

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.09.001

## PKM2 对黑色素瘤细胞侵袭与迁移及巨噬细胞 M2 转变的影响\*

任晓朦<sup>1,2</sup>, 刘清霞<sup>3</sup>, 赵培庆<sup>4△</sup>

1. 滨州医学院第一临床医学院, 山东烟台 264003; 2. 山东省淄博市中心血站中心实验室, 山东淄博 255033; 3. 山东省淄博市张店区房镇镇卫生院妇幼保健科, 山东淄博 255030; 4. 山东省淄博市中心医院转化医学中心, 山东淄博 255036

**摘要:**目的 探讨黑色素瘤中丙酮酸激酶 M2(PKM2)的表达情况及其与预后相关性,阐明 PKM2 如何通过糖酵解途径影响黑色素瘤侵袭与迁移及对巨噬细胞 M2 转变的影响。方法 利用 TCGA 数据库及免疫组化分析 PKM2 在黑色素瘤组织中的表达情况;利用基因过表达、敲低及 ECAR 技术分析 PKM2 对黑色素瘤细胞糖酵解过程影响;通过划痕实验及 Transwell 实验验证 PKM2 对黑色素瘤细胞侵袭与迁移的影响;通过细胞共培养检测 PKM2 对巨噬细胞 M1/M2 转变的影响。结果 TCGA 数据库显示,与正常组织相比,PKM2 mRNA 水平在黑色素瘤组织中表达明显升高( $P<0.05$ ),且 PKM2 高表达水平患者的生存率低于低/中表达患者( $P=0.0018$ );免疫组化染色结果显示,PKM2 在黑色素瘤发生转移患者中的评分明显高于未转移患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。敲低 PKM2 表达后,黑色素瘤细胞糖酵解能力、糖酵解容量和乳酸水平均明显降低( $P<0.05$ )。细胞迁移实验结果显示,敲低 PKM2 表达后,黑色素瘤细胞的迁移和侵袭能力均明显降低,加入乳酸后,可部分逆转该现象。过表达组黑色素瘤巨噬细胞的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和一氧化碳合成酶(iNOS)水平低于对照组,而 CD206 和 CD163 水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );敲低组黑色素瘤巨噬细胞的 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平高于对照组,而 CD206 和 CD163 水低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 PKM2 可通过影响糖酵解进程促进黑色素瘤侵袭与迁移,并对肿瘤微环境中巨噬细胞的 M2 转变起促进作用,是黑色素瘤代谢治疗的潜在靶点。

**关键词:**丙酮酸激酶 M2; 黑色素瘤; 糖酵解; 侵袭与迁移; 巨噬细胞

中图分类号:R739.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)09-1185-07

PKM2 promotes melanoma invasion and migration and mediates macrophage M2 transformation\*

REN Xiaomeng<sup>1,2</sup>, LIU Qingxia<sup>3</sup>, ZHAO Peiqing<sup>4△</sup>

1. No. One Clinical Medicine School, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 2. Department of Central Laboratory, Zibo Central Blood Station, Zibo, Shandong 255033, China; 3. Department of Maternal and Child Health, Fangzhen Health Center of Zhangdian District, Zibo, Shandong 255030, China; 4. Translational Medical Center, Zibo Central Hospital, Zibo, Shandong 255036, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of PKM2 in melanoma and its correlation with prognosis, and to elucidate how PKM2 affects melanoma invasion and migration through the glycolytic pathway and its impact on macrophage M2 transformation. **Methods** The expression of PKM2 in melanoma was analyzed by TCGA database and immunohistochemistry; the effects of PKM2 on the glycolytic process of melanoma cells were analyzed by gene overexpression, knockdown and ECAR techniques; the effect of PKM2 on the invasion and migration of melanoma cells were verified by scratch and Transwell experiments; the effect of PKM2 on macrophage M2 transformation was elucidated by cell co-culture. **Results** The TCGA database showed that PKM2 mRNA levels were significantly higher in melanoma tissues compared with normal tissues ( $P<0.05$ ), and survival rate of patients with high PKM2 expression levels was lower than that of patients with low/medium expression ( $P=0.0018$ ); immunohistochemical staining showed that PKM2 scores in patients with metastases from melanoma were significantly higher than those in patients without metastatic patients, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). After knocking down PKM2 expression, melanoma cell glycolytic capacity, glycolytic capacity and lactate level were significantly reduced ( $P<0.05$ ). The results of cell migration assay showed that the migration and invasion ability of melanoma cells were significantly re-

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81972002);山东省自然科学基金面上项目(ZR2019MH099)。

作者简介:任晓朦,女,硕士研究生,主要从事肿瘤基础研究方向的工作。△ 通信作者, E-mail:bjzjzp@163.com。

duced after knocking down PKM2 expression, and the addition of lactic acid partially reversed the phenomenon. The levels of TNF- $\alpha$  and iNOS of melanoma macrophages in PKM2 overexpressing group were lower than those in the control group, while the levels of CD206 and CD163 were higher than those in the control group, and the differences had statistical significance ( $P < 0.05$ ); the TNF- $\alpha$  and iNOS levels of knockdown PKM2 group on melanoma macrophages were higher than those of the control group, while CD206 and CD163 were lower than those of the control group, and the differences were all statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** PKM2 promotes the invasion and migration of melanoma by influencing the glycolysis process, and promotes the M2 transformation of macrophages in the tumor microenvironment, making it a potential target for metabolic therapy of melanoma.

**Key words:** PKM2; melanoma; glycolysis; invasion and migration; macrophage

黑色素瘤特别是晚期患者病死率极高,目前仍是世界范围内最难治的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。乳酸是糖酵解过程中的主要代谢产物,有研究表明黑色素瘤细胞可通过摄取乳酸来抵御氧化应激压力,从而获得更强的转移能力<sup>[2]</sup>。丙酮酸激酶 M2(PKM2)作为糖酵解途径最主要限速酶之一,通过影响肿瘤微环境在多种类型肿瘤中促进疾病进展<sup>[3]</sup>。然而,PKM2 在黑色素瘤患者转移及预后中的相关研究尚不清楚。基于以上理论基础,本研究旨在探索 PKM2 影响黑色素瘤转移的潜在机制,进一步阐明 PKM2 如何影响肿瘤微环境(TME)中巨噬细胞 M1/M2 转变过程。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 基于 TCGA 数据库分析黑色素瘤中 PKM2 表达水平及与生存期的关系** 利用来源于 TCGA 数据库[GEPIA 2 (cancer-pku. cn)]的 461 例黑色素瘤患者及 558 例健康研究对象分析 PKM2 在黑色素瘤组织及正常组织中的表达差异、PKM2 与生存期相关性及 PKM2 在不同临床分期黑色素瘤中的表达情况。其中 80 例有随访生存期数据的黑色素瘤患者用于比较 PKM2 基因高表达组(20 例)与 PKM2 基因低/中表达组(60 例)的总体生存时间;79 例有临床分期数据的黑色素瘤患者用于比较 PKM2 基因在不同临床分期患者中的表达差异,其中临床分期包括 2 期 39 例,3 期 36 例,4 期 4 例。

**1.2 细胞来源、细胞培养与载体构建** 人 A375 黑色素瘤细胞系和小鼠 RAW264.7 巨噬细胞系购自中国科学院上海细胞生物研究所,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下含 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)的改良 Eagle's 培养基(DMEM, Gibco)进行培养。课题组利用基因敲低技术对 PKM2 表达水平进行敲低并验证敲低效率,PKM2 过表达(过表达组,  $n = 3$ )及基因敲低慢病毒载体(敲低组,  $n = 3$ )及其对照慢病毒载体(对照组)均由上海 GeneChem 公司构建,病毒加入量按照公司提供的感染复数值进行转染。

**1.3 黑色素瘤细胞胞外酸化率(ECAR)及乳酸水平检测** ECAR 采用美国 Agilent 公司的 SeaHorse XF 细胞外通量分析仪进行测定。分析前需在特定的时间点处理细胞:葡萄糖(10 mmol/L),然后是寡霉素(1  $\mu$ mol/L)和 2-DG(50 mmol/L)。最后用 SeaHorse XF 软件测量 ECAR 值。其中加入葡萄糖之前

测定的 ECAR 值为“基础期”,加入葡萄糖之后与加寡霉素之前测定的 ECAR 值为“糖酵解能力”,加入寡霉素之后与加 2-DG 之前测定的 ECAR 值为“糖酵解容量”,加入 2-DG 之后测定的 ECAR 值为“恢复期”。采用乳酸测定试剂盒(南京建成科技有限公司, A019-2-1)检测干扰 PKM2 后细胞乳酸产量。

**1.4 定量聚合酶链反应(qPCR)** qPCR 检测巨噬细胞 M1/M2 相关指标水平,其中代表 M1 极化的指标包括肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶(iNOS),代表 M2 极化的指标包括甘露糖受体(CD206)、血红蛋白清道夫受体(CD163)。操作按厂家说明书,用 Prime Scrip RT 试剂盒(Takara)提取总信使 RNA(mRNAs),合成互补 DNA(cDNA)。qPCR 反应在 ABI PRISM7500 仪器(ThermoFisher Scientific)上进行测量,qPCR 采用的 Real SYBR Mix 由青岛擎科生物科技股份有限公司生产。qPCR 所用引物序列见表 1,反应条件如下:94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,40 个循环,最后 72℃ 延伸 2 min。

表 1 引物序列表

基因名称	引物序列
PKM2(人)	正向:5'-CCCAGCTTCCCGATCAGTG-3'
	反向:5'-GATGAGCCAGTTCCGATCTC-3'
TNF- $\alpha$ (小鼠)	正向:5'-CCTCTCATGCACCACCATCA-3'
	反向:5'-GCATTGCACCTCAGGAAGA-3'
iNOS(小鼠)	正向:5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGC-3'
	反向:5'-GGCTGTGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'
CD206(小鼠)	正向:5'-AAAAGTACTGACTGGGCTTCCGT-3'
	反向:5'-CCTCTCGAGCACAGGTCATC-3'
CD163(小鼠)	正向:5'-GCAAAAATGGCAGTGGG-3'
	反向:5'-GTCAAAATCACAGACGGAG-3'
18S rRNA(人)	正向:5'-CGCTACCACATCCAAGGAA-3'
	反向:5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'
$\beta$ -actin(小鼠)	正向:5'-CTGGTCTGTACCACAGGCATT-3'
	反向:5'-AAAAGAGCCTCAGGCATCG-3'

**1.5 蛋白免疫印迹法** 首先用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白产物,并将其转移到 PVDF 膜(Bio-Rad)上。然后用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h,并在 4℃ 下与 PKM2 一抗(abcam, ab85555)孵育过夜;洗膜 3 次于室温下与二抗共同孵育 2 h,最后使用 Tanon 5200 凝胶成像仪进行显影,对敲低 PKM2 后的表达量进行检测。

**1.6 免疫组化染色** 黑色素瘤组织收集淄博市中心医院 2010 年 5 月至今经病理诊断确诊为黑色素瘤患者,排除患者患有其他类型肿瘤、代谢性疾病、炎症性疾病等可能影响结果的疾病,共计 20 例,其中转移组 7 例(已发生淋巴结转移或远端转移的黑色素瘤患者),非转移组 13 例(未发生淋巴结转移的黑色素瘤患者)。转移组男 4 例、女 3 例,平均年龄(64.71±12.26)岁,非转移组男 7 例、女 6 例,平均(59.62±11.80)岁。两组性别、年龄比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。免疫组化结果采用半定量评分标准对本组织中的 PKM2 表达量进行分析,染色指数值(0~12)定义为染色强度与阳性区域得分的乘积。对染色强度评分如下:0 分=无染色;1 分=弱染色;2 分=中等染色;3 分=强染色。阳性区域定义如下: $<5\%$ 染色=0 分; $5\% \sim 25\%$ 染色=1 分; $>25\% \sim 50\%$ 染色=2 分; $>50\% \sim 75\%$ 染色=3 分; $>75\%$ 染色=4 分<sup>[4]</sup>。所有研究对象均自愿参与本研究,并签署知情同意书,本研究经淄博市中心医院医学伦理委员会审核通过(批号:2020-1-045)。

**1.7 流式细胞术** CD206 流式荧光抗体购自 BD 公司,抗体与细胞室温孵育 30 min 后,用 PBS 洗涤 3 次,然后用 BD FACS 流式细胞仪(Aria II, USA)对 CD206 的表达水平进行分析。

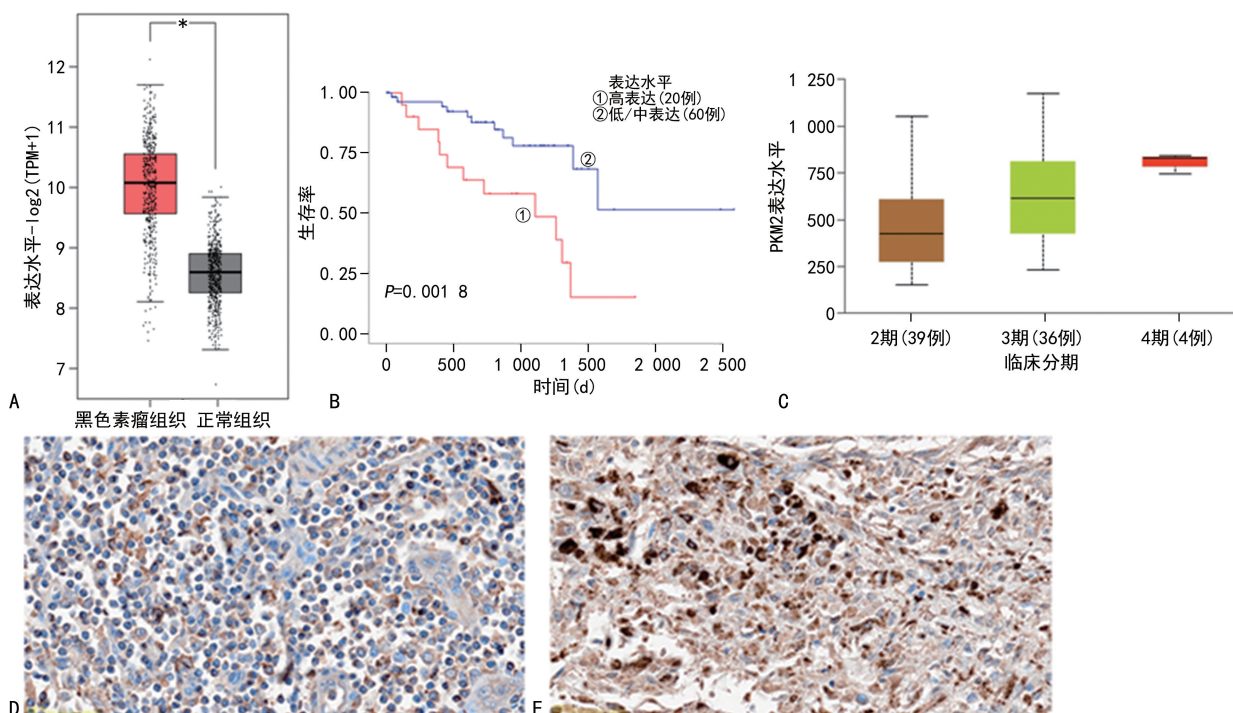
**1.8 细胞划痕实验及 Transwell 实验** 敲低黑色素瘤细胞中 PKM2 表达后,进行肿瘤细胞迁移实验。黑色素瘤细胞系 A375 种板于六孔板中,分为对照组、PKM2 敲低组、PKM2 敲低+乳酸组,待细胞贴壁后用 200  $\mu$ L 枪头于孔中间划痕,然后细胞进行换液以

去除漂浮细胞,显微镜下拍照并测量原始划痕宽度;24 h 后置于显微镜下测量划痕愈合宽度,与原始划痕宽度比较,得到愈合比例。黑色素瘤细胞系 A375 接种于 Transwell 小室中,分为对照组、PKM2 敲低组、PKM2 敲低+乳酸组,血清浓度为 1%,下室血清浓度为 10%,形成浓度梯度;24 h 后取出 Transwell 小室,用棉棒小心擦去小室内残留细胞,小室经过固定、结晶紫染色、冲洗后,置于显微镜下拍照并计数。

**1.9 统计学处理** 使用 GraphPad Prism 8.0 软件和 SPSS18.0 统计软件进行绘图和数据分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较,采用独立样本  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析。所有数据至少重复 3 次取平均值。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 PKM2 在黑色素瘤组织中表达情况** TCGA 数据库显示,与正常组织(8.66±1.19)相比,PKM2 mRNA 水平在黑色素瘤组织中(10.97±1.78)明显升高( $P<0.05$ ),且 PKM2 高表达水平患者的生存率低于低/中表达患者( $P=0.0018$ ),见图 1A、1B;PKM2 在临床 2 期黑色素瘤患者中的表达水平为 4.63±1.78,在 3 期黑色素瘤患者中的表达水平为 6.25±1.55,在 4 期黑色素瘤患者中的表达水平为 8.71±0.13,不同临床分期黑色素瘤患者的 PKM2 表达水平比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1C。免疫组化染色结果发现,转移组 PKM2 表达评分为(8.00±2.52)分,明显高于非转移组的(4.54±1.32)分,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1D、1E。



注: \* $P<0.05$ ;A 为 TCGA 数据库中 PKM2 在黑色素瘤组织中的表达;B 为 TCGA 数据库中不同 PKM2 表达患者生存曲线;C 为 TCGA 数据库中 PKM2 在不同临床分期黑色素瘤晚期患者中的表达;D 为 PKM2 在未发生转移的黑色素瘤患者中的免疫组化染色情况( $\times 200$ );E 为 PKM2 在发生转移的黑色素瘤患者中的免疫组化染色情况( $\times 200$ )。

图 1 PKM2 在黑色素瘤患者中的表达情况

**2.2 敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞糖酵解水平变化** 敲低 PKM2 表达水平后, PKM2 mRNA 水平下降了 61%(对照组相对表达量为 1.0, PKM2 敲低组相对表达量为 0.39), 蛋白水平也明显下调, 见图 2; 敲低组黑色素瘤细胞糖酵解能力和糖酵解容量均低于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。另外, PKM2 敲低组乳酸水平 $[(4.93 \pm 0.87) \text{ mmol/L}]$ 明显低于对照组 $[(12.33 \pm 1.55) \text{ mmol/L}]$ , 差异有统计学意义( $t = 40.99, P < 0.001$ )。

**2.3 敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞侵袭与迁移能力的变化** 细胞划痕实验显示, 对照组愈合率为 25%, PKM2 敲低组为 75%, PKM2 敲低组加入乳酸后为 50%; Transwell 实验结果显示, 对照组穿过细胞数为 $(58 \pm 7.21)$ 个/LP(低倍视野), PKM2 敲低组细胞数为 $(26 \pm 3.21)$ 个/LP, PKM2 敲低组加入乳酸后细胞数为 $(50 \pm 4.58)$ 个/LP。细胞迁移实验结果显示, 敲

低 PKM2 表达后, 黑色素瘤细胞的迁移和侵袭能力均明显降低, 加入乳酸后, 可部分逆转该现象, 见图 3。

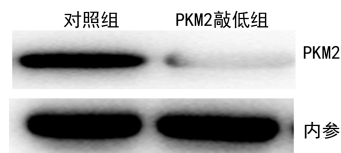
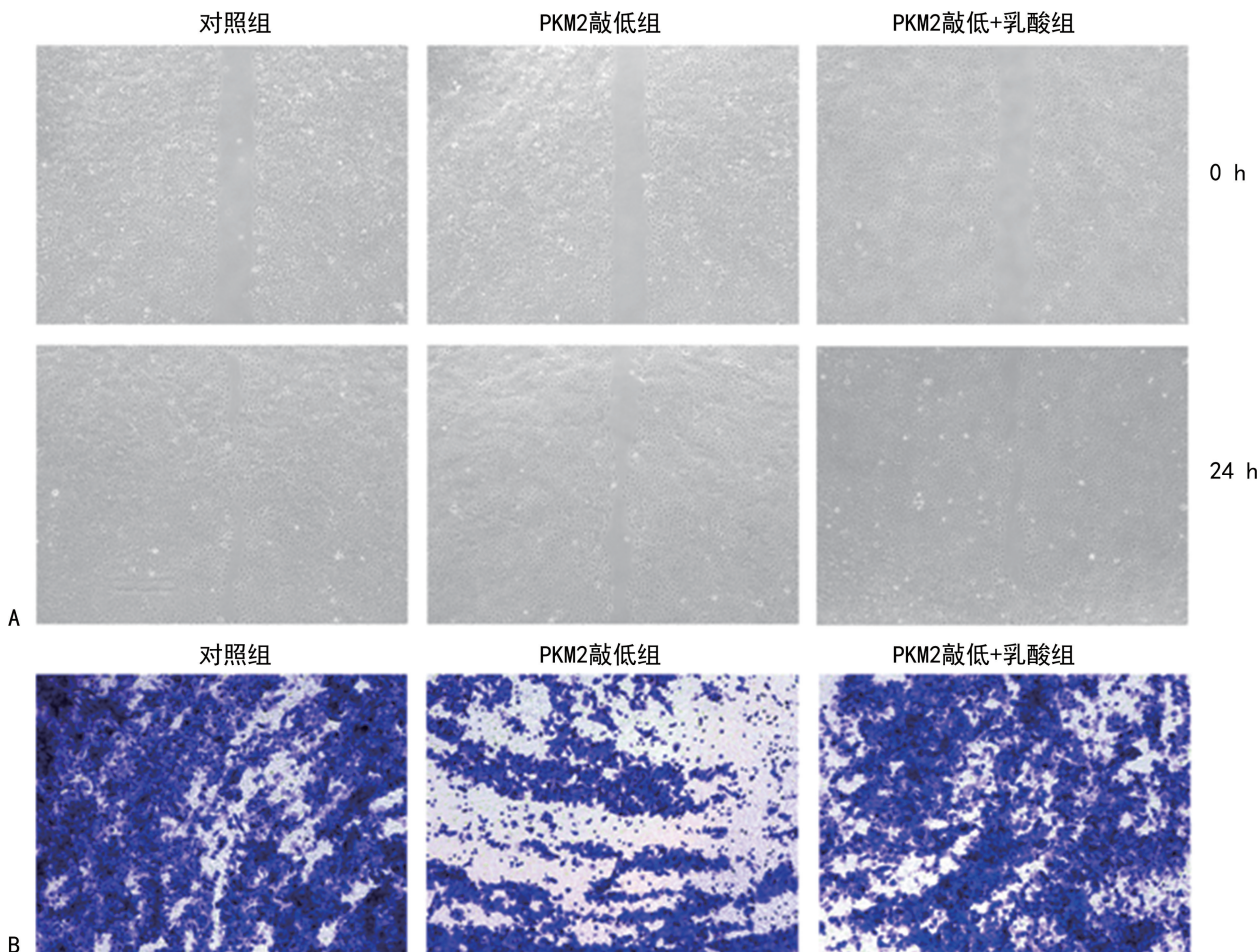


图 2 敲低 PKM2 后蛋白表达水平变化

表 2 敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞糖酵解水平的变化 ( $\bar{x} \pm s, \text{mPH/min}$ )

组别	基础期	糖酵解能力	糖酵解容量	恢复期
敲低组	$15.03 \pm 4.59$	$34.80 \pm 8.12$	$78.23 \pm 9.14$	$19.61 \pm 10.71$
对照组	$20.84 \pm 6.89$	$73.21 \pm 15.24$	$136.67 \pm 21.62$	$23.53 \pm 5.68$
<i>t</i>	2.11	6.68	7.47	0.97
<i>P</i>	$> 0.05$	$< 0.001$	$< 0.001$	$> 0.05$



注: A 为敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞迁移能力的变化; B 为敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞侵袭能力的变化。

图 3 敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞侵袭与迁移能力的变化 ( $\times 200$ )

**2.4 qPCR 检测巨噬细胞 M1/M2 相关指标水平情况** qPCR 检测结果显示, 过表达组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平低于对照组, 而 CD206 和 CD163 水平高于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 3; 敲低组

TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平高于对照组, 而 CD206 和 CD163 水平低于对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 4。流式细胞实验结果显示, 敲低 PKM2 后巨噬细胞 M2 标志物 CD206 表达受到抑制, 对照组平均荧光

强度(MFI)为  $32.5 \pm 4.27$ , 敲低组 MFI 值  $24.6 \pm 2.17$ ; 过表达 PKM2 后则 M2 标志物 CD206 表达明显增多, 对照组 MFI 值为  $23.6 \pm 1.64$ , 过表达组 MFI 值为  $48.9 \pm 3.05$ 。

表 3 过表达组与对照组巨噬细胞 M1/M2 相关指标水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$	iNOS	CD206	CD163
对照组	$1.16 \pm 0.23$	$3.07 \pm 0.80$	$3.14 \pm 0.57$	$2.66 \pm 0.37$
过表达组	$0.31 \pm 0.01$	$0.44 \pm 0.09$	$7.85 \pm 0.78$	$7.02 \pm 0.17$
<i>t</i>	6.28	5.66	8.43	18.08
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 4 敲低组和对照组巨噬细胞 M1/M2 相关指标水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$	iNOS	CD206	CD163
对照组	$3.76 \pm 0.72$	$2.26 \pm 0.40$	$7.88 \pm 0.60$	$5.82 \pm 0.96$
敲低组	$6.23 \pm 0.54$	$5.65 \pm 0.58$	$2.71 \pm 0.74$	$1.99 \pm 0.31$
<i>t</i>	4.76	8.39	9.41	6.53
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.001	<0.01

### 3 讨论

糖酵解是肿瘤生长和转移的主要能量来源<sup>[5]</sup>。肿瘤代谢从线粒体氧化磷酸化到有氧糖酵解的转变被称为瓦氏效应, 由于有氧糖酵解导致的肿瘤进展通常与癌基因的激活或肿瘤抑制基因的丧失有关。因此, 抑制糖酵解是肿瘤治疗的重要策略之一<sup>[6]</sup>。PKM2 是一种糖酵解限速酶, 有报道称其在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结直肠癌和肝癌中过表达并促进肿瘤进展<sup>[7-9]</sup>。然而 PKM2 在黑色素瘤中的表达情况及相关生物学机制尚不清楚。笔者利用 TCGA 数据库发现, 与正常组织相比, PKM2 mRNA 水平在黑色素瘤组织中表达明显升高( $P < 0.05$ ), 且 PKM2 高水平患者的生存率低于低/中表达患者( $P = 0.0018$ ); 对黑色素瘤患者分组后分析发现, PKM2 在临床中晚期黑色素瘤患者中的表达水高于早期患者, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫组化染色结果发现, 转移组 PKM2 表达评分为  $(8.00 \pm 2.52)$  分, 明显高于非转移组的  $(4.54 \pm 3.55)$  分( $P < 0.05$ )。以上结果表达 PKM2 可能在黑色素瘤转移中发挥重要的促进作用。

2022 年, HANAHAN<sup>[10]</sup> 的一项研究指出肿瘤的十二大特征, 其中能量代谢重编程是肿瘤细胞主要特征之一, 表明近年来肿瘤代谢正在成为肿瘤诊疗的重要靶点<sup>[11]</sup>。肿瘤细胞必须改变其能量代谢途径, 从而实现持续的细胞增殖能力、存活率, 以及致命的远端转移能力。代谢重编程包括肿瘤细胞增加对葡萄糖的吸收率, 这是提供给肿瘤细胞所需能量的主要途

径, 这些大分子物质包括脂质、碳水化合物、氨基酸和核酸<sup>[12]</sup>。不过即使在充足的氧气环境中糖酵解也被认为是肿瘤细胞利用能量的主要方式, 因此近年来糖酵解增强也被认为是癌症细胞的重要特征, 它通过影响细胞代谢正向调控肿瘤的发生与发展<sup>[13]</sup>。与正常细胞不同, 肿瘤细胞优先倾向于将葡萄糖转化为丙酮酸盐, 然后通过乳酸脱氢酶(LDH)将其代谢为乳酸。然而, 在常氧条件下, 丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶(PDH)转化为乙酰辅酶 A。最初的研究认为线粒体功能障碍导致氧化磷酸化途径由有氧糖酵解替代, 但进一步的研究表明肿瘤细胞的线粒体功能和氧化磷酸化(OXPHOS)途径与正常细胞不同, 肿瘤细胞维持高水平的乙二醇分解率和氧化磷酸化能力以满足肿瘤细胞的高能量需求。在肿瘤细胞中, 糖酵解逐渐增加, 而 OXPHOS 逐渐减少, 随着糖酵解的增加, 乳酸在肿瘤细胞周围增多, 从而形成特定的肿瘤酸性微环境。乳酸, 作为一种代谢调节因子, 通过增加酸度和血管生成、减少血管通透性和改变免疫反应来促进癌症转移<sup>[14]</sup>。基于上述理论以及 PKM2 在黑色素瘤中高表达现象, 笔者检测了敲低 PKM2 后黑色素瘤细胞糖酵解相关指标, 敲低 PKM2 表达水平后, PKM2 mRNA 水平下降了 61%(对照组相对表达量为 1.0, PKM2 敲低组相对表达量为 0.39), 蛋白水平也明显下调, 且敲低组黑色素瘤细胞糖酵解能力和糖酵解容量均低于对照组( $P < 0.05$ ), 另外, 敲低组乳酸水平明显低于对照组, 差异有统计学意义( $t = 40.99, P < 0.001$ ), 与相关研究结果一致。上述结果提示 PKM2 促进了黑色素瘤中乳酸的分泌水平。有研究发现乳酸可促进黑色素瘤细胞侵袭与迁移能力<sup>[15]</sup>, 因此本研究敲低黑色素瘤细胞中 PKM2 表达后, 进行肿瘤细胞迁移实验, 结果发现敲低 PKM2 表达后, 黑色素瘤细胞的迁移和侵袭能力均明显降低, 加入乳酸后, 可部分逆转该现象, 提示 PKM2 以乳酸依赖方式促进黑色素瘤细胞侵袭与迁移能力。

LIN 等<sup>[16]</sup> 研究发现肿瘤微环境中乳酸水平可促进巨噬细胞 M1/M2 转变。TME 涉及肿瘤基质、增殖的肿瘤细胞、炎症细胞, 以及各种相关的组织细胞。肿瘤的发展是由癌症细胞和其他细胞之间的互相串扰, 进而控制 TME 中的免疫细胞数量与活性。肿瘤的代谢特征之一是有氧糖酵解代谢产物乳酸的大量积聚。肿瘤细胞引起大量乳酸积聚, 这是 TME 的显著特征。研究表明乳酸不仅是代谢重新编程的副产品, 而且是一种关键的 TME 信号分子。TME 中乳酸的含量与肿瘤转移和肿瘤免疫逃逸密切相关<sup>[17]</sup>。肿瘤由此导致免疫抑制, 从而促进肿瘤的进展。因此, 酸性 TME 微环境对肿瘤的影响已成为肿瘤研究热

点。研究证实,在肿瘤组织中,乳酸盐通过 PGC-1 $\alpha$  介导的氧化磷酸化调控肿瘤增殖<sup>[18]</sup>。此外,乳酸通过调节肿瘤细胞生长、转移和维持乳腺癌特性能量代谢的 HCAR1 途径促进肿瘤进展<sup>[19]</sup>。此外,CD147-K234 是一种糖蛋白,通过提高乳酸产量,控制细胞代谢和促进非小细胞肺癌(NSCLC)进展<sup>[20]</sup>。有研究表明,乳酸参与子宫内膜癌 TME 形成,以及参与肿瘤生长和血管生成<sup>[21]</sup>。高乳酸水平与高子宫内膜癌复发率密切相关。然而乳酸在子宫内膜癌 TME 中的调节机制有待深入调查。本研究结果显示,巨噬细胞过表达组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平低于对照组,而 CD206 和 CD163 水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),且敲低组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平高于对照组,而 CD206 和 CD163 水低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。笔者进一步探究 PKM2 是否也参与了乳酸调控 TME 过程,首先把过表达或敲低 PKM2 的黑色素瘤细胞与巨噬细胞共培养,结果发现过表达组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平低于对照组,而 CD206 和 CD163 水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示 PKM2 可显著促进巨噬细胞 M2 转变;敲低组 TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平高于对照组,而 CD206 和 CD163 水低于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示敲低 PKM2 后巨噬细胞 M2 标志物 CD206 表达受到抑制;流式细胞实验结果显示,敲低 PKM2 后巨噬细胞 M2 标志物 CD206 表达受到抑制,对照组平均荧光强度(MFI)为 32.5,敲低组 MFI 值 24.6;过表达 PKM2 后则 M2 标志物 CD206 表达明显增多,对照组 MFI 值为 23.6,过表达组 MFI 值为 48.9。以上结果提示 PKM2 介导了巨噬细胞 M1/M2 转变进程,可能通过影响 TME 促进了黑色素瘤进展。

总之,本研究发现 PKM2 在黑色素瘤发生转移组中表达上调,在黑色素瘤转移中发挥重要的促进作用。进一步研究发现 PKM2 以乳酸依赖方式促进黑色素瘤细胞侵袭与迁移。更重要的是,PKM2 介导了巨噬细胞 M1/M2 转变进程,是重塑黑色素瘤 TME 重要参与分子之一。然而,本研究涉及的分子机制尚不深入,PKM2 通过何种机制导致黑色素瘤侵袭与迁移能力的增加,以及如何调控巨噬细胞 M1/M2 转变的深层分子机制等问题,均需要进行更深入的研究与探讨。

## 参考文献

- [1] WANG Q, ZHU T, MIAO N, et al. Disulfiram bolsters T-cell anti-tumor immunity through direct activation of LCK-mediated TCR signaling[J]. *EMBO J*, 2022, 41(16): e110636.
- [2] TASDOGAN A, FAUBERT B, RAMESH V, et al. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma meta-

static potential[J]. *Nature*, 2020, 577(7788): 115-120.

- [3] WANG F, HU Y, WANG H, et al. LncRNA FTO-IT1 promotes glycolysis and progression of hepatocellular carcinoma through modulating FTO-mediated N6-methyladenosine modification on GLUT1 and PKM2[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 267.
- [4] YANG M, ZHANG Y, LIU G, et al. TIPE1 inhibits osteosarcoma tumorigenesis and progression by regulating PRMT1 mediated STAT3 arginine methylation[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(9): 815.
- [5] WANG J, ZHU M, ZHU J, et al. HES1 promotes aerobic glycolysis and cancer progression of colorectal cancer via IGF2BP2-mediated GLUT1 m6A modification[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 411.
- [6] EL-FAR AH, AL JAOUNI SK, LI X, et al. Cancer metabolism control by natural products: pyruvate kinase M2 targeting therapeutics[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(8): 3181-3201.
- [7] SHANG X Y, WANG Y J, HOU Z L, et al. A natural PKM2 targeting agent as a potential drug for breast cancer treatment[J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(1): e1157.
- [8] LI H, GUO H, HUANG Q, et al. Circular RNA P4HB promotes glycolysis and tumor progression by binding with PKM2 in lung adenocarcinoma[J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 252.
- [9] QU H, LIU J, ZHANG D, et al. Glycolysis in chronic liver diseases: mechanistic insights and therapeutic opportunities[J]. *Cells*, 2023, 12(15): 1930.
- [10] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(1): 31-46.
- [11] FLUAD YA, AANEI C. Revisiting the hallmarks of cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(5): 1016-1036.
- [12] VAZQUEZ A, KAMPHORST J J, MARKERT E K, et al. Cancer metabolism at a glance[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(18): 3367-3373.
- [13] LUO Z, EICHINGER K M, ZHANG A, et al. Targeting cancer metabolic pathways for improving chemotherapy and immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2023, 575: 216396.
- [14] FAKHRI S, KHODAMORADY M, NASERI M, et al. The ameliorating effects of anthocyanins on the cross-linked signaling pathways of cancer dysregulated metabolism[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104895.
- [15] YANG X, ZHAO H, YANG J, et al. MiR-150-5p regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg effect[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(1): 85-91.
- [16] LIN Y, QI Y, JIANG M, et al. Lactic acid-induced M2-like macrophages facilitate tumor cell migration and invasion via the GPNMB/CD44 axis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 110972.

- by enhancing the quality of medical care and establishing a learning health-care system [J]. *Lancet*, 2015, 386 (10002):1493-1505.
- [9] SOEHNLEIN O, LIBBY P. Targeting inflammation in atherosclerosis: from experimental insights to the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(8):589-610.
- [10] BÄCK M, YURDAGUL A, TABAS I, et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(7):389-406.
- [11] HUNJADI M, LAMINA C, KAHLER P, et al. HDL cholesterol efflux capacity is inversely associated with subclinical cardiovascular risk markers in young adults; the cardiovascular risk in young finns study [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):19223.
- [12] 王熙智, 秦海燕. 单核细胞/高密度脂蛋白比值、单核细胞/淋巴细胞比值与非 ST 段抬高型心肌梗死及冠状动脉病变严重程度的关系研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(10):18-23.
- [13] 中国高血压防治指南修订委员会, 高血压联盟(中国), 中华医学会心血管病学分会, 等. 中国高血压防治指南(2018 年修订版) [J]. *中国心血管杂志*, 2019, 24(1):24-56.
- [14] KNUUTI J, WIJNS W, SARASTE A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(3):407-477.
- [15] KANBAY M, SOLAK Y, UNAL H U, et al. Monocyte count/HDL cholesterol ratio and cardiovascular events in patients with chronic kidney disease [J]. *Int Urol Nephrol*, 2014, 46(8):1619-1625.
- [16] VILLANUEVA D L E, TIONGSON M D, RAMOS J D, et al. Monocyte to high-density lipoprotein ratio (MHR) as a predictor of mortality and major adverse cardiovascular events (MACE) among ST elevation myocardial infarction (STEMI) patients undergoing primary percutaneous coronary intervention; a Meta-analysis [J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1):55.
- [17] 黄文娟, 万辛. 单核细胞与高密度脂蛋白比值与糖尿病肾脏疾病的相关性研究 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(12):891-894.
- [18] 张京, 朱虹, 吴钦钦, 等. NLR、PLR、MHR 与颈动脉粥样硬化的关系研究 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(13):1841-1845.
- [19] 李秀珍, 曲晨, 郭守玉. MHR 对原发性高血压患者左室肥厚的预测价值 [J]. *检验医学与临床*, 2022, 19(19):2593-2595.
- [20] 李其华, 韦耀达. 单核细胞与高密度脂蛋白胆固醇比值评估中年人群发生冠心病及重度冠状动脉病变的价值研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2023, 31(4):20-25.
- [21] KUNDI H, KIZILTUNC E, CETIN M, et al. Association of monocyte/HDL-C ratio with SYNTAX scores in patients with stable coronary artery disease [J]. *Herz*, 2016, 41(6):523-529.
- [22] 王莹, 吴少敏, 许少莹, 等. LDL-C 水平正常的绝经后女性单核细胞/HDL-C 比值与冠状动脉病变和短期预后的关系 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(7):1255-1260.
- [23] 杨丽娟, 美国跃. MHR、MLR 在心血管病风险评估中的价值 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2021, 30(1):15-18.
- [24] 李明丽, 张文礼, 费家玥, 等. MHR 改善 GRACE 评分对 NSTEMI 患者 PCI 术后主要心脑血管不良事件的预测价值 [J]. *河南医学研究*, 2023, 32(9):1549-1554.
- [25] LIU H, LIU K, PEI L, et al. Monocyte-to-high-density lipoprotein ratio predicts the outcome of acute ischemic stroke [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(9):959-968.
- [26] SAROV-BLAT L, KISS R S, HAIDAR B, et al. Predominance of a proinflammatory phenotype in monocyte-derived macrophages from subjects with low plasma HDL-cholesterol [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(5):1115-1122.
- [27] JIA C, ANDERSON J L C, GRUPPEN E G, et al. High-density lipoprotein anti-inflammatory capacity and incident cardiovascular events [J]. *Circulation*, 2021, 143(20):1935-1945.

(收稿日期:2023-12-12 修回日期:2024-03-10)

(上接第 1190 页)

- [17] XIA L, OYANG L, LIN J, et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):28.
- [18] LIU S, ZHAO H, HU Y, et al. Lactate promotes metastasis of normoxic colorectal cancer stem cells through PGC-1 $\alpha$ -mediated oxidative phosphorylation [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7):651.
- [19] JIN L, GUO Y, CHEN J, et al. Lactate receptor HCAR1 regulates cell growth, metastasis and maintenance of cancer-specific energy metabolism in breast cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(2):268.
- [20] WANG K, HUANG W, CHEN R, et al. Di-methylation of CD147-K234 promotes the progression of NSCLC by enhancing lactate export [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(1):160-173.
- [21] CORTES-CROS M, HEMMERLIN C, FERRETTI S, et al. M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(2):489-494.

(收稿日期:2023-10-18 修回日期:2023-12-15)