

阿司匹林抑制 HGF/c-Met 介导的肿瘤细胞转移作用

代晓阳*, 陈思康, 车金鑫

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: 本研究主要探讨了阿司匹林对肝细胞生长因子/细胞间质表皮转化因子受体 (HGF/c-Met) 轴介导的肿瘤生物学效应的影响, 初步探究阿司匹林抑制肿瘤转移的分子机制。利用分子模拟预测阿司匹林与 c-Met 的结合情况; 采用蛋白质热稳定性实验验证阿司匹林在细胞水平与 c-Met 的结合情况; 采用激酶活性检测阿司匹林对 c-Met 激酶的抑制作用; Western blot、细胞分散实验、细胞分枝形态变化实验及 Transwell 实验用于检测细胞信号转导、形态与迁移能力的变化。结果显示, 阿司匹林能够有效抑制 c-Met 的激酶活性, 半数抑制浓度为 $0.95 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子模拟实验结果显示, 阿司匹林能够结合在 c-Met 蛋白的 ATP 口袋, 主要结合位点为 Tyr1230、Tyr1159 和 Met1229。同样, 蛋白质热稳定性实验显示, 阿司匹林能够与 c-Met 蛋白结合。Western blot 结果显示, 阿司匹林能够浓度依赖性地抑制 HGF 刺激后磷酸化 Met 的上调。细胞分散实验结果显示, 阿司匹林能够浓度依赖性地阻断 HGF/c-Met 介导的细胞分散, 在 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下阿司匹林几乎可以完全阻断 c-Met 活化介导的生物学功能, 且该阻断作用与 HGF 无关。同样, 细胞分枝实验结果显示, 阿司匹林能够浓度依赖性抑制 HGF/c-Met 介导的 MDCK 细胞侵袭性生长细胞分枝的形态变化。Transwell 实验结果显示, 阿司匹林能够浓度依赖性地阻断 HGF/c-Met 介导的细胞迁移与侵袭, 在 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下阿司匹林几乎可以完全阻断 c-Met 活化介导的生物学功能, 且该阻断作用与 HGF 无关。以上结果表明, 阿司匹林能够与 c-Met 结合, 进而阻断 HGF/c-Met 介导的生物学效应, 从而发挥抑制肿瘤转移的作用。本研究揭示了阿司匹林的新生物学功能, 为全面理解阿司匹林的抗肿瘤转移作用提供了新的理论基础。

关键词: 阿司匹林; 肿瘤转移; HGF/c-Met; 受体酪氨酸激酶; 小分子抑制剂

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2022)10-2985-10

Aspirin inhibits tumor cell metastasis mediated by HGF/c-Met

DAI Xiao-yang*, CHEN Si-kang, CHE Jin-xin

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: In this study, we investigated the effect of aspirin on tumor biological effects mediated by hepatocyte growth factor/cellular-mesenchymal-epithelial transition factor (HGF/c-Met) axis, and preliminarily explored the molecular mechanism of inhibiting tumor metastasis by aspirin. The binding of aspirin to c-Met was predicted by molecular docking; cellular thermal shift assay (CETSA) was used to verify the binding of aspirin to c-Met at the cellular level. The inhibitory effect of aspirin on c-Met kinase was detected by kinase activity; Western blot, cell scattering test, cell branching morphogenesis and Transwell test were used to evaluate the cell signal transduction, morphological changes and migration and invasion ability. The results showed that aspirin could effectively inhibit the kinase activity of c-Met with a half inhibitory concentration of $0.95 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The results of docking showed that aspirin could bind to the ATP pocket of c-Met protein, and the main binding sites were Tyr1230, Tyr1159 and Met1229. The CETSA test also showed that aspirin could form binding complex with c-Met protein. Western blot

收稿日期: 2022-05-30; 修回日期: 2022-07-01.

基金项目: 浙江大学实验技术研究项目 (SJS202016).

*通讯作者 Tel: 86-571-88208076, E-mail: daixiaoyang@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0674

results showed that aspirin could inhibit the up-regulation of phosphorylated Met stimulated by HGF in a concentration-dependent manner. The results of cell scattering test showed that aspirin could block HGF/c-Met promoted cell scattering in a concentration dependent manner. Aspirin could almost completely block the biological function mediated by c-Met activation at the concentration of $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and this effect was independent of HGF. Similarly, the results of MDCK cell branching morphogenesis experiment showed that aspirin could inhibit HGF/c-Met mediated invasive growth in a concentration dependent manner. The results of Transwell test showed that aspirin could block HGF/c-Met mediated cell migration and invasion in a concentration-dependent manner. Aspirin could almost completely block the biological function mediated by c-Met activation at the concentration of $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and this effect was independent of HGF. The above results indicate that aspirin can bind to c-Met, thereby blocking the biological effects mediated by HGF/c-Met, and inhibiting tumor metastasis. This study revealed the new biological function of aspirin, and provided a new theoretical basis for a comprehensive understanding of the anti-metastatic effect of aspirin.

Key words: aspirin; tumor metastasis; HGF/c-Met; receptor tyrosine kinase; small molecule inhibitor

癌症患者死亡的重要原因之一在于肿瘤恶性进展导致的转移累积重要脏器,临床中约有90%的患者死于肿瘤转移^[1]。Stephen Page提出的肿瘤转移“种子与土壤”学说,阐述了肿瘤转移是一个涉及多基因、多因素的复杂生物学过程^[2-4]。近年来,越来越多的研究表明肿瘤细胞的可塑性及肿瘤微环境是转移的关键因素^[5-9]。细胞间质表皮转化因子 (cellular-mesenchymal-epithelial transition factor, c-Met) 及其配体肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 所介导的信号轴在细胞可塑性和肿瘤-肿瘤微环境交互中发挥着重要作用。

研究显示, c-Met在恶性肿瘤如肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、皮肤癌、肠癌等均存在高表达或基因突变的情况^[10-14]。c-Met是由MET基因编码生成的酪氨酸激酶受体,可分为胞外段、跨膜段和胞内段。其中,胞外N端由氨基酸残基25~514组成的SEMA结构域是配体识别区, HGF是c-Met目前已知的唯一配体。胞内段包括了近膜结构域、催化结构域和功能结合域。在上述恶性肿瘤中, HGF与c-Met胞外结构域结合后,促使酪氨酸激酶残基在催化结构域发生磷酸化,形成c-Met异常活化的状态,激活多个肿瘤依赖性的信号通路,进而介导肿瘤转移等恶性演进事件,如细胞形态的变化、运动能力的增强、耐药等。因此,寻找、合成靶向阻断HGF/c-Met的药物具有较好研发及应用前景。

阿司匹林 (aspirin) 又名乙酰水杨酸,是典型的非甾体类抗炎药,在临床中应用于解热镇痛、预防血栓等,已有百年的应用史。近些年来,伴随着大量的流行病学研究、临床前体内外实验及临床试验发现,长期服用阿司匹林能够有效降低胃癌、结直肠癌、乳腺癌等恶性肿瘤的发生率及肿瘤转移的发生风险等^[15-19]。目前认为阿司匹林的抗肿瘤作用机制主要分为环氧化酶

(cyclooxygenase, COX) 依赖性和COX非依赖性两类。其中, COX依赖途径更多的是通过乙酰化COX-1/COX-2, 调控前列腺素E2、降低原癌基因, 增强特异性促炎症消退介质, 进而介导炎性、免疫调控等途径抑制肿瘤细胞的生长和免疫逃逸^[20-22]。COX非依赖相关作用机制主要集中于其乙酰化功能 (如乙酰化P53、HDAC2、HE3K) 及对周期阻滞、凋亡及肿瘤干性关键基因与蛋白的调控功能^[23-28]。阿司匹林临床作用广泛, 其抗肿瘤与抗肿瘤转移作用并不能仅从抗炎作用解释。越来越多关于阿司匹林的靶点研究广泛开展, 揭示了这一传统药物的多靶点特征与不同的药理作用机制, 本团队2017年发现阿司匹林可以通过靶向乙酰肝素的酶活性功能及降低其表达进而抑制肿瘤转移的作用^[29]。近年有研究表明, HGF/c-Met的活化能够促进乙酰肝素的酶表达, 乙酰肝素的酶活性功能进一步调控HGF的表达与释放, 进而促进肿瘤侵袭转移^[30]。基于此, 本研究拟在前期研究与文献报道的基础上, 进一步拓展阿司匹林的抗转移作用是否与抑制HGF/c-Met的活化有关, 探究阿司匹林对c-Met活性抑制及对HGF/c-Met信号轴的阻断功能, 进而深入了解阿司匹林的抗肿瘤转移作用。

材料与方法

主要试剂及材料 阿司匹林、磺酰罗丹明B (SRB) 购自美国Sigma-Aldrich公司; c-MET、poly (4:1 Glu, Tyr) peptide、kinase assay buffer III均购自加拿大SignalChem公司; ADP-Glo™ reagent 和 kinase detection 购自美国Promega公司; Met (D1C2) XP[®] rabbit mAb、phospho-Met (Tyr1234/1235) (D26) XP[®] rabbit mAb、Akt (pan) (C67E7) rabbit mAb、phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP[®] rabbit mAb、p44/42 MAPK

(Erk1/2) (137F5) rabbit mAb均购买自美国 Cell Signaling Technology 公司; anti-GAPDH (db106) 购买自杭州戴格生物; DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司; 重组人源 HGF 购自美国 PeproTech 公司; I 型胶原、Materigel 均购自美国 BD 公司; Transwell 24 孔板 (8 μm) 购自美国 Corning 公司。

细胞培养 人皮肤癌细胞 A431、肝癌细胞 SMMC-7721 均购自中国科学院上海细胞库, 犬肾上皮细胞 MDCK 购自 ATCC。A431 细胞和 MDCK 细胞均培养于 DMEM 培养基, SMMC-7721 培养于 RPMI-1640 培养基, 所有培养基均加入 10% FBS、1% 双抗 (青霉素/链霉素), 放置于二氧化碳培养箱在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养。

分子对接 c-Met 蛋白晶体结构 (PDB ID: 7B44) 通过 RCSB 网站数据库获得, 经 Schrödinger 2021-2 软件的 Protein Preparation Wizard 模块对蛋白结构进行预处理、修补缺失侧链原子、氢原子优化和能量最小化。阿司匹林分子通过软件的 LigPrep 模块对配体分子结构进行预处理: 加氢、质子化及能量最小化。以上预处理过程均在 OPLS4 的力场下进行, 参数均选择默认参数。

使用 Glide 模块的 Receptor Grid Generation 功能在 c-Met 蛋白的 ATP 结合口袋构建受体活性口袋文件, 然后使用 Ligand Docking 功能在 SP (standard prediction) 模式下将预处理过的阿司匹林配体小分子对接进入受体蛋白上的活性口袋并计算 RMSD 值, 每个配体构象输出 5 个对接构象, 依据对接打分和目视决策挑选最可能的结合构象。

分子动力学模拟 使用 Schrödinger 2021-2 软件进行分子动力学模拟, 在 System Builder 模块中将分子对接所得蛋白配体复合物加上模拟溶剂体系以模拟体内环境, 溶剂体系选择 SPC 水溶剂, 最小化溶剂体系体积, 并加盐中和体系, 通过 Molecular Dynamics 模块在 OPLS4 分子力场中执行分子动力学模拟, 在 NPT 系统下 (300.0 K, 1.013 25 bar) 开展 10 ns 分子动力学模拟, 每隔 10 ps 记录一次轨迹。使用 Simulation Interactions Diagram 模块分析动力学轨迹中蛋白和配体的 RMSD 和非共价相互作用。其余选项均使用模块默认参数。

蛋白质热稳定性实验 (cellular thermal shift assay, CETSA) 处于对数生长期的 SMMC-7721 细胞用胰酶消化, 收集细胞并用 PBS 缓冲液重悬, 置于 EP 管中。分别给予终浓度为 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿司匹林或等体积 DMSO, 置于室温 30 min 后, 细胞悬液在所示温度条件下孵育 10 min。对热刺激后的细胞进行裂解, 离心后取上清可溶性蛋白液制备样本, 并用 Western

blot 考察 c-Met 的热稳定性。

c-Met 激酶活性检测 冰上解冻 c-Met 酶 (胞内区)、poly (4:1 Glu, Tyr) peptide, kinase assay buffer III 等试剂备用, 按每孔 1 μL 的体积将 0.064、0.32、1.6、8、40、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1、2、4、8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿司匹林加入 384 微孔板中, 同时设置空白对照孔、阳性对照孔 (1% DMSO, 不影响 c-Met 活性)。将 c-Met 酶用 kinase assay buffer III 工作液稀释至 2 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 按每孔 1 μL 的体积加入到 384 微孔板中 (空白对照孔不加), 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min。配制 poly (4:1 Glu, Tyr) peptide/ATP 混合液, 并按照每孔 2 μL 的体积加入到 384 微孔板中, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 贴膜密封 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。取 5 μL ADP-GloTM reagent 加入 384 微孔板中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 40 min 后, 每孔中加入 10 μL kinase detection 混合, 继续于 30 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 30 min; 孵育结束后进行化学发光检测, 读取发光值 (RLU), 计算相对酶活力及抑制率, 拟合计算半数抑制浓度 (IC_{50}): 相对酶活力 (%) = $(\text{RLU}_{\text{样品}} - \text{RLU}_{\text{空白}}) / (\text{RLU}_{1\% \text{ DMSO}} - \text{RLU}_{\text{Blank}}) \times 100\%$, 抑制率 = $100\% - \text{相对酶活力}\%$ 。

SRB 法测定细胞增殖抑制率 取对数生长期的细胞, 胰酶消化后配制成每毫升 5×10^4 个的细胞密度, 按照每孔 90 μL 细胞悬液的标准接种于 96 孔板中。过夜贴壁生长后, 按照每孔 10 μL 的体积加入 0.25、0.5、1、2、4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿司匹林, 每个浓度设置 3 个平行孔, 并设置空白对照组。培养至实验所设定时间后, 用 10% 预冷的三氯乙酸 (TCA) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞, 完成细胞固定后冲洗 TCA, 待其自然干燥。干燥后加入 SRB 溶液染色 30 min, 用 1% 冰醋酸洗涤后烘干。加入 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris 溶液溶解后, 酶标仪 515 nm 波长下测定 OD 值。按以下公式计算阿司匹林对细胞生长的抑制率。抑制率 = $(\text{OD}_{\text{空白对照组}} - \text{OD}_{\text{给药组}}) / \text{OD}_{\text{空白溶剂对照组}} \times 100\%$ 。

Western blot 将 SMMC-7721 细胞接种于 6 孔板过夜培养, 在无血清的条件下饥饿 24 h 后, 加入 0.5、1、2、4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿司匹林在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 2 h, 用 HGF 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刺激 15 min, 然后每孔加入适量的细胞裂解液, 收集样本, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮样 10 min。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜将蛋白转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 与相应的抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 用 TBST 室温洗膜 3 次, 每次 10 min。加入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h。然后用 TBST 室温漂洗 3 次, 每次 10 min。根据曝光强度选择合适的发光试剂进行显色, 通过超灵敏多功能成像仪进行成像。

细胞分散实验 将 MDCK 细胞按照每孔 1.5×10^3 个细胞的接种量, 接种于 96 孔板中, 培养过夜。将 1、

2、4 mmol·L⁻¹阿司匹林与 100 ng·mL⁻¹ HGF 加入对应的孔中, 37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h 后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 接着使用 0.2% 结晶紫染色, 冲洗多余染料干燥后采集图片。在阿司匹林撤药实验中, 先将 0.25、0.5、1、2、4 mmol·L⁻¹ 阿司匹林加入 96 孔板中作用 6 h 后, 再更换新的培养基 (含 100 ng·mL⁻¹ HGF) 继续培养 24 h 后进行同样的操作。

细胞分枝形态变化实验 收集 MDCK 细胞并调整至每毫升 2×10⁴ 个细胞的密度, 按照 1:1 的比例与 I 型胶原混合, 混合均匀后以每孔 0.1 mL 的体积接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 下培养 45 min 后, 向每个孔中添加 100 μL 的培养基 (含 100 ng·mL⁻¹ HGF 及 1、2、4 mmol·L⁻¹ 阿司匹林)。每隔两天更换新鲜培养基, 第 5 天采集图像。

细胞迁移与侵袭实验 收集 SMMC-7721、A431 细胞, 将 1.5×10⁵ 个细胞重悬于 100 μL 无血清的培养基接种于 Transwell 上室, 下室加入 600 μL 含 100 ng·mL⁻¹ HGF 的无血清培养液, 在上下两室中均加入 1、2、4 mmol·L⁻¹ 阿司匹林。37 °C、5% CO₂ 下培养 24 h。培养结束弃上室培养基, 90% 乙醇 4 °C 固定细胞, 0.1% 结晶紫室温染色 15 min, 洗除多余染料后采集图像分析。在阿司匹林预处理实验中, 先将 0.25、0.5、1、2、4 mmol·L⁻¹ 阿司匹林加入 6 孔板中与 SMMC-7721 细胞孵育 48 h 后, 再收集细胞进行上述迁移实验, 实验过程中不再添加阿司匹林。侵袭实验时先将 Transwell 小室用 Matrigel (与无血清培养基按照 1:15 稀释) 包被过夜后弃去包被液再使用, 细胞接种量为 3×10⁵ 个细胞重悬于 100 μL 无血清的培养基。

统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 作图, 实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS V27 统计分析, 组间采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 视为有统计学意义。

结果

1 阿司匹林可与 c-Met 结合并形成稳定结构

分子对接结果显示, 阿司匹林能够较好地结合在 c-Met 蛋白的 ATP 结合口袋 (图 1A), Glide docking score = -6.415 kcal·mol⁻¹, 阿司匹林的羧基能够与 c-Met 蛋白的 Tyr1230 形成氢键, 苯环与 Tyr1159 形成 pi-pi 相互作用, 并且乙酰基上的羰基氧原子通过水桥与 Met1229 间接产生氢键相互作用 (图 1B), 且分子动力学模拟结果表明该体系结合稳定 (图 1C), 观察 c-Met 蛋白各残基对其与阿司匹林结合的相互作用力贡献, Tyr1230 和 Tyr1159 是结合过程中的关键氨基酸残基 (图 1D)。

2 阿司匹林在细胞内可与 c-Met 结合, 影响 c-Met 的稳定性

通常, 化合物与靶蛋白结合后, 靶蛋白的热稳定性将会发生改变^[31]。为了验证阿司匹林在肿瘤细胞中靶向 c-Met 的作用, 本研究开展了 CETSA。如图 2 结果所示, 内参蛋白在各温度条件下丰度稳定不变。而 c-Met 的蛋白丰度在温度升高的情况下逐渐降低, 但在 48.2、50.8、55.3 °C 时, 阿司匹林处理组 c-Met 的蛋白丰度皆高于 DMSO 对照组。以上结果提示, 阿司匹林可结合至潜在靶点 c-Met 上, 进而增强 c-Met 的热稳定性。

3 阿司匹林可抑制 c-Met 的激酶活性

通过结合激酶的 ATP 口袋, 进而阻断激酶活性是典型的小分子抑制剂作用方式。分子对接的实验结果提示, 阿司匹林有可能通过结合于 ATP 口袋直接抑制 c-Met 的活性。为了验证这一假说, 本研究采用体外激酶活性测定的方式检测了阿司匹林对 c-Met 激酶活性的影响。结果显示, 阿司匹林能够有效抑制 c-Met 的激酶活性, IC₅₀ 为 0.95 mmol·L⁻¹, 在 4 mmol·L⁻¹ 可以达 91.33% ± 2.28% 的抑制率 (图 3)。

4 阿司匹林可抑制 HGF 刺激的 c-Met 信号转导

进一步探究阿司匹林在细胞内对 c-Met 激酶活性的抑制作用, 如图 4 Western blot 结果显示, 阿司匹林能够抑制 HGF 刺激的 c-Met 磷酸化及其关键下游分子 AKT、ERK 的磷酸化。

5 阿司匹林可抑制 HGF/c-Met 介导的细胞分散

HGF 与 c-Met 结合后形成的活化信号轴可促进细胞分散, 刺激细胞脱离原始环境, 是肿瘤发生转移与侵袭的重要标志。本研究采用 HGF 刺激 MDCK 细胞分散的实验, 评估阿司匹林对 HGF/c-Met 介导的细胞分散的影响。如图 5 所示, 阿司匹林处理后能够剂量依赖性地抑制 HGF/c-Met 介导的 MDCK 细胞分散, 在 4 mmol·L⁻¹ 剂量下几乎能够完全阻断细胞分散 (图 5C~E)。为了明确阿司匹林是通过与 c-Met 结合而非与 HGF 结合进而抑制 HGF/c-Met 介导的细胞分散, 在实验中设置阿司匹林预处理组, 即先将阿司匹林与 MDCK 共孵育 6 h, 撤药后更换含有 HGF 的新鲜培养基。结果显示, 阿司匹林预处理依然能够有效抑制 HGF/c-Met 介导的 MDCK 细胞分散, 且呈现浓度依赖性 (图 5F~H)。

6 阿司匹林可抑制 HGF/c-Met 介导的细胞分枝

目前已知 c-Met 活化后能够诱导系列生物学效应, 共同促进细胞的侵袭性生长。基于此, 本研究采用 3D 培养模型, 通过 HGF 激活 c-Met 进而刺激 MDCK 细胞在胶原三维环境的侵袭性生长出现分枝等形态变化。与文献^[32,33]一致, 在没有给予 HGF 刺激的情况下, 仅观察到 MDCK 细胞的圆形囊肿, 给予 HGF 刺激后 MDCK 细

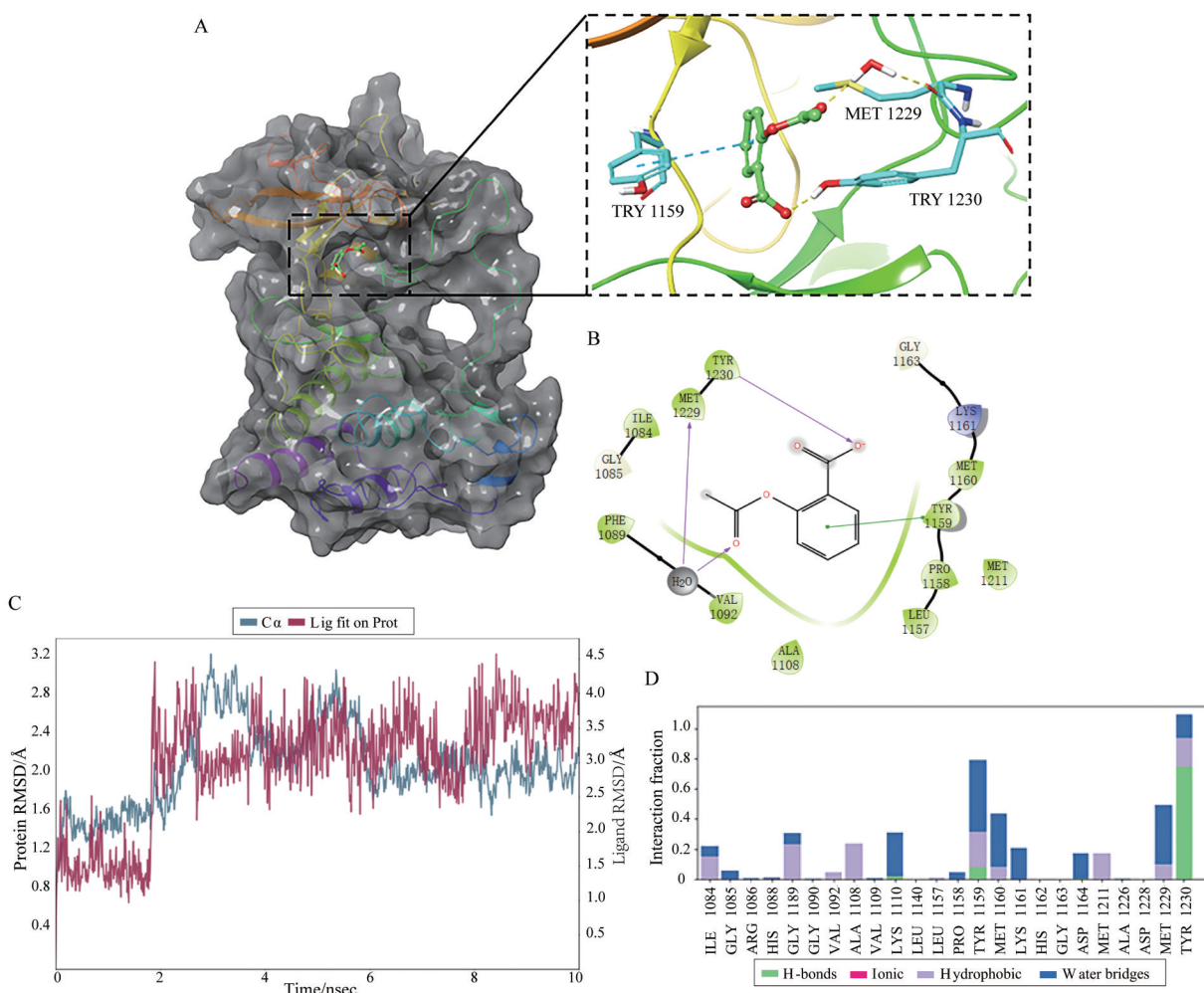


Figure 1 Molecular dynamics (MD) simulations and docking analysis of the binding pose between aspirin with cellular-mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) protein (PDB ID: 7B44). A: 3D protein-ligand binding pose between c-Met and aspirin; B: 2D protein-ligand interaction between c-Met and aspirin; C: RMSD curves of conformational changes of c-Met and aspirin in MD simulations; D: Contribution of each amino acid residue in c-Met protein to its interaction force with aspirin binding

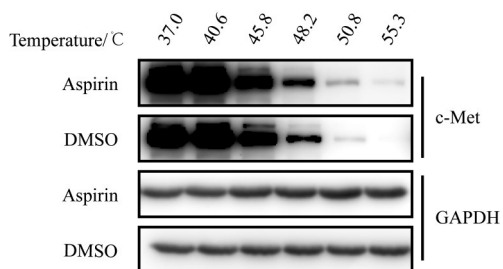


Figure 2 Cellular thermal shift assay (CETSA) for c-Met with SMMC-7721 cells. Target engagement of aspirin (20 mmol·L⁻¹) by CETSA in SMMC-7721 cells detected by Western blot with an anti-c-Met antibody, compared with DMSO treated

胞则出现分枝结构。然后,本研究评估了阿司匹林对HGF/c-Met介导的这一形态变化的影响,与前述实验一致,在给予阿司匹林后能够明显抑制MDCK细胞的这种分枝形态发生(图6),表明阿司匹林抑制了HGF

刺激的c-Met介导的侵袭性生长。

7 阿司匹林可抑制HGF/c-Met介导的肿瘤细胞转移与侵袭

目前,已明确HGF/c-Met的活化能够促进肿瘤细胞迁移运动能力的增强。因此,本研究采用Transwell模型评价了阿司匹林对于HGF/c-Met介导的肿瘤细胞迁移与侵袭能力的影响(图7、8)。首先,本研究进行了阿司匹林对肿瘤细胞杀伤功能的考察,选取不高于30%抑制率的作用浓度及作用时间进行后续的迁移实验(图7A和8A)。从肿瘤细胞迁移实验的结果中可以看出,在HGF刺激下,A431细胞和SMMC-7721细胞的运动能力明显增强(图7C和8C)。而在给予阿司匹林后,可以看到其能够浓度依赖性地抑制HGF/c-Met诱导的肿瘤细胞迁移,4 mmol·L⁻¹剂量下几乎可以完全阻止SMMC-7721细胞和A431细胞的迁移运动能

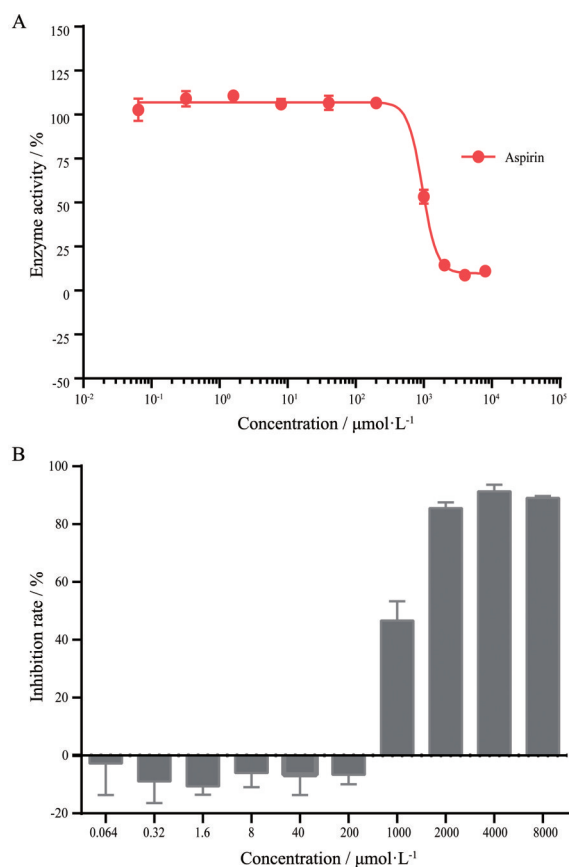


Figure 3 The inhibition effect of aspirin on c-Met kinase activity. A: Aspirin could reduce c-Met kinase activity with $IC_{50} = 0.95 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B: Dose dependent inhibition of c-Met kinase activity by aspirin

力(图7D~F和8D~F)。为了明确该效应是由阿司匹林作用于c-Met引起的,本课题组再次采用了预处理的方式,先将细胞与阿司匹林孵育48 h,撤除阿司匹林后再将肿瘤细胞用HGF进行刺激的方法进行验证。同样,结果显示即使在撤除阿司匹林后,HGF刺激c-Met活化促进肿瘤细胞迁移的能力依然受到限制,且呈现出阿司匹林浓度依赖性(图7G~I)。在肿瘤侵袭实验中(图7J~N),同样可以观察到,阿司匹林剂量依赖性地抑制HGF/c-Met促进肿瘤细胞的侵袭能力。以上结果表明,阿司匹林抑制HGF/c-Met介导的肿瘤迁移与侵袭能力,且抑制作用直接作用于c-Met,与HGF无关。

讨论

c-Met作为一种原癌基因在肿瘤的发生发展中扮演着重要角色^[34]。已有大量研究报道,HGF/c-Met在多种恶性肿瘤中高表达且异常活化,其高表达与HGF的旁分泌/自分泌失调、MET基因扩增相关,HGF/c-Met轴的异常活化则与c-Met基因突变有关,尤其是外显子14跳跃突变导致c-Met泛素化降解受到抑制,进而持

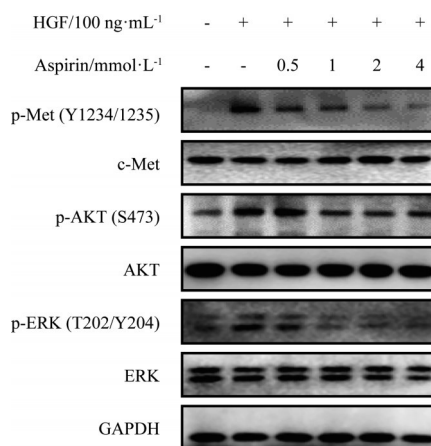


Figure 4 Aspirin suppresses c-Met phosphorylation and downstream signaling in SMMC-7721 cells. Aspirin inhibited hepatocyte growth factor (HGF)-induced c-Met phosphorylation and its downstream signaling in SMMC-7721 cells. Cells treated with aspirin for 2 h following HGF stimulation for 15 min were lysed and subjected to Western blot analysis

续激活。也有研究表明,肿瘤细胞在低氧环境可刺激c-Met的转录进而导致HGF/c-Met轴过表达与活化^[35]。关于c-Met功能的研究揭示了,HGF/c-Met轴所介导的信号转导与肿瘤细胞形态转化、侵袭性生长、迁移侵袭和恶性增殖、血管新生及耐药性密切相关^[36,37]。因此,HGF/c-Met是一个极具前景的肿瘤治疗靶点,靶向阻断HGF/c-Met轴对于肿瘤治疗具有重要的临床治疗与应用意义。包括我国的赛沃替尼在内,全球有5款c-Met小分子抑制剂和1款抗体药物上市^[38]。虽然已展现出令人欣喜的临床效果,但仍然存在着诸如毒副作用强等缺陷。寻找高效、低毒性的靶向HGF/c-Met小分子抑制剂仍具有重要的意义。

阿司匹林在临床中已应用百年,大量研究数据显示,阿司匹林能够抑制肿瘤转移、协同增效其他抗肿瘤药物等作用,但其作用机制仍未阐释清楚^[19,21,39]。本研究基于分子模拟及体外实验验证,首次发现阿司匹林能够与c-Met结合,阻断HGF/c-Met信号轴,进而抑制该信号轴所介导的生物学效应。本研究评估了阿司匹林对于HGF/c-Met信号轴介导的生物学效应的抑制作用。阿司匹林在1 mmol·L⁻¹的浓度下即可有效抑制HGF/c-Met介导的MDCK细胞的分散及肿瘤细胞SMMC-771和A431的迁移运动能力,且呈现浓度依赖性,在4 mmol·L⁻¹的浓度下几乎可以完全抑制HGF刺激c-Met活化的生物学效应。同样地,在HGF刺激下,4 mmol·L⁻¹阿司匹林能够有效抑制c-Met介导细胞侵袭性生长的形态变化。

为了明确阿司匹林的作用靶点是c-Met而非

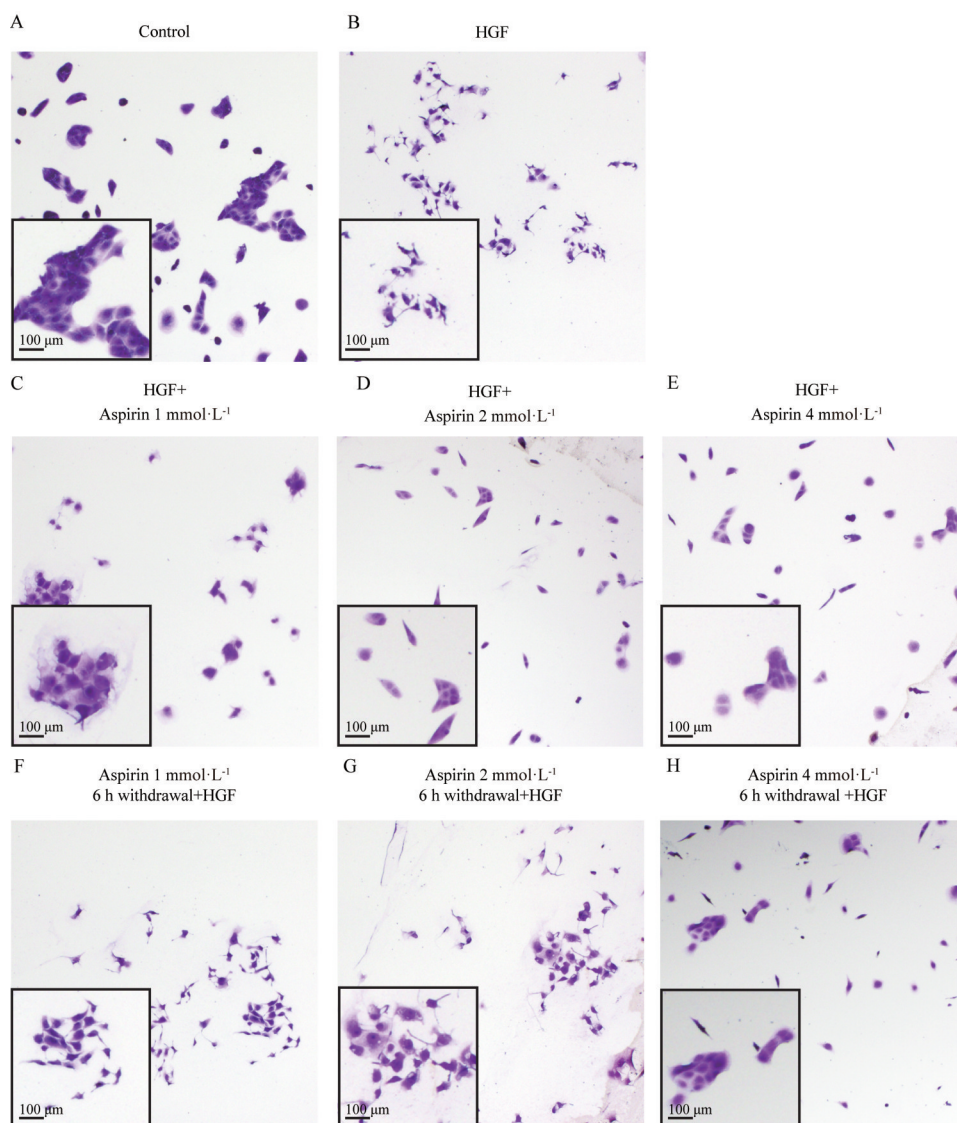


Figure 5 Aspirin inhibits HGF-induced MDCK cell scattering. Cell scattering by MDCK cells induced by HGF were dose-dependently inhibited by aspirin. Representative images from three separate experiments are shown. A: No treated; B: Treated with HGF; C-E: Simultaneous incubation of aspirin and HGF; F-H: Incubation with HGF after aspirin withdrawal. Scale bars: 100 μm

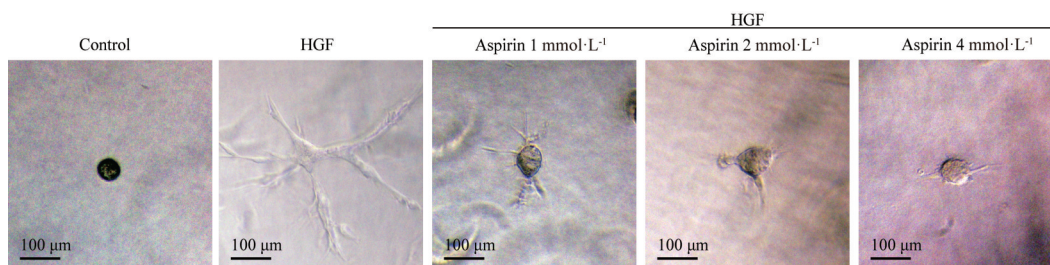


Figure 6 Aspirin significantly inhibited HGF-stimulated invasive cell growth. The MDCK branching morphogenesis on collagen induced by HGF was inhibited by aspirin. Images were obtained 5 days after treatment. Representative images from three separate experiments are shown. Scale bars: 100 μm

HGF, 本研究在细胞分散实验和肿瘤细胞迁移实验中设置了阿司匹林预处理组作为比较。结果显示, 撤除预处理的阿司匹林后, 细胞响应HGF刺激的程度依然

被限制, 且抑制作用与阿司匹林浓度依赖性相关。这些结果佐证了阿司匹林直接作用于c-Met进而阻断HGF/c-Met轴的假说。本研究进一步采用激酶活性检

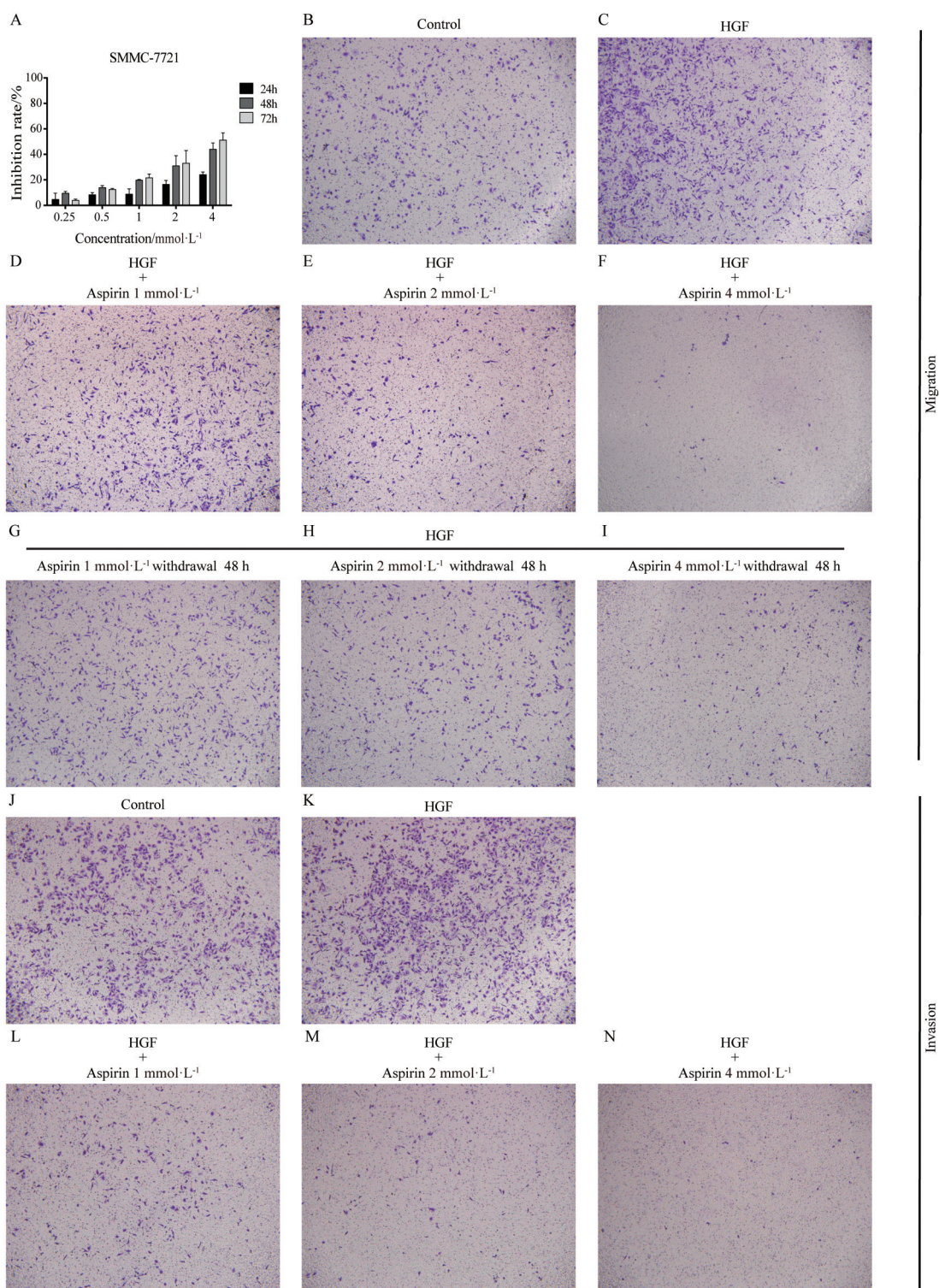


Figure 7 Aspirin prevents HGF/c-Met-induced hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 migration and invasion. A: SMMC-7721 cells were treated with different concentrations of aspirin, cell viability was measured by SRB assay; B–F, J–N: SMMC-7721 cells were treated with HGF and different concentrations of aspirin; G–I: SMMC-7721 cells were pre-treated with aspirin for 48 h, then cells were incubation with HGF after aspirin withdrawal

测和分子对接模拟的手段评估阿司匹林与 c-Met 直接作用的相关性。结果显示,阿司匹林能够抑制 c-Met 的激酶活性, IC₅₀ 为 0.95 mmol·L⁻¹。并且分子对接的结

果表明,阿司匹林与已上市 c-Met 抑制剂克唑替尼的作用方式类似,克唑替尼与 c-Met 蛋白的 Met1160 形成氢键相互作用,和 Pro1158 在 c-Met 激酶的铰链区形成

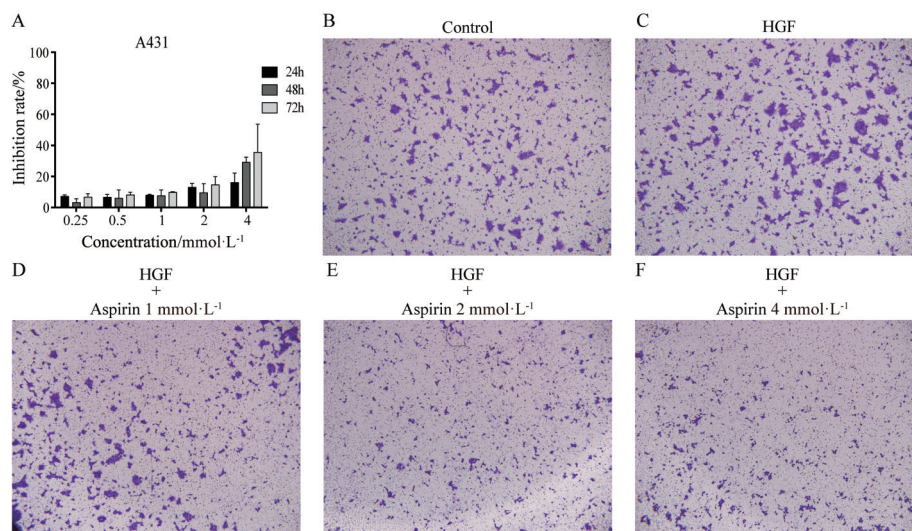


Figure 8 Aspirin prevents HGF/c-Met-induced human squamous carcinoma cells A431 migration. A: A431 cells were treated with different concentrations of aspirin, cell viability was measured by SRB assay; B-F: A431 cells were treated with HGF and different concentrations of aspirin

氢键, 并与 Tyr1230 残基产生 pi-pi 堆积。而阿司匹林能够结合于 c-Met 蛋白的 Tyr1230 形成氢键, 苯环与 Tyr1159 形成 pi-pi 相互作用, 并且乙酰基上的羰基氧原子通过水桥与 Met1229 间接产生氢键相互作用。

尽管相对于 c-Met 小分子抑制剂而言, 阿司匹林对于 c-Met 激酶活性的半数抑制浓度略高, 但由于阿司匹林的低毒性, 在临床中实现这一血药浓度依然具有可行性。如阿司匹林应用于抗风湿时候, 临床用量为每日 3~5 g, 血药浓度为 0.83~1.67 mmol·L $^{-1}$ [40]。有文献[30]报道 HGF/c-Met 的活化能够促进乙酰肝素酶表达, 乙酰肝素酶又可以进一步调控 HGF 的表达与释放, 进而促进肿瘤侵袭转移。结合本文研究者前期已发表的阐述阿司匹林能够抑制乙酰肝素酶活性的研究[29], 可以推断阿司匹林在抑制肿瘤转移过程中发挥着多靶点抑制的功效, 这也进一步解释了为何体外研究中阿司匹林需要相对较高浓度才能够发挥抗肿瘤效应。本研究为全面理解阿司匹林的抗肿瘤转移作用提供了一种新的理论依据, 同时也为靶向 HGF/c-Met 的小分子抑制剂研发提供了新的方向与策略。

作者贡献: 代晓阳负责本研究设计思路; 车金鑫负责分子对接相关实验的设计; 代晓阳、陈思康负责完成相关实验研究, 并完成撰写论文工作。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331: 1559-1564.
- [2] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and

soil' hypothesis revisited [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 453-458.

- [3] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, 127: 679-695.
- [4] Gao Y, Bado I, Wang H, et al. Metastasis organotropism: redefining the congenial soil [J]. *Dev Cell*, 2019, 49: 375-391.
- [5] Fumagalli A, Oost KC, Kester L, et al. Plasticity of Lgr5-negative cancer cells drives metastasis in colorectal cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 569-578.e7.
- [6] Chen KC, Zhang CZ, Ling SB, et al. The metabolic flexibility of quiescent CSC: implications for chemotherapy resistance [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 835.
- [7] Rohani N, Hao LL, Alexis MS, et al. Acidification of tumor at stromal boundaries drives transcriptome alterations associated with aggressive phenotypes [J]. *Cancer Res*, 2019, 79: 1952-1966.
- [8] Liu Y, Cao XT. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30: 668-681.
- [9] Suzuki J, Tsuboi M, Ishii G. Cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2022, 22: 169-182.
- [10] Lai XR, Dong QM, Xu F, et al. Correlation of c-Met expression with clinical characteristics and the prognosis of colorectal cancer [J]. *J Gastrointest Oncol*, 2021, 12: 2203-2210.
- [11] Liang HG, Wang MZ. Met oncogene in non-small cell lung cancer: mechanism of met dysregulation and agents targeting the HGF/c-Met axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2491-2510.
- [12] Anestis A, Zoi I, Karamouzis MV. Current advances of targeting HGF/c-Met pathway in gastric cancer [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6: 247.
- [13] Xing F, Liu Y, Sharma S, et al. Activation of the c-Met pathway mobilizes an inflammatory network in the brain microenvironment to promote brain metastasis of breast cancer [J]. *Cancer*

- Res, 2016, 76: 4970-4980.
- [14] Czyn M. HGF/c-Met signaling in melanocytes and melanoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3844.
- [15] Niikura R, Hirata Y, Hayakawa Y, et al. Effect of aspirin use on gastric cancer incidence and survival: a systematic review and meta-analysis [J]. *JGH Open*, 2020, 4: 117-125.
- [16] Shimura T, Toden S, Komarova NL, et al. A comprehensive *in vivo* and mathematic modeling-based kinetic characterization for aspirin-induced chemoprevention in colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41: 751-760.
- [17] Kane AM, Liu C, Fennell LJ, et al. Aspirin reduces the incidence of metastasis in a pre-clinical study of Braf mutant serrated colorectal neoplasia [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124: 1820-1827.
- [18] Liu JM, Zheng FX, Yang M, et al. Effect of aspirin use on survival benefits of breast cancer patients: a meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100: e26870.
- [19] Ogawa F, Amano H, Ito Y, et al. Aspirin reduces lung cancer metastasis to regional lymph nodes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68: 79-86.
- [20] Matteis RD, Flak MB, Gonzalez-Nunez M, et al. Aspirin activates resolution pathways to reprogram T cell and macrophage responses in colitis-associated colorectal cancer [J]. *Sci Adv*, 2022, 8: eab15420.
- [21] Lucotti S, Cerutti C, Soyer M, et al. Aspirin blocks formation of metastatic intravascular niches by inhibiting platelet-derived COX-1/thromboxane A2 [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129: 1845-1862.
- [22] Feng YQ, Tao L, Wang GQ, et al. Aspirin inhibits prostaglandins to prevents colon tumor formation *via* down-regulating Wnt production [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906: 174173.
- [23] Chen ZG, Li WL, Qiu FM, et al. Aspirin cooperates with p300 to activate the acetylation of H3K9 and promote FasL-mediated apoptosis of cancer stem-like cells in colorectal cancer [J]. *Theranostics*, 2018, 8: 4447-4461.
- [24] Alfonso LF, Srivenugopal KS, Arumugam TV, et al. Aspirin inhibits camptothecin-induced p21CIP1 levels and potentiates apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2009, 34: 597-608.
- [25] Marimuthu S, Chivukula RS, Alfonso LF, et al. Aspirin acetylates multiple cellular proteins in HCT-116 colon cancer cells: identification of novel targets [J]. *Int J Oncol*, 2011, 39: 1273-1283.
- [26] Bhattacharya A, Mukherjee S, Khan P, et al. *SMAR1* repression by pluripotency factors and consequent chemoresistance in breast cancer stem-like cells is reversed by aspirin [J]. *Sci Signal*, 2020, 13: eaay6077.
- [27] Liang A, Wu F, Li CJ, et al. Aspirin inhibits stem cell proliferation during freshwater dugesia japonica regeneration by STAT3/SOX2/OCT4 signaling pathway [J]. *Aquat Toxicol*, 2022, 247: 106158.
- [28] Li L, Mao XG, Qin XM, et al. Aspirin inhibits growth of ovarian cancer by upregulating caspase-3 and downregulating bcl-2 [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17: 4742.
- [29] Dai XY, Yan J, Fu XH, et al. Aspirin inhibits cancer metastasis and angiogenesis *via* targeting heparanase [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 6267-6278.
- [30] Hao NB. The Mechanism of Hepatocyte Growth Factor (HGF) Upregulates Heparanase Expression for Gastric Cancer Metastasis (HGF/c-Met 调控肝素酶表达促进胃癌侵袭转移的分子机制研究) [D]. Chongqing: Third Military Medical University of Chinese P.L.A, 2015.
- [31] Molina DM, Jafari R, Ignatushchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay [J]. *Science*, 2013, 341: 84-87.
- [32] Sachs M, Weidner KM, Brinkmann V, et al. Motogenic and morphogenic activity of epithelial receptor tyrosine kinases [J]. *J Cell Biol*, 1996, 133: 1095-1107.
- [33] Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-Met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88: 408-417.
- [34] Fu JJ, Su XR, Li ZH, et al. HGF/c-Met pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence [J]. *Oncogene*, 2021, 40: 4625-4651.
- [35] Hara S, Nakashiro K, Klosek SK, et al. Hypoxia enhances c-Met/HGF receptor expression and signaling by activating HIF-1alpha in human salivary gland cancer cells [J]. *Oral Oncol*, 2006, 42: 593-598.
- [36] Zambelli A, Biamonti G, Amato A. HGF/c-Met signalling in the tumor microenvironment [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1270: 31-44.
- [37] Shen ZB, Xue WH, Zheng YY, et al. Molecular mechanism study of HGF/c-Met pathway activation and immune regulation for a tumor diagnosis model [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21: 374.
- [38] Guo ZR. China's self-developed anticancer drug--sivotinib [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 839-844.
- [39] Rothwell PM, Wilson M, Price JF, et al. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials [J]. *Lancet*, 2012, 379: 1591-1601.
- [40] Arif H, Aggarwal S. Salicylic Acid (aspirin) [M/OL]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022 [2022-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519032/>.