

# 一酸化窒素 (NO) のヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン代謝への影響

大槻 真澄

一般に神経伝達物質または血管拡張因子として知られる一酸化窒素 (NO) は、創傷局所においてマクロファージや好中球により産生され、創傷治癒機転に関与する可能性がある。本研究で著者は、NO のヒト皮膚由来線維芽細胞に対するコラーゲン代謝に関する検討を行った。ヒト皮膚由来線維芽細胞を NO 産生物質で刺激し、 $\alpha_1(I)$  および  $\alpha_1(III)$  コラーゲン、コラーゲナーゼの発現をタンパク、酵素活性、メッセンジャー RNA (mRNA) の各レベルで検討した。その結果、NO が転写レベルからのコラーゲン合成、コラーゲナーゼを含むプロテアーゼの活性の亢進に作用することが認められた。これらの結果は、NO が炎症部位においても、細胞間メディエーターとして機能し、それを受容した皮膚線維芽細胞のコラーゲン代謝を亢進させることにより、創傷治癒過程に関与することを示唆している。

(平成 9 年 10 月 20 日受理)

## Effect of Nitric Oxide on Collagen Synthesis in Cultured Human Dermal Fibroblasts

Masumi OTSUKI

Nitric oxide is an important cytotoxic agent for host defense which also regulates signal transduction and vasodilation. Product by macrophages, neutrophils and inflammatory cells, nitric oxide has been reported to have the same effects on the wound healing process. The purpose of this study was to investigate whether collagen synthesis in human dermal fibroblasts is stimulated by nitric oxide. In this study, we analyzed collagen and collagenase expression in cultured fibroblasts stimulated by a nitric oxide generator. The relative rate of collagen synthesis to total protein synthesis in human dermal fibroblasts stimulated by nitric oxide increased to that of not stimulated cells. An increased level of collagen mRNA was found in the fibroblasts stimulated by nitric oxide. Increased levels of collagenase mRNA, collagenase activity were also observed. These results indicate that human dermal fibroblasts increase collagen synthesis in response to nitric oxide, suggesting that nitric oxide seems to play some role in wound healing. (Accepted on October 20, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(3) : 135-142, 1997

**Key Words** ① Human dermal fibroblasts ② Nitric Oxide

### ③ Collagene synthesis

#### はじめに

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) は、1987年に血管内皮細胞で産生される平滑筋弛緩物質 (EDRF) として報告された<sup>1), 2)</sup>。その後NOは脈管に対し、血管弛緩作用だけでなく、血小板粘着凝集抑制作用、血管平滑筋増殖抑制作用などを持つことが報告され、また神経系では神経伝達物質として作用し、シナプスの可塑性にも関与することが示された<sup>3), 4)</sup>。

感染、炎症、免疫応答においては、NOは主にマクロファージによって産生され、同時に産生される活性酸素、その他の抗微生物物質、抗腫瘍物質などとともに、腫瘍細胞を傷害し、微生物による感染を防ぎ、生体を防御する役割があると推定されている<sup>5)</sup>。事実、微生物感染があると、これらの微生物の放出する種々の物質、あるいは微生物により刺激を受けた免疫系細胞が放出するサイトカインにより、マクロファージのNO合成酵素が活性化され、それにより産生されたNOが、感受性のある微生物に対し殺菌作用を示すと考えられている。しかし、その殺菌作用は局所で合成されるNO<sub>2</sub>や活性酸素に比して弱く、炎症におけるNO産生亢進の病態における意義は明らかではない。炎症におけるNO産生亢進の病態に対する意義については未だ合理的な説明がない。

近年、NO合成阻害剤を投与されたマウスにおいて、創傷治癒が遅延することが示された<sup>6)</sup>。そこで著者は、創傷治癒過程でNOが、血管系や神経系と同じく、細胞間刺激伝達物質として創傷治癒に関与している可能性を考え、本研究を計画した。

ヒト皮膚真皮線維芽細胞のコラーゲン代謝に対するNOの影響を培養条件下で検討するため、ヒト皮膚より正常線維芽細胞株を作成、NO産生物質の存在下で培養し、線維芽細胞のコラーゲン合成能、プロテアーゼおよびコラゲナーゼ

### ④ Collagenase

活性を測定し、また $\alpha_1$ (I)および $\alpha_1$ (III)コラーゲン、コラゲナーゼ、の各メッセンジャーRNA (mRNA) レベルについて検討した。さらにその結果から創傷治癒過程におけるNOの役割について考察した。

#### 材料と方法

##### 1) 材料

手術時に得た患部周辺正常組織を健常部皮膚組織として使用した。NO供給体は、Cayman Chemical Company販売のS-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP) と Diethylenetriamine dinitric oxide (DETA NONOate) を使用した。

##### 2) 線維芽細胞培養法

線維芽細胞の培養は、outgrowth法によって、20% fetal bovine serum (FBS, Flow Laboratories, USA) glutamine (0.6mg/ml), penicillin (100U/ml), streptomycin (50 $\mu$ g/ml) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, 日本製薬) を使用して、常法通り初代培養を行った。

組織片からの outgrowth を確認した後、初代培養を trypsinization (0.2% trypsin, 0.7mM ethylene diamine tetraacetic acid) し、25cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコ内で継代培養した。培養液は10% FBS 加 DMEM を使用し、3日毎に交換した。また、継代は分割比1:2で行った。実験には継代数3~5のものを使用した。

##### 3) <sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量および細胞数測定

<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量は、既報<sup>7)</sup>のごとく行った。3継代目の線維芽細胞は35 $\times$ 10mmディッシュで上記条件で培養、confluentに達したものを使用した。DETA NONOate濃度を0, 50, 250, 750, 3000 $\mu$ MになるようにDMEM (0.5% FBS 添加) 培地に添加した。48時間培養した後 [6-<sup>3</sup>H]-thymidine (Spect. act. 16.2 Ci/mmol; NEN chemicals) を1 $\mu$ Ci/mlとな



るように加え、さらに3時間培養した。その後mediumを除き冷却したphosphate-buffered saline (PBS pH7.4) で2回洗浄、さらに10%トリクロル酢酸(TCA)で2回処理した後、1N NaOHで溶解、一部を1N HClで中和させ、液体シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。細胞数測定はDETA NONOateおよびSNAP濃度を0, 2, 10, 50, 250, 1000 $\mu$ Mになるように添加し48時間後に測定した。

#### 4) コラーゲン蛋白合成能の測定

各濃度(0, 2, 10, 50, 250 $\mu$ M)のDETA NONOateを加え72時間培養した線維芽細胞の培地を、アスコルビン酸50 $\mu$ g/ml,  $\beta$ -アミノプロピオニトリル50 $\mu$ g/mlを含むDMEM(0.5% FBS添加)に置換し、L-[2, 3- $^3$ H]-proline 5  $\mu$ Ci/ml (Spect. act. 38.5Ci/mmol; NEN Chemicals)を加え、CO<sub>2</sub>incubator内(5% CO<sub>2</sub>, 95%空気, 37°C)で3時間培養した。培養終了後、各ディッシュに最終濃度0.5mM phenyl methyl sulfonyl fluonido (以下PMSF)を加え、培地および細胞を回収し、凍結、融解、超音波処理を行った。このサンプルにキャリアー蛋白としてbovine serum albumin (Sigma)を加え、最終濃度10%のTCAで蛋白沈澱を3回繰り返す、free  $^3$ H-prolineを除去後、得られた沈澱物を0.2M NaOHに溶解し、中和させた後、コラーゲナーゼファームIII (Advance Biofactures Corporation, Lynbrook, NY)で分解、再び5% TCA (0.25%タンニン酸加)で沈澱と上清を分離した。Peterkofsky & Diegelmannの方法<sup>9)</sup>で上清をコラーゲナーゼ感受性蛋白分画(CDP)、また沈澱を非コラーゲナーゼ感受性蛋白分画(NCP)としてシンチレーションカウンター(dpm)で測定した。得られた値を細胞数で割算し、各々をコラーゲン蛋白合成、非コラーゲン蛋白合成とし、Diegelmann & Peterkofskyの仮説による式<sup>9)</sup>すなわち

$$\frac{\text{CDP}}{\text{CDP} + 5.4 \times \text{NCP}} \times 100$$

によって全蛋白合成に対するコラーゲン合成の

比を算出し百分率で表した。

#### 5) コラーゲナーゼ活性の測定

コラーゲナーゼ活性の測定は、文献<sup>10), 11)</sup>に準じてsolution法<sup>12), 13)</sup>を用い、コラーゲノキットCLN-100(コラーゲン技術研究会, 東京)を使用した。3継代目の線維芽細胞を35 $\times$ 10mmディッシュで前記条件で培養、confluentに達したものをを使用した。各濃度(0, 2, 10, 50, 250, 1000 $\mu$ M)のSNAPを添加し48時間後に上清を回収した。キットのプロトコールにしたがい、培養上清に含まれるコラーゲナーゼをトリプシン処理し、FITC (fluorescein isothiocyanate)でラベルした水溶性コラーゲン基質と反応後、分解産物を抽出し、蛍光光度を蛍光分光光度計で測定した。1分間に1 $\mu$ gのコラーゲンを分解するコラーゲナーゼ活性を1単位(U)とした。

#### 6) mRNA量の測定

RNAの抽出は、3継代目の線維芽細胞を150 $\times$ 10mmディッシュで前記条件で培養、confluentに達したものに、ULTRASPEC-II RNA isolation system (BIOTECH, USA)を使用し、single-step法<sup>14)</sup>で行った。DETA NONOate(0, 2, 10, 50, 250 $\mu$ M)を添加し48時間培養した後、培地を除去し、PBSにて洗浄後、1ディッシュあたり500 $\mu$ lのdenaturing solutionを加えrubber policemanを使用して細胞を採取した。Eppendorf tube内で攪拌後、BIOTECH社プロトコールにしたがいtotal RNAを抽出した。RNAをDot Blot法<sup>10), 11)</sup>によってニトロセルロースフィルターに移し、bakeした後、prehybridization、さらに $^{32}$ PでラベルしたcDNA probeとhybridizationを行った。

probeの $^{32}$ P標識にはPrimer DNA Labeling Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan)を使用するrandom prime法で行った。cDNA probeにKlenow enzymeを用いて、 $^{32}$ Pでラベルしたanti-sense DNAを作成した。cDNA probeとして $\alpha_1$ (I)コラーゲンはplasmids Hf677<sup>15)</sup>の1.5kb insertを、 $\alpha_1$ (III)コラーゲンはplasmids p III-33<sup>16)</sup>の0.9kb insertを、コラーゲナーゼは

plasmids K4<sup>17)</sup>の0.7kb insert,  $\beta$ -アクチンは plasmids pHFA-1<sup>18)</sup>の0.5kb insert を用いた.

各 mRNA 定量は Bioimaging analyzer Fuji×BAS 2000 (Fuji, Japan) で解析した. mRNA の発現量は internal control として用いた  $\beta$ -アクチンを基準 (1) として補正した.

## 結 果

1) <sup>3</sup>H-チミジン取り込み量および細胞数測定  
細胞数測定は Figure 1 に示すごとく, DETA

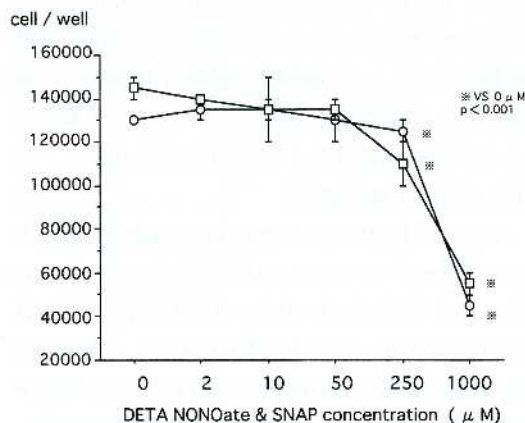


Fig. 1. Cell count of fibroblasts. Fibroblast were seeded in 35×10mm plastic dishes with DMEM containing SNAP or DETA NONOate. ○-○SNAP, □-□DETA NONOate

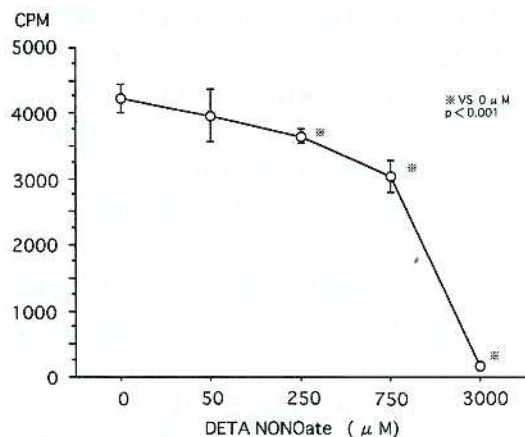


Fig. 2. Effect of DETA NONOate on <sup>3</sup>H-Thymidine uptake of fibroblasts. There was a significant difference between DETA NONOate 0μM and its 50-3000μM. (t-test : p<0.01 n=4)

-NONOate および SNAP 濃度250μM 以上では 著明に低下する傾向が認められた.

DETA NONOate 濃度50μM, 250μM, 750 μM, 3000μM での<sup>3</sup>H-チミジン取り込みは, 対照群に比して各々6%, 13%, 28%, 96%の減少を認めた (Fig. 2). この結果より, DETA-NONOate および SNAP 濃度250μM 以上では, NO 産生が細胞に対して障害性を有しており, 以

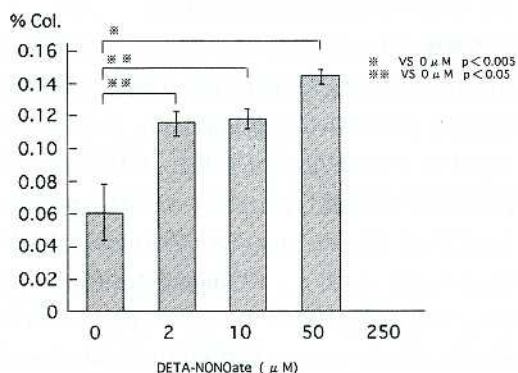


Fig. 3. Effect of DETA NONOate on collagen synthesis (%) of fibroblasts. There was a significant difference between DETA NONOate 0μM and its 2-50μM. (t-test : p<0.01 n=4)

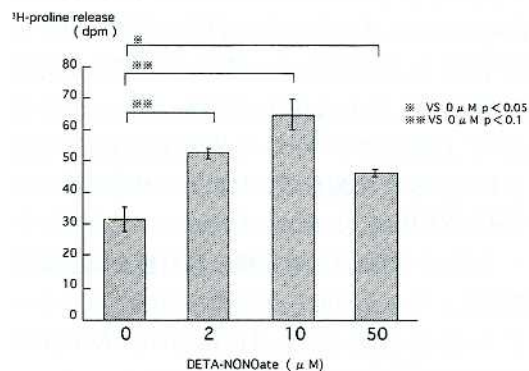


Fig. 4. Effect of DETA NONOate on endogenous protease activity (dpm) of fibroblasts. There was a significant difference between DETA NONOate 0μM and its 2-50μM. (t-test : < 0.05 n=4)



降の実験を250 $\mu$ M以下の濃度で行った。

## 2) コラーゲン蛋白合成能

DETA NONOate 添加における各濃度の CDP, NCP を計測し, コラーゲン合成能/全蛋白合成能 (CDP/CDP+NCP) をグラフで示した。DETA NONOate 2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M の濃度において0 $\mu$ M に比して各々1.9倍, 1.8倍, 2.3倍の増加を認めた (Fig. 3)。この結果は DETA NONOate 濃度50 $\mu$ M 以下の濃度において蛋白レベルでのコラーゲン合成能の亢進していることを示している。なお, DETA NONOate 250 $\mu$ M 以上ではプレートから細胞がはがれ浮遊していたため測定ができなかったが, 蛋白合成能を測定するため DETA NONOate 添加による培養を72時間行った結果と判断した。また, 対照として内因性コラーゲナーゼ活性を測定した際, この値が, DETA NONOate 2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M の濃度で0 $\mu$ M に比してそれぞれ1.6倍, 2倍, 1.5倍の増加を認めた (Fig. 4)。このことは, 線維芽細胞自身の産生するコラーゲナーゼを含むプロテアーゼの活性の上昇であり以下の実験を行った。

## 3) コラーゲナーゼ活性

測定した蛍光吸収度よりコラーゲナーゼ活性を算出し, 1分間に1 $\mu$ gの基質を分解するコラーゲナーゼ活性を1単位としてグラフに示した。

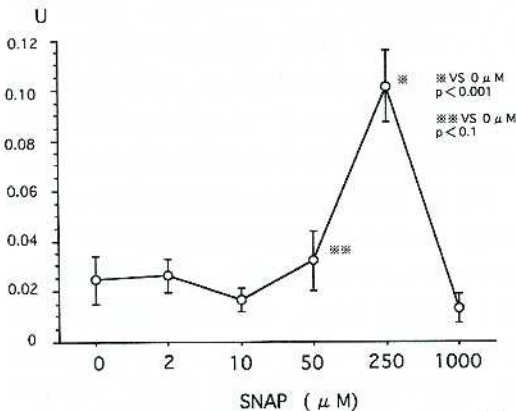


Fig. 5. Effect of SNAP on collagenase activity (U) of fibroblasts. There was a significant difference between SNAP concentration 0 $\mu$ M and its 50 and 250 $\mu$ M. (t-test:  $p < 0.01$   $n = 4$ )

SNAP 濃度2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 1000 $\mu$ Mでのコラーゲナーゼ活性は対称群に比して

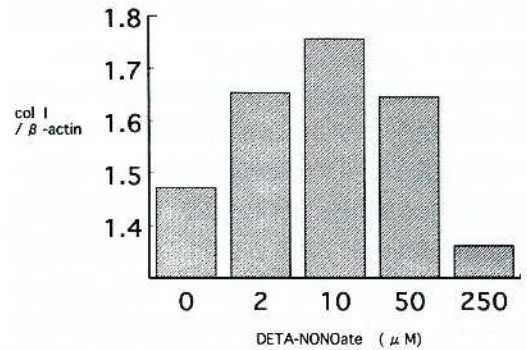


Fig. 6a. Densitometric analysis of type I collagen expression under DETA NONOate stimulation. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity  $\beta$ -actin mRNA.

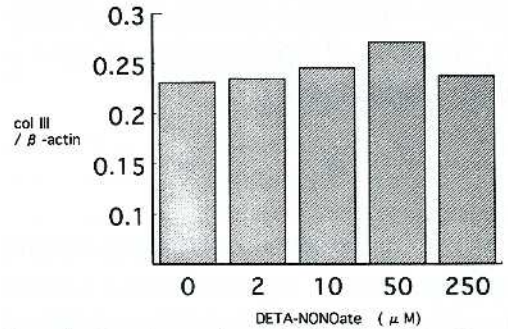


Fig. 6b. Densitometric analysis of type III collagen expression under DETA NONOate stimulation. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity  $\beta$ -actin mRNA.

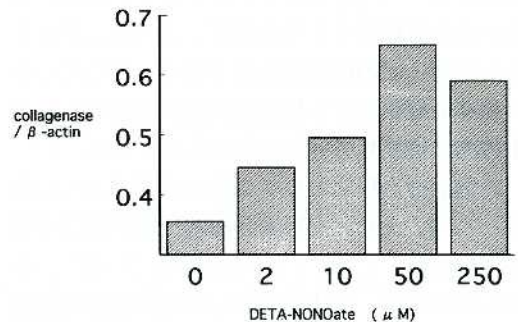


Fig. 6c. Densitometric analysis of collagenase expression under DETA NONOate stimulation. The quantity of each mRNA level was normalized for the quantity  $\beta$ -actin mRNA.

各々約1.07倍, 0.68倍, 1.31倍, 4.11倍, 0.54倍となり $50\mu\text{M}$ から活性の亢進を認めた。(Fig. 5)これによりコラゲナーゼ活性の亢進が確認された。

4)  $\alpha_1$ (I) コラーゲン,  $\alpha_1$ (III) コラーゲン, コラゲナーゼ,  $\beta$ -アクチンの mRNA レベル

各 mRNA レベルは imaging analyzer を用いて定量的に解析した。各 mRNA の発現量は internal control である  $\beta$ -アクチンの発現量を 1 として補正し, グラフで示している (Fig. 6 a, b, c)。 $\alpha_1$ (I) コラーゲンは $10\mu\text{M}$ 以下で発現の亢進,  $\alpha_1$ (III) コラーゲンは明らかな差を認めず, コラゲナーゼは $50\mu\text{M}$ 以下で発現の亢進を認めた。

以上の結果より, 低濃度の DETA NONOate や SNAP による NO 刺激によって, コラーゲン, コラゲナーゼの転写からの発現の亢進が観察され, またコラーゲン合成能の増加, コラゲナーゼ活性の増加が観察された。

## 考 察

NO は, 主に誘導性および非誘導性の 2 種の合成酵素により, L-arginine を基質として細胞内で産生される。産生された NO の半減期は短い (約 5~10 秒) が, 細胞膜透過性が高く容易に細胞間・細胞内を拡散, 移動し, かつ高い反応性を有する。NO の主な生化学的作用は, グアニル酸シクラーゼの活性化であるが, それ以外にもスーパーオキシドアニオンとの反応, あるいは金属錯体としての機能, さらにシクロオキシゲナーゼの活性化などである。そしてこれら種々の経路を介し細胞間刺激伝達物質として生体内で機能していると考えられている。

創傷治癒過程において NO が産生されていること<sup>19), 20)</sup>, また真皮線維芽細胞自体が NO 合成酵素を発現していることが報告されている<sup>21)</sup>。これらのことは, 生体内において真皮線維芽細胞が創傷治癒過程で NO と接触する機会が少なからずあることが示唆し, NO の真皮線維芽細胞の機能への関与が考えられる。事実, NO の産生

が, コラーゲンの蓄積に正の相関を示し, 機能的強度 (mechanical strength) の獲得への関与が報告されている<sup>22), 23)</sup>。また Schaffer ら<sup>6)</sup>は, マウスの創傷モデルに NO 合成阻害剤を経口的に投与したところ創の緊張度の低下およびコラーゲン蓄積量の低下を認めたと報告している。このことは NO が創傷治癒に効果的に作用する可能性を示唆していると思われる。しかし, NO の真皮線維芽細胞の機能に対する作用を詳細に検討した報告はなく, 本研究で, 真皮線維芽細胞のコラーゲン代謝に対する NO の影響を検討した。

今回の結果より, NO 刺激により真皮線維芽細胞のコラーゲン合成が増加, またコラゲナーゼ活性も同時に増加することを確認した。創傷治癒過程において線維芽細胞は, 浸潤, 増殖し結合組織成分の合成を行い, また損傷を受けた組織を分解する酵素を産生し, 細胞外マトリックスの再構築に中心的な役割をになっている<sup>24)</sup>と言われている。また荒川ら<sup>25)</sup>の報告では, 線維芽細胞のコラーゲン発現, コラゲナーゼの発現および活性を比較検討し細胞外マトリックス成分の合成と分解のバランスが, 創傷治癒における線維化の要因であると述べている。今回の結果より NO 刺激で線維芽細胞のコラーゲン合成の増加, コラゲナーゼ活性の増加を認めたことより, 線維芽細胞のコラーゲン合成, 分解のバランスに NO が, 関与する可能性が示された。すなわち創傷治癒過程で NO が, 線維芽細胞を刺激し線維芽細胞のコラーゲン代謝を調節し創傷治癒に効果的に作用する可能性が考えられた。

NO は, 細胞外ではその半減期が短く, 拡散, 移動しているため, 実際に創傷局所における NO 分子そのものの発生, 濃度, 分布を直接測定することは困難である。そのため細胞間における NO の濃度は不明である。しかし, 創傷局所では, 集結する血管内皮細胞, 好中球, マクロファージ, また線維芽細胞自体によって NO が産生され, 創傷局所において線維芽細胞は, 創傷で産生された NO に刺激されていると考えられるが, 創傷局所で線維芽細胞に NO が, いかな



る反応を介して作用するかは不明である。

今回 mRNA レベルにてコラーゲンおよびコラゲナーゼの発現の増加が確認できたことより、線維芽細胞の遺伝子の転写レベルにおいて NO が作用する可能性が考えられた。Pilz ら<sup>26)</sup>は、NO によるグアニル酸シクラーゼを活性化し cGMP を増加させる経路を介して遺伝子調節蛋白である AP-1 が増加し、制御遺伝子 TRE が活性化すると報告しており、NO が遺伝子の転写段階に作用する可能性を示している。一方、Angel ら<sup>27)</sup>は、コラゲナーゼの発現は、コラゲナーゼ遺伝子のプロモーター部の制御遺伝子 TRE に AP-1 が結合することによってコラゲナーゼの転写、制御発現が行われると報告している。コラゲナーゼの増加は、NO が cGMP を増加させることによって AP-1 を増加させ、線維芽細胞のコラゲナーゼの転写段階に作用している可能性が考えられる。しかし、AP-1 を介する経路ではコラーゲン発現の増加は、推論できない。NO の他の反応系もしくは他の因子を介した反応系によるものと思われる。今後、線維芽細胞におけるコラーゲン代謝に対する NO の作用機序、反応系の解明を検討する必要があると考える。

## おわりに

NO 刺激における培養線維芽細胞に対するコラーゲン代謝への影響について検討した。NO は、線維芽細胞に作用し、コラーゲン合成を亢進、コラゲナーゼを含むプロテアーゼの産生を亢進させ、コラーゲンの蓄積、分解のバランスを調節し、正常な治癒機転へと向かわせる調節因子として働いている可能性があると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学形成外科学教室 森口隆彦教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に御指導、御鞭撻をいただきました川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授に深謝申し上げるとともに、直接御指導いただきました同皮膚科学教室 小野雅史講師に感謝いたします。また研究にご協力いただきました皮膚科学教室員の皆様に深く感謝いたします。また形成外科学教室各位、培養センター、RI センターの皆様方に厚くお礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第 6 回日本形成外科学会基礎学術集会において発表した。

## 文 献

- 1) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987
- 2) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980
- 3) 井上信孝, 横山光宏: 血管機能制御物質としての NO. *医学のあゆみ* 182: 355-359, 1997
- 4) 大柳義彦: NO ラジカルの医学. 東京, 羊土社. 1996, pp59-70
- 5) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imuno nitrogen oxidation. *Science* 235: 473-476, 1987
- 6) Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, Wasserkrug HL, Barbul A: Nitric oxide regulates wound healing. *Surg Res* 63: 237-240, 1996
- 7) 武田孝爾: Werner 症候群由来培養線維芽細胞における結合組織合成能および DNA 合成能の検討. *日皮会誌* 97: 143-150, 1987
- 8) Peterkofsky B, Diegelmann R: Use of a mixture of protease-free collagenase for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry* 10: 988-994, 1971
- 9) Diegelmann R, Peterkofsky B: Collagen biosynthesis during connective tissue development in chick embryo. *Dev Biol* 28: 443-453, 1972

- 10) Takeda K, Hatamochi A, Ueki H, Nakamura M, Oishi Y : Decreased collagenase expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts. *J Invest Dermatol* 103 : 359-363, 1994
- 11) Hatamochi A, Wada T, Takeda K, Ueki H, Kawano S, Terada K, Morita T : Collagen metabolism in cutis laxa fibroblasts : increased collagenase gene expression associated with unaltered expression of type I and type III collagenase. *J Invest Dermatol* 97 : 483-487, 1991
- 12) Terato K, Nagai Y, Kawanishi K, Yamamoto S : A rapid assay method of collagenase activity using <sup>14</sup>C-labeled soluble collagen as substrate. *Biochim Biophys Acta* 445 : 753-762, 1976
- 13) Ohsawa S, Hori H, Hata R, Nagai Y : Stimulation of the collagen metabolism of articular chondrocytes in culture by a factor derived from polymorphonuclear leukocytes. *Biomed Res* 5 : 177-186, 1984
- 14) Chomczynski P, Sacchi N : Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 : 156-159, 1987
- 15) Chu ML, Myers JC, Bernard MP, Ding JF, Ramirez F : Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro  $\alpha_1(I)$  collagen chain. *Nucleic Acids Res* 10 : 5295-5934, 1982
- 16) Miskulin M, Dalgleish R, Kluge-Beckerman B, Rennard SI, Tolstshev P, Brantly M, Crystal RG : Human type III collagen gene expression is coordinately modulated with the type I collagen genes during fibroblast growth. *Biochemistry* 25 : 1408-1413, 1986
- 17) Angel P, Poting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P : Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6 : 1760-1766, 1986
- 18) Gunning P, Ponte P, Okayama H, Engel J, Blau H, Kedes L : Isolation and characterization of full-length cDNA clones for human  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -actin mRNAs : Skeletal but not cytoplasmic actins have an aminoterminal cystein that is subsequently removed. *Mol Cell Biol* 37 : 877-95, 1983
- 19) Albina JE, Mills CD, Henry WL, Caldwell MD : Temporal expression of different pathways of arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 44 : 3877-3880, 1990
- 20) Kirk SJ, Regan MC, Palmer RMJ, Moncada S, Wasserkrug HL, Barbul A : The role of nitric oxide in wound collagen deposition. *Surg Forum* 44 : 706-708, 1993
- 21) Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scotto PG, Tredget EE : Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol* 106 : 419-427, 1996
- 22) Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS, Barbul A : Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* 158 : 2375-2381, 1997
- 23) Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Adrendt GM, Thornton FJ, Barbul A : Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis : a possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 121 : 513-519, 1997
- 24) Postlethwaite AE, Kang AH : Fibroblast in Inflammation. *Basic Principles and Clinical Correlates*, ed by JI Gallig, IM Goldstein, and R Snydermann. New York, Raven Press. 1988, pp577-597
- 25) Arakawa M, Hatamochi A, Mori Y, Mori K, Ueki H, Moriguchi T : Reduced collagenase gene expression in fibroblast from hypertrophic scar tissue. *Br J Dermatol* 134 : 863-868, 1996
- 26) Pilz BR, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR : Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *FASEB* 9 : 552-558, 1995
- 27) Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P : 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 7 : 2256-2266, 1987