

## *Shc* 相关磷酸化酪氨酸适配蛋白在衰老过程中的调控作用

张培<sup>1,2</sup>, 池岛乔<sup>3\*</sup>, 森望<sup>1\*</sup>

(1. 长崎大学 医学部, 日本, 长崎 852-8523; 2. 同济大学 医学部, 上海 200092;  
3. 沈阳药科大学 中日医学药学研究所, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** 衰老相关的氧化应激理论和自由基理论能部分地解释衰老过程而被越来越广泛地接受。p66<sup>Shc</sup> (66-kilodalton isoform of *Shc* gene products) 基因编码是一种磷酸化酪氨酸信号适配蛋白, 敲除 p66<sup>Shc</sup> 基因的小鼠模型寿命可延长 30%, 并表现出对氧化应激的抗性。氧化应激时, p66<sup>Shc</sup> 的 Ser36 位点被磷酸化, 进而致叉头转录因子 (forkhead-type transcription factors, FKHR) 失活, 而 FKHR 可调节胞内抗氧化基因的表达。p66<sup>Shc</sup> 信号转导与进化上保守的寿命相关信号转导有直接联系。*Shc* (Src homologue and collagen protein) 基本不表达于成人脑和脊髓的成熟神经元中。然而, 在神经系统中存在两种 *Shc* 同源基因, *Sck/SheB* 和 *N-Shc/SheC*; 并有证据表明它们在氧化应激和脑的衰老中发挥作用。*Shc* 相关基因的表达在老化过程中受到影响, 这可能与衰老时的细胞功能障碍、应激反应和/或认知功能退化有关。

**关键词:** *Shc*; p66; 衰老; 氧化应激; 叉头转录因子

中图分类号: R339.38 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)08-0793-08

## Regulatory effects of *Shc*-related phosphotyrosine adaptor proteins on aging

ZHANG Pei<sup>1,2</sup>, IKEJIMA Takashi<sup>3\*</sup>, MORI Nozomu<sup>1\*</sup>

(1. Medical Department, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, Japan; 2. Medical Department, Tongji University, Shanghai 200092, China; 3. China-Japan Research Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** Aging-related oxidative stress and free radical theory has become accepted increasingly as explanation, at least in part of the aging process. In murine models of aging, a genetic deficiency of the p66<sup>Shc</sup> (66-kilodalton isoform of *Shc* gene products) gene, which encodes a phosphotyrosine signal adapter protein, extends life span by 30%, and confers resistance to oxidative stress. Upon oxidative stress, p66<sup>Shc</sup> is phosphorylated at Ser36, contributing to inactivation of the forkhead-type transcription factors (FKHR/FoxO1), which regulates the gene expression of cellular antioxidants. The p66<sup>Shc</sup> has a direct connection with the life span related signaling, which is conserved evolutionarily. *Shc* is basically not expressed in mature neurons of the adult brain and spinal cord. Instead, two *Shc* homologues, *Sck/SheB* and *N-Shc/SheC*, which have been proved to be effective on oxidative stress and aging, are expressed in neural system. The expression of *Shc*-related genes is affected in the aging process, which may be relevant to cellular dysfunction, stress response and/or cognitive decline during aging.

**Key words:** *Shc*; p66; aging; oxidative stress; forkhead-type transcription factor

收稿日期: 2008-03-06.

\* 通讯作者 Tel / Fax: 86-24-23844463,  
E-mail: ikejimat@vip.sina.com, morinosm@net.nagasaki-u.ac.jp

衰老是生命中一个不可避免的过程。目前,全世界 60 岁以上老年人口总数已达 6 亿。60 多个国家的老年人口达到或超过人口总数的 10%, 进入了人口老龄化社会行列。不得不承认,“世界正在变老”。而衰老的根本机制及能否延缓甚至阻止衰老的进程在今后相当长的一段时间内仍是一个未解之谜。本文就近年来对 *Shc* 基因在衰老中的作用进行浅略的总结与探讨。

### 1 衰老的氧化应激理论和自由基理论

衰老的氧化应激理论和自由基理论<sup>[1]</sup>至少部分解释动物老化<sup>[2,3]</sup>的过程而越来越广泛地被科学界所接受。与氧化应激紧密相关的化合物是活性氧族(reactive oxygen species, ROS), 它们主要是作为氧化电子传递链的副产品在线粒体产生。氧化应激与新陈代谢水平有很好的相关性, 而新陈代谢率与各种有机体的寿命有关<sup>[4]</sup>。氧化应激理论已在线虫、果蝇和啮齿动物的实验中被证实<sup>[5-9]</sup>。药物实验也证实, 银杏总内酯(total lactones of ginkgo, TLG) 的抗氧化作用在小鼠模型中有延缓衰老的作用<sup>[10]</sup>, 人参皂苷 Rg1 (ginsenoside, Rg1) 可明显减弱叔丁基过氧化氢(*t*-BHP) 对 WI-38 细胞衰老的诱导作用<sup>[11]</sup>。此外, 许多证据表明在人类和其他实验模型的老化组织中有更严重的氧化损伤<sup>[2]</sup>。

每个人进行需氧代谢时经受大致相似的内源性氧化应激。然而, 个体或种群间的寿命差异提示或许有其他基因相关因素与寿限决定相关。寿命的基因组成已在一些动物实验中被证实。长寿小鼠品系通常都与特定的基因因素有关。例如 Ames 侏儒小鼠, 在编码垂体前叶特异性转录因子的祖先蛋白(prophet of pituitary, PROP) 的基因上有一处变异<sup>[12]</sup>。在 *C. elegans* 中已发现九类衰老基因<sup>[13]</sup>。支持衰老基因理论的例子在人类包括各种早老综合症, 诸如 Werner's 综合征和 Hutchinson-Gilford 综合征。表面上看来, 氧化应激和基因构成似乎是两个互不相关的衰老决定因素, 然而越来越多的证据表明两者具有内在联系。基因敲除研究和功能分析显示, 在哺乳动物中编码 p66<sup>Shc</sup> 蛋白(*Shc* 磷酸化酪氨酸适配蛋白的最长亚型) 的基因也许是联系氧化应激和衰老基因的交汇点之一。

### 2 *Shc* 与老化生物学的缘起

在小鼠中将 p66<sup>Shc</sup> 基因删除可致长寿<sup>[14]</sup>, 提示 p66<sup>Shc</sup> 是一个氧化还原状态和衰老的基因决定因子。这项研究由意大利的 Pelicci 小组进行。为了阐明 *Shc* 基因产物的功能, 制造出了一个删除 p66<sup>Shc</sup> 基因

的小鼠品系, 但 *Shc* 基因的其他主要产物(p52 和 p46) 的表达不受影响。p66<sup>Shc</sup> 基因敲除小鼠不仅能正常生存, 且比对照组小鼠寿命有所延长。此实验中野生型小鼠的平均寿命为 761 d, 而杂合的(p66<sup>Shc+/-</sup>) 和纯合的(p66<sup>Shc-/-</sup>) 变异小鼠的平均寿命分别为 815 和 937 d(相当于延长了 30%), 且未见这些转基因动物有摄食改变或体重增加<sup>[14]</sup>。相比之下, 另一种 *Shc* 所有亚型的表达产物都被破坏的 *Shc* 基因缺陷体, 具有胚胎致死性<sup>[15]</sup>(图 1)。然而, 用于分析生存曲线的小鼠总数相当有限(野生型, 杂合子变异及纯合子变异小鼠的总数  $n = 37$ ), 因为初衷并不是研究衰老。早在十年前将 *Shc* 认定为致癌基因<sup>[16]</sup>, 在开始这项研究时并无人预料到此结果。

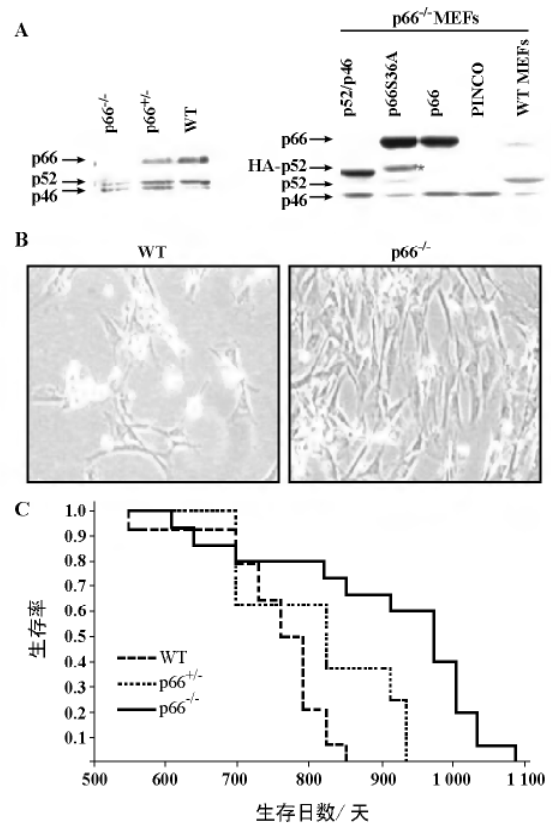


图1 p66<sup>Shc</sup> 缺陷小鼠的寿命. A: 蛋白印记; B: p66<sup>Shc</sup> 基因缺陷小鼠的成纤维细胞对氧化应激耐受; C: p66<sup>Shc</sup> 的纯合子及杂合子变异体的寿命<sup>[14]</sup>

已确认的可延长啮齿动物寿命的方法尚不多见。热量限制和敲除 p66<sup>Shc</sup> 是其中两个。目前已有 7 种小鼠模型被报告具有延长的寿命<sup>[9]</sup>。有证据表

明,与热量限制小鼠相似,零表达  $p66^{Shc}$  的小鼠体内抗氧化应激能力增强与寿命延长有关<sup>[14]</sup>,已有多项实验支持这一设想。当把  $p66^{Shc}$  基因缺陷小鼠饲以高脂肪食物(与对照组相比脂肪含量高 21%),大动脉积累性早期病变与野生型(21%)相比可低达 3%<sup>[17]</sup>,即有较少的血管细胞凋亡和明显较低水平的系统及组织的氧化应激,提示  $p66^{Shc}$  在老化时控制系统氧化应激和血管疾病中发挥着关键作用。另一实验显示,腹腔内注射致氧化剂生成的化合物百草枯(paraquat),普通小鼠会在 48 h 内死亡。而注射相同剂量的百草枯后超过 50% 的  $p66^{Shc-/-}$  小鼠能生存 72 h 以上。 $p66^{Shc-/-}$  小鼠与野生型的同窝仔畜相比生存时间延长了 40%<sup>[14]</sup>。因此,这些转基因动物比其野生型的同窝仔畜能更好地抵抗氧化应激。另有证据证明,在细胞水平, $p66^{Shc}$  在调节氧化应激应答和细胞凋亡中起着关键作用。 $p66^{Shc-/-}$  小鼠的胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)与野生型相比胞内氧化应激基础水平并无差别。与野生型 MEFs 不同的是,当营养剥夺或血清饥饿时, $p66^{Shc-/-}$  细胞很难产生活性氧族作为应答<sup>[17]</sup>。当遭受到  $H_2O_2$  或紫外线照射导致的氧化应激, $p66^{Shc-/-}$  细胞与野生型相比更不易凋亡。在基因敲除细胞中含野生型  $p66^{Shc}$  的质粒的表达可使细胞恢复对氧化应激的正常敏感度。对正常 MEFs 细胞转基因使  $p66^{Shc}$  过表达,可导致相同状况下对凋亡的敏感度增加<sup>[14]</sup>。这些结论支持了  $p66^{Shc}$  可能通过调节氧化剂生成及诱导凋亡参与调节老化过程的理论。 $p66^{Shc}$  敲除小鼠引起氧化应激程度较低,本应随年龄增长的痛觉敏感及情绪化现象没有或仅有轻微表现,这是首例对此类基因变异小鼠的行为特征报告<sup>[18]</sup>。*Shc* 在衰老和寿命决定中的潜在功能仅限于这种变异小鼠,尚无证据来自其他有机体的 *Shc* 基因变异。有研究检测了 30 位年轻人和 30 位长寿者的  $p66^{Shc}$  基因区域,没有发现明显的变异差异<sup>[5]</sup>。

## 2.1 关于 *Shc* 家族

### 2.1.1 概况

在哺乳动物中已发现了 3 种 *Shc* 基因: *ShcA*、*ShcB*(*Sli*)和 *ShcC*(*Rai*)<sup>[8]</sup>。对于人类和小鼠, *ShcA* 蛋白广泛分布于除脑和神经元之外的多种组织中,与多种细胞生长分化存活和死亡的信号转导机制有关<sup>[19-21]</sup>。有证据表明 *ShcA* 丰富表达于生长中的神经元,但神经元成熟后其基因表达显著下降。此现象促使人们在神经系统中寻找到 *ShcA* 的同源基因, *ShcB* 和 *ShcC*。 *ShcC* 选择性表达于中枢神经元,而 *ShcB* 在周围神经元中大量存

在<sup>[22]</sup>。*ShcA*、*ShcB* 和 *ShcC* 也分别被称为 *Shc*、*Sck* 和 *N-Shc*<sup>[20,21]</sup>(图 2)。

### 2.1.2 结构

*ShcA* 基因编码 2 种 mRNA:  $p66^{Shc}$  和  $p46/p52^{Shc}$ 。  $p46/p52^{Shc}$  mRNA 的转录起始位点在  $p66^{Shc}$  mRNA 起始位点上游的 3900 碱基对处。因为转录起始位点的不同,由相同的 mRNA 可转录出  $p46^{Shc}$  和  $p52^{Shc}$ <sup>[23]</sup> 两种蛋白质。每种 *ShcA* 蛋白都含有 3 个相同的功能区: 一个 N 端磷酸化酪氨酸结合区(PTB)( $p46$  亚型的此区稍有截短), 一个中央脯氨酸富集区(CH1) 和一个羧基端 *Src* 同源 2 区(SH2)。 $p66^{Shc}$  和  $p46$  或  $p52^{Shc}$  的不同之处在于它还含有一个 N 端脯氨酸富集区(CH2)<sup>[8]</sup>。 $p66^{Shc}$  蛋白含有两个丝氨酸磷酸化位点, CH2 区的 Ser36 和 PTB 区的 Ser138。Ser36 只存在于  $p66^{Shc}$ , 这个特有的 Ser36 位点的磷酸化似乎能影响胞内的氧化应激及凋亡。 $p66^{Shc}$  已被研究证明在细胞的氧化应激应答中起重要作用, 通过叉头转录因子家族调节胞内氧化还原平衡及凋亡。 $p66^{Shc}$  在氧化应激状况下调节 FoxO(forkhead box class O) 转录因子的活性, 而 FoxO 是 PI3K-AKT-FoxO 信号转导途径中的环节。 $p66^{Shc}$  上的丝氨酸磷酸化位点的磷酸化状态直接影响其信号适配功能, 从而参与细胞的凋亡调控。而 *Shc* 的短亚型,  $p46/p52^{Shc}$  通过与细胞表面的有丝分裂信号受体结合而参与 Ras-MAPK(mitogen-activated protein kinase) 信号转导途径, 此途径影响细胞的增殖和分化。磷酸化位点表明  $p66^{Shc}$  参与磷

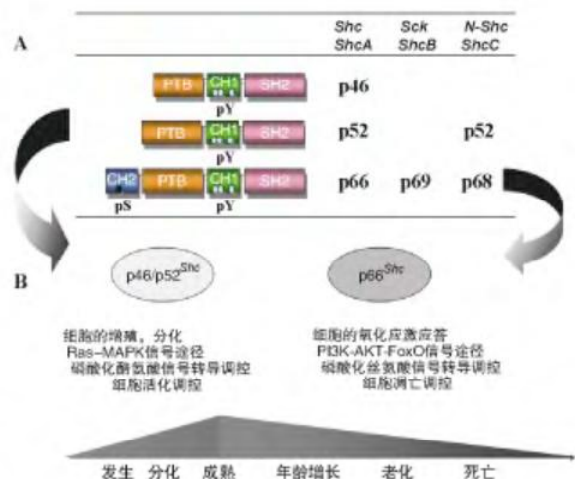


图 2 *Shc* 相关磷酸化酪氨酸适配蛋白的多样性及其多种作用. A: *Shc* 亚型及 *Shc* 同系物的基因家族及功能域特征; B: *Shc* 小亚型( $p46$  和  $p52$ ) 及大亚型( $p66$ ) 在细胞分化, 成熟和衰老中的作用

酸化酪氨酸信号转导调控,进而在细胞的活化调控中发挥作用。

*ShcB* 为 69 kD 的蛋白质(p69),且没有短亚型存在。*ShcC* 至少以 2 种亚型出现,即 p52 和 p68。*ShcB* 和 *ShcC* 的功能域特征与 *ShcA* 基本相同,即有 1 个 CH1(calponin homology 1)信号输出区位于两个磷酸化酪氨酸结合区 PTB(phosphotyrosine binding)和 SH2(Src homology 2)之间(图 2)。

*ShcA* 被激活后 Grb2(growth factor receptor-bound protein 2)可结合于其 CH1 区的磷酸化酪氨酸残基上,进而顺序激活 Ras-MAPK 途径。*Shc* 相关蛋白之间,与 Grb2 结合的特异性稍有差异。*ShcA* 保留有 2 个 Grb2 结合位点,而 *ShcC* 仅有 1 个。

## 2.2 p66<sup>Shc</sup> 在氧化应激信号转导中的作用

迄今为止,最重要的控制寿命的信号通路是从胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor, IGF1R)到 FKHR,这一通路在进化上保守。*Shc* 最初被认为与此衰老相关信号通路无直接联系。p66<sup>Shc</sup> 特有的 Ser36 位点的磷酸化似乎能影响胞内的氧化应激及凋亡。将一种 Ser36 变异了的 p66<sup>Shc</sup> 转入零表达 p66<sup>Shc</sup> 的细胞,不能恢复此细胞的凋亡敏感性<sup>[14]</sup>,说明 Ser36 在凋亡调节中的重要性。Ser36 磷酸化的 p66<sup>Shc</sup> 的一个重要的下游靶点是一些叉头转录因子,它们属于一个至少有 80 个成员的叉头转录因子家族。激活的 p66<sup>Shc</sup> 可在 Akt/PKB(protein kinase B)的介导下帮助叉头蛋白磷酸化<sup>[17,24,25]</sup>。叉头蛋白的磷酸化导致此蛋白转位到胞质并失活。而叉头转录因子可调节许多重要基因的转录,包括凋亡、DNA 损伤、氧化应激和能量代谢相关基因等。在淋巴细胞中,叉头转录因子的失活似乎是一种细胞生存机制<sup>[26]</sup>,而在包括神经元细胞和成纤维细胞在内的其他类型的细胞中则阻止细胞凋亡。叉头转录因子可调节几种抗氧化剂酶的表达,包括超氧化物歧化酶和触酶<sup>[17,27]</sup>。在氧化应激后,叉头转录因子能优先诱导抗氧化剂基因或生存基因,而 p66<sup>Shc</sup> 可阻滞这一机能。因此,在缺乏 p66<sup>Shc</sup> 的细胞中,氧化应激可导致更显著的叉头活动增强,使这些细胞更不易凋亡<sup>[17]</sup>。叉头转录因子既能促进又能阻止凋亡,过多或过少的叉头蛋白都可致细胞死亡<sup>[24,28]</sup>,可能与基因剂量效应有关。对线虫的寿命研究支持了叉头蛋白的基因剂量假说<sup>[29-31]</sup>。在这个模型中发现少量增加 Daf16(叉头转录因子家族成员)可适度增加寿命,而过多的

Daf16 可致生长停滞<sup>[32]</sup>。总之,敲除 p66<sup>Shc</sup> 基因可适当增加叉头转录因子的活性,并因此增加抗氧化酶的表达,因而可致长寿。p66<sup>Shc</sup> 促进凋亡并控制细胞内氧化还原平衡。线粒体的能量状态是 p66<sup>Shc</sup> 功能的关键决定因素<sup>[4]</sup>,一部分 p66<sup>Shc</sup> 存在于线粒体,调节线粒体的氧化能力及能量代谢<sup>[6]</sup>,并且在此氧化细胞色素 c,形成过氧化氢,可导致线粒体通透和凋亡<sup>[33]</sup>(图 3)。已有证据表明,氧化还原缺陷变异的 p66<sup>Shc</sup> 在体外不能导致线粒体活性氧簇的产生和肿胀,在体内不能介导线粒体凋亡。此结果证明线粒体电子传递链中应存在其他的氧化还原反应,而 p66<sup>Shc</sup> 通过此反应产生前凋亡活性氧簇作为对特定应激信号的应答<sup>[1]</sup>。在细胞氧化应激下,蛋白激酶 C $\beta$  被脯氨酰异构酶 Pin1 识别后,引起 p66<sup>Shc</sup> 的磷酸化及在细胞中积累,揭示了氧化应激与 p66<sup>Shc</sup> 的线粒体凋亡活性之间的纽带<sup>[34]</sup>。另有实验发现, P66<sup>Shc</sup> 与晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)相关的肾小球疾病的发病机制有关,因其可介导 AGE 导致的组织损伤及 AGE 进一步形成。敲除 p66<sup>Shc</sup> 基因的小鼠与野生型相比活性氧簇生成减少,因而循环系统及组织中的 AGE 水平降低,没有或只显示轻微症状的肾小球疾病<sup>[2]</sup>,此机制同样适用于糖尿病导致的肾小球病变的小鼠模型<sup>[2]</sup>。此外,缺少 p66<sup>Shc</sup> 的小鼠 p66<sup>Shc</sup><sup>-/-</sup>对 ROS 抵抗力增强, p66<sup>Shc</sup><sup>-/-</sup> 小鼠可抗高血糖导致的 ROS 依赖的内皮功能障碍<sup>[3]</sup>。

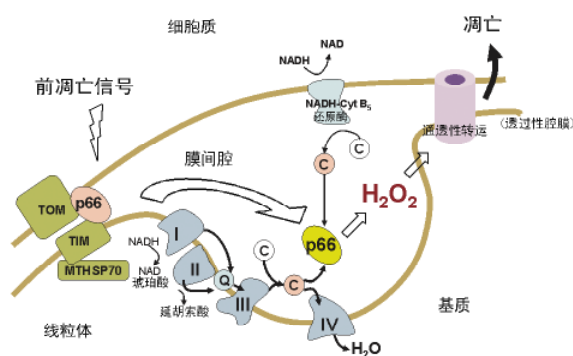


图 3 p66<sup>Shc</sup> 在线粒体中与细胞色素 c 的相互作用

## 2.3 神经 Shc 同源染色体: Sck/ShcB 和 N-Shc/ShcC

对于线虫(*C. elegans*)、果蝇(*D. melanogaster*)及小鼠长寿变异体的基因分析显示从 IGF1R 经 PI3K 和 AKT/PTB 到 FKHR 的信号通路的重要性。神经

系统是这个通路的关键。在 *C. elegans* 中感觉神经元传入对于通过 *daf* 相关基因产物的寿命控制是必要的<sup>[35]</sup>。适配蛋白 *ShcA* 与多种细胞生长分化存活和死亡的信号转导机制有关<sup>[19~21]</sup>。然而, *ShcA* 在成熟脑的大多数神经元中不表达。在产前及出生后脑的发育中, *ShcA* 丰富表达于生长中的神经元, 但随后其基因表达显著下降。这表明也许脑中存在其他 *Shc* 相关蛋白。本实验室已发现并描述了神经 *ShcC* (N-*Shc*) 在成熟脑的神经元中丰富表达<sup>[36,37]</sup>。此外, 另一 *Shc* 同源基因 *ShcB* (*Sck*), 表达于周围和中枢神经系统的神经元中。它们的表达状况不尽相同, *ShcC* 选择性表达于中枢神经元, 而 *ShcB* 在周围神经元中大量存在<sup>[22]</sup>。因此, 在神经元中 *Shc* 同源基因可能负起 *Shc* 的责任(图 4)。

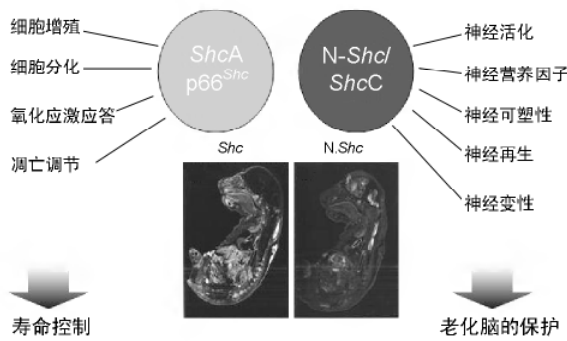


图 4 孕 19 d 大鼠胚胎旁矢状切面的原位杂交<sup>[20,34]</sup>

本实验室已确定神经元特异性 *ShcC* 对脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的刺激应答, 并与 TrkB (tropomyosin-related kinase B) 受体相互作用。与 TrkB 结合后, *ShcC* 上的几个酪氨酸残基被磷酸化<sup>[38]</sup>, 这些位点随后与其他适配蛋白诸如 Grb2 结合。这些 *Shc* 相关成员的基因表达受发育调控, 且视网膜发育过程中 *ShcC* 的基因表达和 TrkB 高度相关<sup>[39]</sup>。实验表明, *ShcC* 与 Ret 蛋白结合后参与到 PI3K/Atk 信号途径中, 从而阻止细胞凋亡<sup>[40]</sup>。

*ShcC* 已被检测像  $p66^{Shc}$  一样对氧化应激应答。将 *ShcA* 和 *ShcC* 的 cDNA 导入人类成纤维细胞瘤 SY5Y 细胞及大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞中, 用不同浓度的过氧化氢处理细胞。经过  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  过氧化氢处理后,  $p66^{Shc}$  对应的谱带呈现上移, 说明  $p66^{Shc}$  被磷酸化。 *Shc* 的短亚型  $p52$  和  $p46$  未显示任何有

意义的带移。相比之下, 转染的 *ShcC* 的两种亚型  $p68$  和  $p52$  都有上移, 说明 *ShcC* 可能在 N 端 CH2 区和一些下游区域也有磷酸化现象。还有研究显示, *ShcC* 基因敲除小鼠脑的海马区活性增强, 因此认知能力提高<sup>[41]</sup>。这些结果表明表达于神经元的 *Shc* 相关成员在氧化应激和衰老时会有潜在的神保护功能<sup>[42]</sup>。

与 *ShcC* 不同的是, *ShcB* 在神经系统中的作用尚不明了。 *ShcB* 与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 受体受到 VEGF 刺激后的激活有关<sup>[43]</sup>, 因此可能作用于低氧应答。

#### 2.4 *Shc* 与衰老信号

FKHR 是叉头转录因子家族的成员, FKHR 信号途径被认为是寿命相关信号通路的干路, 而氧化应激相关的 *Shc* 信号途径可看作其中的支路。此信号转导途径从胰岛素样生长因子受体被激活开始, 通过 PI3K 激活 AKT/PKB, 对调节转录因子 FoxO (包括 FKHR) 起关键作用, 这种转录因子调节许多靶基因的表达, 进而影响细胞凋亡, DNA 损伤, 氧化应激应答及能量代谢。因此, FoxO 在衰老和寿命的调控中起重要作用。 *Shc* 的大亚型  $p66^{Shc}$ , 在氧化应激状况下调节 FoxO 的活性。因此,  $p66^{Shc}$  与 FoxO 之间的信号通路在于氧化应激与衰老的关键信号事件的交叉<sup>[42]</sup> (图 5)。总之, 轻度抑制此信号途径可导致寿命延长, 此即所谓的“长寿信号”。相似地, 从表皮生长因子 (endothelial growth factor, EGF) 及其受体, 经 Grb2、Sos、Erk 等级联激活转录因子的 c-Fos 途径中有  $p52^{Shc}$  的参与, 此通路作用于细胞的激活及分化, 因此可看作“活化信号”。

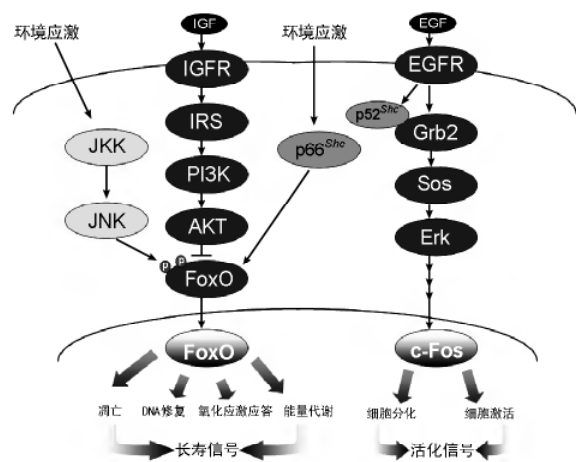


图 5 寿命相关信号转导的干路与支路

尽管细胞生长率通常随着年龄的增加而降低,认为是生长因子(如 EGF)刺激后细胞应答信号的缺失。主要的细胞生长信号通路是 Ras-MAPK,而这一通路的活动受衰老的影响。细胞生长的 EGF 应答在老龄动物中明显降低。然而,EGF 受体(endothelial growth factor receptor, EGFR)表达水平及 EGF 亲和力并不受年龄影响<sup>[44]</sup>。应答降低的主要原因似乎是 *Shc* 结合 EGFR 的活性降低<sup>[45]</sup>。当用 EGF 刺激幼龄和老龄大鼠的肝细胞,酪氨酸磷酸化水平无改变,而 *Shc* 结合水平及 *Shc* 磷酸化水平在老龄细胞中有所降低。EGFR 上最易受影响的酪氨酸磷酸化位点是 Tyr1173,它是 *Shc* 结合的主要位点。因此,其他 Grb2 或 PLC $\gamma$ (phospholipase C $\gamma$ )结合位点似乎并未受影响。*Shc* 位点最易受衰老的影响的机制尚未明了,但 *Shc* 信号似乎是长寿和衰老的关键。

### 3 结语

实验表明动物体内氧化应激应答机制与衰老或/和长寿有直接联系。 $p66^{Shc}$  信号适配蛋白定位于氧化应激与寿命相关信号的叉路口上且致 FKHR 激活, $p66^{Shc}$  功能缺失导致氧化应激抗性增加及长寿<sup>[46]</sup>,这些事实提示用药理学的干预方法下调  $p66^{Shc}$  的功能,进而在成年后可拥有一个更高的生活质量。 $p66^{Shc}$  的表达受其启动子甲基化状态的调节<sup>[23]</sup>,暗示  $p66^{Shc}$  启动子甲基化状态可能与人类衰老有关。然而,如果  $p66^{Shc}$  表达缺失确与长寿正相关,改变人体中  $p66^{Shc}$  启动子甲基化状态或  $p66^{Shc}$  蛋白表达相当复杂。因此,减少氧化应激仍然是延缓衰老及预防衰老相关疾病的关键。

在幼龄和 30 个月龄的大鼠的脑脊髓和后肢肌肉中检测 *Shc* 相关蛋白的基因表达<sup>[47]</sup>。*ShcA* 基因表达在老龄组织中有所上调, $p46^{Shc}$  和  $p66^{Shc}$  分别在老龄动物的脊髓和肌肉中有所增加。而 *ShcB* mRNA 的表达有所下调,*ShcC* 的表达不受年龄影响。这些有待进一步研究。

槲皮素(quercetin)可抑制血管紧张素 II 对 *Shc* 的快速酪氨酸磷酸化作用,从而抑制 *Shc* 的活性<sup>[48]</sup>。槲皮素和水飞蓟宾(silibinin)还可通过增强 SOD 活性等抗氧化机制拮抗分别由阿霉素和异丙肾上腺素所致的小鼠心肌损伤<sup>[49,50]</sup>。抗皮肤癌药的研究显示,水飞蓟宾和表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin 3-gallate, EGCG)也可抑制 *Shc* 的活性<sup>[51]</sup>。这些结果提示也许有望通过药理学手段干预衰老的进程。

与其他年龄段相比, $p66^{Shc}$  在百岁老人成纤维细胞中居然是高表达<sup>[52]</sup>,在低氧应激时又独特地呈现出  $p66^{Shc}$  表达降低,这一现象与敲除  $p66$  可致长寿的理论截然相反,进一步印证了  $p66^{Shc}$  基因与长寿的相关性及这种关系的复杂性<sup>[7]</sup>。总之,*Shc* 基因家族及其表达产物在氧化应激及衰老过程中的作用还有待进一步探索。

### References

- [1] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [J]. *J Gerontol*, 1956, 11: 298 - 300.
- [2] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78: 547 - 581.
- [3] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408: 239 - 247.
- [4] Kapahi P, Boulton ME, Kirkwood TB. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26: 495 - 500.
- [5] Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation [J]. *Aging Cell*, 2002, 1: 117 - 123.
- [6] Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, et al. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction [J]. *Science*, 1999, 285: 1390 - 1393.
- [7] Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 1994, 263: 1128 - 1130.
- [8] Phillips JP, Campbell SD, Michaud D, et al. Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2761 - 2765.
- [9] Melov S, Ravenscroft J, Malik S, et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics [J]. *Science*, 2000, 289: 1567 - 1569.
- [10] Dong LY, Fan L, Li GF, et al. Anti-aging action of the total lactones of ginkgo on aging mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004, 39: 176 - 179.
- [11] Zhao CH, Chen XC, Jin JS, et al. Effect of ginsenoside Rg1 on expression of p21, cyclin E and CDK2 in the process of cell senescence [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004, 39: 673 - 676.
- [12] Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, et al. Mutations in *PRO1* cause familial combined pituitary hormone deficiency [J]. *Nat Genet*, 1998, 18: 147 - 149.
- [13] Johnson TE, Cypser J, de Castro E, et al. *Gerontogenes*

- mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors [J]. *Exp Gerontol*, 2000,35:687 – 694.
- [14] Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals [J]. *Nature*, 1999,402:309 – 313.
- [15] Lai KM, Pawson T. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo [J]. *Genes Dev*, 2000,14:1132 – 1145.
- [16] Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, et al. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction [J]. *Cell*, 1992,70:93 – 104.
- [17] Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, et al. Deletion of the p66<sup>Shc</sup> longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherosclerosis in mice fed a high-fat diet [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100:2112 – 2116.
- [18] Nemoto S, Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66<sup>Shc</sup>-dependent signaling pathway [J]. *Science*, 2002,295:2450 – 2452.
- [19] Bonfini L, Migliaccio E, Pelicci G, et al. Not all Shc's roads lead to Ras [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996,21:257 – 261.
- [20] Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, et al. Evolution of Shc functions from nematode to human [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000,10:668 – 674.
- [21] Ravichandran KS. Signaling *via* Shc family adapter proteins [J]. *Oncogene*, 2001,20:6322 – 6330.
- [22] Nakamura T, Muraoka S, Sanokawa R, et al. N-Shc and Sck, two neuronally expressed Shc adapter homologs. Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling [J]. *J Biol Chem*, 1998,273:6960 – 6967.
- [23] Ventura A, Luzi L, Pacini S, et al. The p66<sup>Shc</sup> longevity gene is silenced through epigenetic modifications of an alternative promoter [J]. *J Biol Chem*, 2002,277:22370 – 22376.
- [24] Tang ED, Nuñez G, Barr FG, et al. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt [J]. *J Biol Chem*, 1999,274:16741 – 16746.
- [25] Guo S, Rena G, Cichy S, et al. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence [J]. *J Biol Chem*, 1999,274:17184 – 17192.
- [26] Dijkers PF, Birkenkamp KU, Lam EW, et al. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal; protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity [J]. *J Cell Biol*, 2002,156:531 – 542.
- [27] Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress [J]. *Nature*, 2002,419:316 – 321.
- [28] Biggs WH III, Cavenee WK, Arden KC. Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse [J]. *Mamm Genome*, 2001,12:416 – 425.
- [29] Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans* [J]. *Nature*, 1997,389:994 – 999.
- [30] Lin K, Dorman JB, Rodan A, et al. daf-16: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 1997,278:1319 – 1322.
- [31] Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms [J]. *Nature*, 2000,408:255 – 262.
- [32] Johnson TE, de Castro E, de Castro SH, et al. Relationship between increased longevity and stress resistance as assessed through gerontogene mutations in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Exp Gerontol*, 2001,36:1609 – 1617.
- [33] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis [J]. *Cell*, 2005,122:221 – 233.
- [34] Pinton P, Rimessi A, Marchi S, et al. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc [J]. *Science*, 2007,315:659 – 663.
- [35] Apfeld J, Kenyon C. Regulation of lifespan by sensory perception in *caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1999,402:804 – 809.
- [36] Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki Y, et al. N-Shc: a neural-specific adapter molecule that mediates signaling from neurotrophin/Trk to Ras/MAPK pathway [J]. *Oncogene*, 1996,13:1111 – 1121.
- [37] O'Bryan JP, Songyang Z, Cantley L, et al. A mammalian adaptor protein with conserved Src homology 2 and phosphotyrosine-binding domains is related to Shc and is specifically expressed in the brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93:2729 – 2734.
- [38] Nakamura T, Komiya M, Gotoh N, et al. Discrimination between phosphotyrosine-mediated signaling properties of conventional and neuronal Shc adapter molecules [J]. *Oncogene*, 2002,21:22 – 31.
- [39] Nakazawa T, Nakano I, Sato M, et al. Comparative

- expression profiles of Trk receptors and Shc-related phosphotyrosine adaptors during retinal development: potential roles of N-Shc/ShcC in brain-derived neurotrophic factor signal transduction and modulation [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68:668-680.
- [40] Pelicci G, Troglio F, Bodini A, et al. The neuron-specific Rai (ShcC) adaptor protein inhibits apoptosis by coupling Ret to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22:7351-7363.
- [41] Yoshiaki M, Ling C, Masahiro S, et al. Hippocampal synaptic modulation by the phosphotyrosine adapter protein ShcC/N-Shc *via* interaction with the NMDA receptor [J]. *J Neurosci*, 2005, 25:1826-1835.
- [42] Mori N, Zhu W, Sone K, et al. Roles of Shc signaling in oxidative stress response and aging [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2003, 34:69-76.
- [43] Igarashi K, Shigeta K, Isohara T, et al. Sck interacts with KDR and Flt-1 *via* its SH2 domain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251:77-82.
- [44] Barogi S, Baracca A, Cavazzoni M, et al. Effect of the oxidative stress induced by adriamycin on rat hepatocyte bioenergetics during ageing [J]. *Mech Ageing Dev*, 2000, 113:1-21.
- [45] Hutter D, Yo Y, Chen W, et al. Age-related decline in Ras/ERK mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Shc and EGF receptor [J]. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*, 2000, 55:B125-134.
- [46] Purdom S, Chen QM. p66<sup>Shc</sup>: at the crossroad of oxidative stress and the genetics of aging [J]. *Trends Mol Med*, 2003, 9:206-210.
- [47] Jiang X, Edstrom E, Altun M, et al. Differential regulation of Shc adaptor proteins in skeletal muscle, spinal cord and forebrain of aged rats with sensorimotor impairment [J]. *Ageing Cell*, 2003, 2:47-57.
- [48] Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, et al. Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60:656-665.
- [49] Pei TX, Xu CQ, Li B, et al. Protective effect of quercetin against adriamycin-induced cardiotoxicity and its mechanism in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42:1029-1033.
- [50] Zhou B, Wu LJ, Tashiro S, et al. Protective effect of silibinin against isoproterenol-induced injury to cardiac myocytes and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42:263-268.
- [51] Bhatia N, Agarwal C, Agarwal R. Differential responses of skin cancer-chemopreventive agents silibinin, quercetin, and epigallocatechin 3-gallate on mitogenic signaling and cell cycle regulators in human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. *Nutr Cancer*, 2001, 39:292-299.
- [52] Pandolfi S, Bonafè M, Di Tella L, et al. p66 (shc) is highly expressed in fibroblasts from centenarians [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126:839-844.