

## · 综述 ·

# 皮肤损伤愈合中 NOS 的表达及 NO 的作用

官大威, 赵锐, 杜宇 (中国医科大学法医学院法医病理学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 皮肤损伤愈合是机体保持组织完整性的一个有组织的过程, 需要炎症细胞、生物化学介质之间的复杂作用。一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)是皮肤组织损伤愈合过程中的一个重要因子, 合成一氧化氮(nitric oxide), 生成的一氧化氮参与损伤愈合的全过程, 在炎症介导, 细胞的增殖、分化和凋亡及血管形成、基质沉积和损伤后组织重构中均发挥重要作用, 而且在某些皮肤疾病中, NO 也具有重要作用。本文针对近年来 NOS 在损伤愈合过程中的研究进展, 综述了在皮肤损伤愈合过程中 NOS 的表达和 NO 的作用, 认为 NOS 是皮肤损伤愈合机制的一个重要方面, 具有深入研究的必要。

[关键词] 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 皮肤; 损伤愈合

[中图分类号] DF795.1 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5619(2004)04-0244-03

### Expressions of NOS Isoforms and Roles of NO during Skin Wound Healing

GUAN Da-wei, ZHAO Rui, DU Yu (School of Forensic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] Skin wound healing is an organized process for keeping cutaneous integrity, which needs the complicated interaction between inflammatory cells and biochemical mediators. Nitric oxide synthase (NOS) isoforms, as important factors during skin wound healing, synthesize nitric oxide (NO) which may be involved in the whole event of skin wound healing and play important roles in cell proliferation, differentiation and apoptosis, angiogenesis, matrix deposits and remodeling. Furthermore, NO also exerts effects in some cutaneous diseases. In the present paper, the expressions of NOS isoforms and the roles of NO during skin wound healing were reviewed with references to the advances in the studies on skin wound healing. It is suggested that nitric oxide synthases, play significant parts during skin wound healing, which is worthy of further investigation.

[key words] nitric oxide synthase; nitric oxide; skin; wound healing

皮肤损伤愈合是机体保持其组织完整性而产生的一个有组织的过程, 大致可分为三期: 炎症期、增生期和重建期。炎症和炎症反应的过程中, 可清除损伤的皮肤组织和入侵的病原体, 重建损伤组织的一系列过程, 需要炎症细胞与生物化学介质(包括生长因子、细胞外基质分子和细胞微环境)之间的复杂的作用<sup>[1]</sup>。

一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)有三种亚型, 由不同染色体上的不同基因编码, 分为结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS)和诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS), 前者又分为神经型 NOS (neuronal NOS, nNOS) 和内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS)。NOS 是由两个相同亚基组成的二聚体, NOS 基因的翻译产物均为无活性的单体。cNOS 单体生成后与 Ca<sup>2+</sup>或钙调蛋白(calmodulin, CaM)复合体结合, 再与血红素、四氢生物喋呤结合, 形成二聚体, 而 iNOS 是以单体形式在无 Ca<sup>2+</sup>的条件下与 CaM 复合体结合形成二聚体而发挥其生物学功能。NOS 可以分解 L-精氨酸生成一氧化氮(nitric oxide, NO)和 L-瓜氨酸, 生成的 NO 是一种弥散性的细胞内信号分子, 具有广泛的生物学作用, 包括血管舒张、抗微生物、抗肿瘤活性、免疫调节和神经递质功能。

## 1 NOS 的分布和 NO 的作用

eNOS产生的 NO 是少量而短暂的, 经常作为时限性细胞内信号分子而发挥血管舒张、神经递质等功能<sup>[2]</sup>。nNOS 可在角朊细胞(keratinocyte)和黑色素细胞中表达, 在紫外线诱导的黑色素细胞有 nNOS 表达, 其分泌形式是以旁分泌方式参与黑色素形成<sup>[3]</sup>。eNOS 仅局限于血管内皮细胞中, 但有报道称人类成纤维细胞中也表达 eNOS, 两者产生的 NO 均对皮下血流量有调节作用<sup>[4]</sup>。正常皮肤组织中 iNOS 很少在血管壁内表达, 而在表皮中表达<sup>[4]</sup>, 这是因为正常组织中 iNOS 活性被抑制, 但在炎症和免疫反应及老化过程中其被激活, iNOS 的表达特别易受炎性和免疫因子刺激而激活, 如细菌内毒素和炎症细胞因子前体等<sup>[5]</sup>, 一旦被激活可持续性表达, 并产生大量的 NO 参与皮下免疫反应的早期炎症过程。NO 在正常条件下即参与皮肤的许多反应, 调节血管扩张和黑色素形成, 对环境的刺激产生保护性作用。

在皮肤的损伤愈合过程中, NOS 亚型发挥中心作用, 在 iNOS<sup>[6]</sup>和 eNOS<sup>[6]</sup>基因敲除的鼠中损伤愈合过程明显延长。研究表明在皮肤的损伤愈合过程的早期可有大量 NOS 的表达, 活性明显增高, 伤后 10d 持续性产生, 而其中大部分为 iNOS, 伤后 14~35d NOS 活性基本趋于缓和<sup>[7]</sup>。

## 2 炎症期 NOS 的表达和 NO 的作用

损伤愈合初期是以血小板、红细胞, 继之为多型核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞的浸润为特征。损伤早期巨噬细胞产生的 iNOS 在 24h 内达高峰<sup>[7]</sup>, 表明该酶在炎症的早期有

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271347); 教育部留学归国基金资助项目(教外留司[2000]367号)

[作者简介] 官大威(1963-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事皮肤损伤愈合机制及钝力性心脏外伤研究, (电话)024-23256666-5483, (传真)024-23267698-4, (电子邮箱)dwguan@mail.cmu.edu.cn。

明显的活性,伤后 1d 大部分巨噬细胞呈 iNOS 阳性,中性粒细胞中也有 iNOS 表达<sup>[7]</sup>,而成纤维细胞中产生的低水平 eNOS 在调节愈合创口血流量方面有重要作用,直接影响损伤愈合的过程。在炎症早期损伤因子刺激中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞表达 iNOS,而产生的 NO 又可以抑制浸润细胞释放细胞因子并减少 NOS 的表达。而且,因早期 iNOS 高水平表达,所产生的 NO 可以和中性粒细胞及巨噬细胞产生的氧自由基反应而减轻组织损伤。实际上由 NOS 分泌的 NO 在损伤愈合的炎症期有许多重要作用,如血管舒张、抗微生物活性、抗血小板活性及诱导血管通透性增加等。NO 可以调节作为炎症期开始标志的化学趋动因子 (TGF- $\beta$ 1<sup>[8]</sup>和 IL-8<sup>[9]</sup>)的产生和激活。另外,NO 可能直接吸引中性粒细胞和单核细胞到损伤区并刺激其产生对损伤愈合有作用的 TNF 和 IL-1,表明 NO 本身就是吸引单核细胞的化学趋动因子<sup>[8]</sup>。而在炎症期末,NO 介导潜伏状态的 TGF- $\beta$ 1 的产生,可以通过不同的机制下调巨噬细胞的 iNOS 表达,其机制包括 iNOSmRNA 稳定性下降,iNOSmRNA 翻译水平的下降和 iNOS 蛋白降解的增加,使随后 iNOS 表达受到抑制,并减少化学趋动因子的产生。另外,NO 还调节 IL-1 的表达和生物活性<sup>[10]</sup>,参与炎症期向增生期的过渡。

### 3 NOS 的表达和 NO 对细胞增殖、分化、凋亡的作用

NOS 对参与损伤愈合过程中不同细胞的增殖、分化、凋亡起不同的作用。低水平 NO 在体外增加角肌细胞的增殖,而高剂量的 NO 则抑制其增生<sup>[11]</sup>。给予 NOS 抑制剂 L-NIL[L-N<sub>ω</sub>-(1-iminoethyl) lysine]后,大鼠损伤区皮肤的上皮化进程明显延迟并伴有边缘本已过度增生的上皮的萎缩<sup>[11]</sup>。而且,iNOS 抑制剂 L-NIL 可以减少创伤边缘角肌细胞的增殖<sup>[12]</sup>。NOS 合成的 NO 在损伤愈合中还影响成纤维细胞的增殖和分化。NO 供体可以剂量依赖性方式降低正常大鼠皮肤中成纤维细胞增殖,也有称 NO 供体可以增加正常小鼠皮肤中成纤维细胞的增殖。在疤痕疙瘩中 NO 可以抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,产生其特殊的病理性改变<sup>[12]</sup>。NO 还可刺激内皮细胞的增殖,保护细胞免于凋亡,并可介导 VEGF 的产生,在动脉损伤模型中 NO 供体促进损伤动脉内膜的内皮化。因此,内皮细胞中的 NO 可能参与了损伤愈合中血管的形成。

NOS 还参与角肌细胞的凋亡,在紫外线照射的角肌细胞中加入 NOS 拮抗剂可增加其凋亡数量,说明 NOS 在抑制角肌细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。另外,NOS 产生的 NO 可以干扰 caspase 活性而产生抗凋亡的作用<sup>[12]</sup>。

细胞的增生和凋亡过程还可能与某些细胞因子有关,如 EGF、TGF- $\beta$ 1、IL-8 等。EGF 可预示创伤增生期的开始;TGF- $\beta$ 1 调节角肌细胞中的大量基因,并抑制其增生,也可以抑制 EGF 与角肌细胞的结合;IL-8 可以介导角肌细胞的增殖。而这些细胞因子的合成和分泌均与 NOS 产生的 NO 有关。

### 4 血管形成中 NOS 的表达和 NO 的作用

血管形成就是新血管形成的过程,是损伤修复的一个重要过程。NOS 产生的 NO 刺激内皮细胞的增殖、迁移、蛋白酶的释放以及血管通透性的增加。在缺血的啮齿类动物

中,NO 可以促进血管形成。在人类腿部静脉溃疡的组织中,大量新血管形成的部位均有 eNOS 活性的增强,说明 eNOS 水平的上调可以促进血管的形成<sup>[4]</sup>。而且 eNOS 抑制剂可以抑制胃溃疡愈合过程中肉芽组织内的血管形成<sup>[14]</sup>。另外有报道称,用 NOS 抑制剂 L-NAME (N-nitric-L-arginine-methyl ester) 处置的大鼠皮肤切创,可见小血管的形成增加,说明 NOS 在血管形成中有双重作用<sup>[15]</sup>。

另外,血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是损伤愈合中在最有效的血管形成因子,VEGF 参与 NO 的调节。VEGF 通过增加 eNOS 的表达而增加 NO 的产生,而 VEGF 的血管形成作用是 NOS 依赖性的<sup>[16]</sup>。iNOS 和 eNOS 对调节 VEGF 的内皮迁移、减少细胞粘连等功能均有重要作用。NO 还通过刺激角肌细胞的增生而增加 VEGF 的表达。用 NOS 抑制剂在体外或体内可阻断这一功能<sup>[11]</sup>。而在非 VEGF 依赖性机制介导的血管形成过程中,也存在 NOS 的参与。单核细胞介导的血管形成是 NOS 依赖性的<sup>[17]</sup>。P 物质增加可以促进体内血管形成和体外内皮细胞增生和迁移,而 P 物质增加的过程离不开 NOS 产生的 NO 的介导<sup>[17]</sup>。这些研究均表明 NOS 在调节血管形成中有很重要的作用。

### 5 NOS 在基质沉积和损伤后组织重构中的表达和 NO 的作用

损伤愈合的最后一个阶段需要有胶原的合成和沉积。人类成纤维细胞中表达的 eNOS 和 iNOS 在皮肤创伤后损伤晚期的胶原增生和组织重构中发挥重要作用<sup>[15]</sup>。大多数研究表明通过刺激 iNOS 的表达均有利于创伤中胶原含量的增加。NOS 抑制剂在实验性烧伤的组织中可以抑制胶原的生成<sup>[18]</sup>。NOS 抑制剂可降低创伤源性的成纤维细胞的胶原合成功能<sup>[15]</sup>。在正常愈合的皮肤组织中,愈合晚期巨噬细胞、角肌细胞和成纤维细胞主要表达 eNOS 和精氨酸酶。因此在损伤晚期 NOS 和 NOSmRNA 使创口微环境保持一种低水平的 NO 浓度而有利于胶原的形成。在肉芽组织中所有的细胞均表达 iNOS,中性粒细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞均有 iNOS 的大量表达,而肉芽组织中的内皮细胞和皮肤表皮层、皮下血管有 eNOS 的表达,但损伤愈合晚期形成的创口液成分(如:TGF- $\beta$ 1)对 NOS 的活性有很强的抑制作用,使创伤愈合的晚期 NOS 处于较低的表达水平从而促进胶原合成<sup>[19]</sup>。大量的研究充分说明了愈合创口中 iNOS 的持续性不同水平的表达对胶原的堆积和增加创口张力均有重要的作用。

另外研究表明 NOS 产生的过量 NO 对胶原合成有抑制作用,在损伤愈合的晚期 NOS 活性下降而精氨酸酶活性增强,这种变化对胶原的形成有重要作用。低水平表达的 NOS 产生少量的 NO,从而使精氨酸酶获得足量的 L-精氨酸底物,分解成羟脯氨酸而增加胶原合成<sup>[19]</sup>。但这一过程是 NOS 依赖性的,在 NOS 完全被抑制而精氨酸酶活性很高的损伤微环境中,发现胶原合成的减少,因此,精氨酸酶在分解 L-精氨酸合成羟脯氨酸并进一步形成胶原的过程中需要 NOS 的辅助作用<sup>[17]</sup>。

### 6 异常愈合中 NOS 的表达和 NO 的作用

NOS 合成 NO 的减少与皮肤创伤后的异常愈合相关。

蛋白营养不良、糖尿病等导致 NOS 合成的下降而使创口中  $\text{NO}_2^-$  和  $\text{NO}_3^-$  (NO 的稳定终产物) 水平降低, 减少胶原纤维的形成, 并降低愈合组织的创口张力<sup>[20]</sup>。而胰岛素可以刺激 NOS 产生 NO, 增加创口张力并促进胶原合成<sup>[21]</sup>。增生的瘢痕组织中成纤维细胞中 eNOS 的表达量比正常皮肤成纤维细胞少, 同时疤痕疙瘩成纤维细胞中的 iNOS mRNA 和其蛋白表达量也比正常皮肤和增生性瘢痕的成纤维细胞低<sup>[12]</sup>。尽管在病理性瘢痕中增生的成纤维细胞表达较少的 NOS 使愈合早期对 TGF- $\beta$ 1 的抑制作用减少而导致内皮细胞的增生, 但病理性瘢痕的基底细胞表达大量的 NOS 活性并产生过量的 NO, 这种过量的 NO 可以刺激临近皮肤下层产生胶原而导致过量的胶原沉积<sup>[13]</sup>。这些均可导致过量的胶原沉积而形成皮肤的非正常愈合。

在皮肤创伤愈合中, NOS 表达均有一定的时间和剂量规律性, 当此规律受损时就会导致皮肤损伤的愈合异常。在某些皮肤疾病可见 NOS 的表达增加。银屑病斑块中有 iNOS 的过表达<sup>[22]</sup>。人类慢性静脉溃疡的基底部位有 iNOS 和 eNOS 的过表达<sup>[4]</sup>。糖尿病足部溃疡中有 iNOS 和 eNOS 蛋白和酶活性表达的上调<sup>[21]</sup>。

总之, NOS 作为皮肤损伤愈合中合成 NO 的关键酶, 在皮肤损伤愈合的炎症期 NOS 可诱导炎症的发生, 之后又反馈性抑制炎症的继续发展; 在细胞增生期 NOS 与细胞的浸润、增殖、分化及凋亡有关; 而 NOS 分泌的 NO 在血管形成方面有双重作用; 在愈合晚期 NOS 低水平表达和精氨酸酶活性增高, 对胶原沉积和组织重构发挥重要的作用。另外, NOS 的表达异常在某些皮肤疾病的病理性损害上也发挥重要作用。因此研究 NOS 在皮肤中的分布及 NO 在皮肤中的生理和病理学功能, 对阐明皮肤的病理生理学、皮肤损伤愈合机制及诊断和治疗皮肤疾病均将具有重要的理论意义和实用价值。

#### 参考文献:

- [1] Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, *et al.* Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer [J]. *J Clin Invest*, 1998, 110: 967-971.
- [2] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals[J]. *Biochem*, 1994, 298: 249-258.
- [3] Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, *et al.* Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 635-642.
- [4] Abd-EI-Aleem SA, Ferguson MWJ, Appleton I, *et al.* Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers[J]. *J Pathol*, 2000, 191: 434-442.
- [5] Kolb H, Kolb-Bachofen V. NO in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator[J]. *Immunol Today*, 1998, 19(12): 556-561.
- [6] Efron DT, Thornton FJ, Steulten C, *et al.* Expression and function of inducible nitric oxide synthases during rat colon anastomotic healing [J]. *J Gastrointest Surg*, 1999, 3(6): 592-601.
- [7] Lee RH, Efron D, Tantry U, *et al.* Nitric oxide in the

healing wound: A time-course Study[J]. *J Surg Res*, 2001, 110: 104-108.

- [8] Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, *et al.* Transforming growth factor type- $\beta$ 1 induces monocyte chemotaxis and growth factor production[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5788.
- [9] Villarete LH, Remick DG. Nitric oxide regulation and IL-8 expression in human endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211(2): 671-676.
- [10] Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain B, *et al.* Nitric oxide upregulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages[J]. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 947-951.
- [11] Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, *et al.* The function of nitric oxide in wound repair: inhibitor of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization [J]. *J Invest Dermal*, 1999, 113 (6): 1090-1098.
- [12] Cobbold CA. The role of nitric oxide in the formation of keloid and hypertrophic lesions[J]. *Med Hypotheses*, 2001, 57(4): 497-502.
- [13] Dimmeler S, Haendeler J, Nehlis M, *et al.* Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibitor of interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like protease[J]. *J Expression Med*, 1997, 185: 601-607.
- [14] Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279: G341-G346.
- [15] Shukla A, Rasik AM, Shankar R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis[J]. *Mol Cell Biochem*, 1999, 200: 27-33.
- [16] Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, *et al.* Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity[J]. *Nat Med*, 1997, 3: 879-886.
- [17] Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, *et al.* Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginase/NOS dependent effector mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 4190-4194.
- [18] Akcay MN, Ozcan O, Gundogdu C, *et al.* Effect of nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced burn wounds[J]. *J Trauma*, 2000, 49 (2): 327-330.
- [19] Pollock JS, Webb W, Callaway D, *et al.* Nitric oxide synthase isoform expression in a porcine model of granulation tissue formation[J]. *Surg*, 2001, 129: 341-350.
- [20] Bulgrin JP, Shabani M, Chakravarth Y. Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds[J]. *Wounds*, 1995, 7: 48-57.
- [21] Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, *et al.* Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlating [J]. *Surgery*, 1997, 121: 513-519.
- [22] Weller R, Ormerod A. Increased expression of inducible nitric oxide (NO) synthase[J]. *Br J Dermatol*, 1997, 136: 136-137.

(收稿日期: 2003-07-07)

(本文编辑: 刘宁国)