促进内皮细胞MMP-1的表达. *中南大学学报(医学版)* 2020;45(3):305-313
- 20 Liang J, Cao R, Wang X, et al. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. *Cell Res* 2017;27(3):329-351
- 21 Liu L, Xu H, Zhao HY, et al. STEAP4 inhibits HIF-1 $\alpha$ /PKM2 signaling and reduces high glucose-induced apoptosis of retinal vascular endothelial cells. *Diabetes Metab Syndr Obes: Targets Ther* 2020;13:2573-2582
- 22 Liu H, Takagaki Y, Kumagai A, et al. The PKM2 activator TEPP-46 suppresses kidney fibrosis via inhibition of the EMT program and aberrant glycolysis associated with suppression of HIF-1 $\alpha$  accumulation. *J Diabetes Investig* 2021;12(5):697-709
- 23 Li L, Tang L, Yang XP, et al. Gene regulatory effect of pyruvate kinase M2 is involved in renal inflammation in type 2 diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2020;128(9):599-606
- 24 Azoitei N, Becher A, Steinestel K, et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 $\alpha$  through NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cancer* 2016;15:3
- 25 Zhang W, Zhang X, Huang S, et al. FOXM1D potentiates PKM2-mediated tumor glycolysis and angiogenesis. *Mol Oncol* 2021;15(5):1466-1485
- 26 Zeng Y, Cui Z, Liu J, et al. MicroRNA-29b-3p promotes human retinal microvascular endothelial cell apoptosis via blocking SIRT1 in diabetic retinopathy. *Front Physiol* 2019;10:1621
- 27 Mugisho OO, Green CR, Kho DT, et al. The inflammasome pathway is amplified and perpetuated in an autocrine manner through connexin43 hemichannel mediated ATP release. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2018;1862(3):385-393
- 28 Wang W, Lo A. Diabetic retinopathy: pathophysiology and treatments. *Int J Mol Sci* 2018;19(6):1816
- 29 Xuan Q, Ouyang Y, Wang Y, et al. Multiplatform metabolomics reveals novel serum metabolite biomarkers in diabetic retinopathy subjects. *Adv Sci (Weinh)* 2020;7(22):2001714
- 30 Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, et al. Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Surv Ophthalmol* 2002;47:S253-S262
- 31 Roy S, Kern TS, Song B, et al. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: implications for targeting diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 2017;187(1):9-19
- 32 Park DY, Lee J, Kim J, et al. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat Commun* 2017;8:15296
- 33 Zhang P, Zhou YD, Tan Y, et al. Protective effects of piperine on the retina of mice with streptozotocin-induced diabetes by suppressing HIF-1/VEGFA pathway and promoting PEDF expression. *Int J Ophthalmol* 2021;14(5):656-665
- 34 Shao J, Yao Y. Transthyretin represses neovascularization in diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2016;22:1188-1197
- 35 Hu L, Lv X, Li D, et al. The anti-angiogenesis role of FBXW7 in diabetic retinopathy by facilitating the ubiquitination degradation of c-Myc to orchestrate the HDAC2. *J Cell Mol Med* 2021;25(4):2190-2202
- 36 Zhang D, Lv FL, Wang GH. Effects of HIF-1 $\alpha$  on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(16):5071-5076
- 37 Lu Q, Lu P, Chen W, et al. ANGPTL-4 induces diabetic retinal inflammation by activating Profilin-1. *Exp Eye Res* 2018;166:140-150
- 38 Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, et al. Diabetic retinopathy:

- breaking the barrier. *Pathophysiology* 2017;24(4):229-241
- 39 Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004;350(1):48-58
- 40 Trotta MC, Maisto R, Guida F, et al. The activation of retinal HCA2 receptors by systemic beta-hydroxybutyrate inhibits diabetic retinal damage through reduction of endoplasmic reticulum stress and the NLRP3 inflammasome. *PLoS One* 2019;14(1):e0211005
- 41 Gui F, You Z, Fu S, et al. Endothelial dysfunction in diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:591
- 42 Li XR, Sun XD, Carmeliet P. Hallmarks of endothelial cell metabolism in health and disease. *Cell Metab* 2019;30(3):414-433
- 43 Ames A, Li YY, Heher EC, et al. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport. *J Neurosci* 1992;12(3):840-853
- 44 Siragusa M, Thöle J, Bibli SI, et al. Nitric oxide maintains endothelial redox homeostasis through PKM2 inhibition. *EMBO J* 2019;38(17):e100938
- 45 Stone OA, El-Brolosy M, Wilhelm K, et al. Loss of pyruvate kinase M2 limits growth and triggers innate immune signaling in endothelial cells. *Nat Commun* 2018;9(1):4077
- 46 Kim B, Li J, Jang C, et al. Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J* 2017;36(16):2321-2333
- 47 董振. SIRT6 通过 CDK4-CCND1 复合体调控沃伯格效应. 西南大学 2017
- 48 Prakasam G, Iqbal MA, Bamezai RNK, et al. Posttranslational modifications of pyruvate kinase M2: tweaks that benefit cancer. *Front Oncol* 2018;8:22
- 49 Siddiqui FA, Prakasam G, Chattopadhyay S, et al. Curcumin decreases Warburg effect in cancer cells by down-regulating pyruvate kinase M2 via mTOR-HIF1 $\alpha$  inhibition. *Sci Rep* 2018;8(1):8323
- 50 Jiang H, Zou Y, Zhao J, et al. Pyruvate kinase M2 mediates glycolysis in the lymphatic endothelial cells and promotes the progression of lymphatic malformations. *Am J Pathol* 2021;191(1):204-215
- 51 Zhu M, Liu X, Wang Y, et al. YAP via interacting with STAT3 regulates VEGF-induced angiogenesis in human retinal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 2018;373(1-2):155-163
- 52 Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, et al. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circ Res* 2015;116(7):1231-1244
- 53 Bock KD, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab* 2013;18(5):634-647
- 54 Zhang AK, Yu FF, Yu WD, et al. Pyruvate kinase M2 activation protects against the proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 2020;382(3):585-598
- 55 Li L, Zhang Y, Qiao J, et al. Pyruvate kinase M2 in blood circulation facilitates tumor growth by promoting angiogenesis. *J Biol Chem* 2014;289(37):25812-25821
- 56 Ren R, Guo J, Shi J, et al. PKM2 regulates angiogenesis of VR-EPCs through modulating glycolysis, mitochondrial fission, and fusion. *J Cell Physiol* 2020;235(9):6204-6217
- 57 Fitzgerald G, Soro-Arnaiz I, De Bock K. The Warburg effect in endothelial cells and its potential as an anti-angiogenic target in cancer. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:100
- 58 Jo DH, Yun JH, Cho CS, et al. Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Glia* 2019;67(2):321-331
- 59 Ng SK, Wood JP, Chidlow G, et al. Cancer-like metabolism of the mammalian retina. *Clin Exp Ophthalmol* 2015;43(4):367-376
- 60 Rajala A, Wang Y, Soni K, et al. Pyruvate kinase M2 isoform deletion in cone photoreceptors results in age-related cone degeneration. *Cell Death Dis* 2018;9(7):737
- 61 Lindsay KJ, Du J, Sloat SR, et al. Pyruvate kinase and aspartate-glutamate carrier distributions reveal key metabolic links between neurons and glia in retina. *PNAS* 2014;111(43):15579-15584
- 62 Rajala A, Soni K, Rajala RVS. Metabolic and non-metabolic roles of pyruvate kinase M2 isoform in diabetic retinopathy. *Sci Rep* 2020;10(1):1-12
- 63 Jackson GR, Barber AJ. Visual dysfunction associated with diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep* 2010;10(5):380-384
- 64 Wubben TJ, Pawar M, Weh E, et al. Small molecule activation of metabolic enzyme pyruvate kinase muscle isozyme 2, PKM2, circumvents photoreceptor apoptosis. *Sci Rep* 2020;10:2990
- 65 Luo WB, Semenza GL. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23(11):560-566
- 66 Qi W, Keenan HA, Li Q, et al. Pyruvate kinase M2 activation may protect against the progression of diabetic glomerular pathology and mitochondrial dysfunction. *Nat Med* 2017;23(6):753-762
- 67 Rajala A, Wang Y, Brush RS, et al. Pyruvate kinase M2 regulates photoreceptor structure, function, and viability. *Cell Death Dis* 2018;9(2):240
- 68 Xiao J, Yao J, Jia L, et al. Autophagy activation and photoreceptor survival in retinal detachment. *Exp Eye Res* 2021;205:108492