

대식세포주에서 인슐린이 I κ B/NF- κ B 경로 활성화에 미치는 영향

¹서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소, ²분당서울대학교병원 폐센터, 내과

이상민¹, 장연실¹, 이춘택², 김영환¹, 한성규¹, 심영수¹, 유철규¹

Role of Insulin in the Activation of NF- κ B/I κ B Pathway in Macrophage Cells

Sang-Min Lee, M.D.¹, Yeon Sil Jang¹, Choon-Taek Lee, M.D.², Young Whan Kim, M.D.¹, Sung Koo Han, M.D.¹, Young-Soo Shim, M.D.¹, Chul-Gyu Yoo, M.D.¹

¹Department of Internal Medicine and Lung Institute of Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, ²Respiratory Center, Department of Internal Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Background: Sepsis still has a high mortality rate despite adequate supportive care. Newer therapeutic modalities have been developed but they have generally ended in failure. Recently, insulin was reported to have an anti-inflammatory effect by inhibiting the I κ B/NF- κ B pathway, and may have therapeutic potential in sepsis. However, the precise mechanism of the anti-inflammatory effect of insulin is unclear. This study examined the role of insulin in activating I κ B/NF- κ B in macrophage.

Methods: Raw 264.7 cells, a murine macrophage cell line, were used in this experiment. Western blotting using I κ B Ab and phosphor-specific I κ B Ab was performed to evaluate the degradation and phosphorylation of I κ B cells. For the I κ B Kinase (IKK) activity, an immune complex kinase assay was performed. The level of interleukin-6 (IL-6) was measured by ELISA to determine the level of proinflammatory cytokine.

Results: I κ B α degradation began 30 min after lipopolysaccharide (LPS) treatment. However, an insulin pretreatment suppressed the I κ B α degradation caused by the LPS treatment. The phosphorylation of I κ B α and IKK activity was also inhibited by the insulin pretreatment. Finally, the insulin pretreatment showed a tendency to suppress the induction of IL-6 by LPS.

Conclusion: Insulin might have an anti-inflammatory effect though partial inhibition of the I κ B/NF κ B pathway in macrophage cell lines.

Key Words: Insulin; Sepsis; Inflammation; NF κ B

서론

패혈증은 중환자 사망원인의 1위를 달리고 있는 질환으로 미국 통계에 의하면 매년 750,000명 이상의 환자가 발

생하며 그 중 210,000명 이상이 사망하고 있다¹. 최근 대중 요법이 발달하고 있지만 패혈증의 이환율과 사망률은 감소 추세를 보이지 못하고 있는 실정으로, 보다 근본적인 치료법의 개발이 시급해진 상황이다.

그 동안 많은 연구자들은 패혈증이 세균 내독소와 같은 외부 물질에 의해 유발된 염증 반응이 각종 사이토카인의 연쇄반응에 의하여 증폭됨으로써 진행된다는 사실을 발견하고, 이러한 염증 반응의 악순환의 고리를 끊는 치료법 개발에 몰두하게 되었다. 이에 염증 반응을 차단하기 위하여 steroid², antiendotoxin antibody³, tumor necrosis factor (TNF) antagonists⁴, interleukin-1-receptor antagonist⁵ 등 여러 약제에 대한 임상 시험이 진행되었지만, 안

This work was supported by a grant (02-2004-001) from the Seoul National University Bundang Hospital Research Fund.
Address for correspondence: Chul-Gyu Yoo, M.D., Ph.D.
Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital, 101, Daehang-no, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Phone: 82-2-2072-3760, Fax: 82-2-762-9662
E-mail: cgyoo@snu.ac.kr

Received: Feb. 6, 2009

Accepted: Feb. 12, 2010

타갑게도 그 효과가 입증된 약제는 거의 없는 상황이고, 오히려 사망률을 증가시킨다는 결과도 보고되고 있는 실정이다.

최근 Van den Berghe 등⁶은 중환자실에서 적극적인 인슐린 치료를 통하여 혈당을 80~110 mg/dL로 철저히 조절한 경우 180~200 mg/dL로 유지된 군에 비하여 패혈증 발생률이 46%나 감소하였으며 패혈증 환자에서의 다중장기부전에 의한 사망률도 32% 감소함을 보고하였다. 또한 적극적인 인슐린 치료를 함으로써 중환자실 재원 기간을 줄이고, 수혈 횟수를 감소시켰으며, 신부전증이나 황달 등과 같은 여러 장기의 기능 부전을 줄일 수 있음을 보여주어 패혈증 치료에 있어 새로운 가능성을 제시하게 되었다.

패혈증 환자에서 인슐린 치료를 하였을 때 사망률을 줄이는 기전에 대해서는 아직 자세히 밝혀진 바가 없다. 그 동안의 연구 결과를 보면, 당뇨가 없더라도 혈당이 높은 환자들은 중환자실로 입원하는 경우가 많고 사망률도 증가하는 것으로 알려져 고혈당이 사망률을 증가시키는 위험 인자로 보고되고 있다⁷. 또한 인슐린 농도가 높게 유지되는 것보다는 혈당을 얼마나 철저히 조절하느냐가 예후에 더 중요하다는 연구 결과도 있어⁸, 인슐린 자체의 역할보다는 혈당 조절이 패혈증 환자의 사망률 감소의 주요 인자임을 시사하고 있다. 그렇지만, 최근 들어서 인슐린 자체의 효능에 대한 연구가 진행 중이며, 이 중 인슐린이 항염증 작용을 보인다는 연구 결과들이 속속 보고되고 있다^{9,10}.

한편 NF- κ B/I κ B 경로는 염증매개 사이토카인의 발현에 중추적인 역할을 담당하고 있는 공통 경로(converging pathway)로 이해되고 있으며¹¹⁻¹³, NF- κ B는 면역기능, 염증반응, 혈관 내피세포의 활성화, 세포성장 등에 관여하는 전사인자로서 다른 전사인자와 마찬가지로 표적 유전자(target gene)의 promoter 부위에 결합하여 전사를 촉진시키게 된다.

이렇듯 염증 반응에 핵심적인 역할을 담당하는 NF- κ B/I κ B 경로와 인슐린이 관련이 있다는 몇몇 연구 결과들이 있었지만^{14,15}, 아직까지는 인슐린에 의하여 NF- κ B/I κ B 경로가 억제되는 자세한 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 패혈증에서 주요 역할을 담당한다고 알려진 대식세포의 세포주를 이용하여, lipopolysaccharide (LPS)에 의하여 활성화되는 NF- κ B/I κ B 경로가 인슐린 전처치에 의하여 활성화가 억제되는지, 억제된다

면 어떤 기전을 통하여 억제되는지에 초점을 맞추어 연구를 진행하고자 한다.

대상 및 방법

1. 세포주

본 연구에는 mouse macrophage cell line인 Raw 264.7 세포를 사용하였다. Raw 264.7 세포주는 10% 우태혈청, 페니실린 30 mg/mL, 스트렙토마이신 50 mg/mL이 첨가된 RPMI-1640 배지를 각각 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 인슐린 처리

인슐린은 중간형 인슐린인 Neutral Protamine Hagedom (NPH) 인슐린을 사용하였고, 구체적으로 mouse macrophage cell line인 Raw 264.7 세포를 인슐린 10 μ g/mL로 6시간 전처치하고 LPS 1 μ g/mL로 각각 30분, 2시간, 4시간 처리한 뒤 총단백을 추출하여 실험을 진행하였다. 인슐린 처치를 시간별로 나누어 처리한 실험에서는 Raw 264.7 세포를 인슐린 10 μ g/mL로 2, 4, 24시간 전처치하고 LPS 1 μ g/mL로 30분 처리한 뒤 총단백을 추출하였다.

3. Western 분석법

Whole lysis buffer (0.1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris [pH 7.5~8.0], 250 mM NaCl, 50 mM)를 이용하여 총세포 단백을 추출하였다. 30 g의 세포 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동시켰다. 4시간 동안 400 mA의 일정한 전류로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고, 이 membrane을 blocking solution (5% skim milk in 1 X PBS/Tween 20)으로 1시간동안 block 시킨 후 일차 항체를 1 : 1,000으로 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체를 1 : 2,000으로 첨가하여 반응시킨 후 면역신호의 검출은 ECL Western blotting detection system을 이용하였다.

4. I κ B Kinase (IKK) Assay

세포 내 IKK의 활성화도는 다음과 같은 방법으로 시행하였다. Lysis buffer를 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate, 2 mM EDTA, 2 mM pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 10 μ g/mL leupeptin,

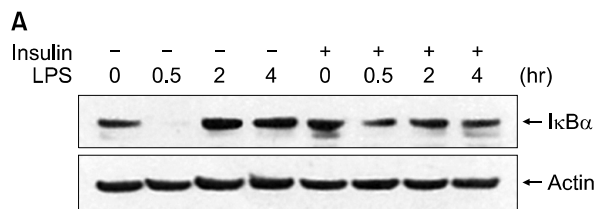
1 mM PMSF의 조성으로 만든 뒤, 세포를 용해시켜 4°C에서 10분간 16,000×g로 원심 분리하였다. 상층액을 따서 1 : 100으로 희석한 anti-IKK α Ab와 50 μ L protein-G Sepharose beads를 섞어 4°C에서 overnight incubation 시켰다. 2번에 걸쳐 washing을 시킨 뒤에 10 μ L의 buffer (20 mM HEPES [pH 7.6], 20 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, and 1 mM DTT)에 0.5 μ g GST-I κ B α 와 10 μ Ci의 [γ -³²P]ATP를 섞어 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 10% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동을 시행하였고 nitrocellulose membrane에 전이(transfer) 시킨 뒤 autoradiography를 시행하였다.

이번 연구에서는 구체적으로 Raw 264.7 세포를 인슐린 10 μ g/mL로 6시간 동안 전처리하고, 1 μ g/mL로 5분 처리한 뒤 IKK 활성화를 평가하였다.

결 과

1. 대식세포주에서 LPS 자극에 의한 I κ B α 분해에 인슐린이 미치는 영향

대식세포에서 LPS에 의해 유도된 I κ B α 분해에 인슐린이 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여, 인슐린 처리 후 시간 경과에 따른 I κ B α 발현 정도를 I κ B α antibody를 이용하여 Western blot으로 평가하였다. LPS 자극 후 I κ B α 가 30분 후 완전히 분해되었으나, 인슐린을 전처리한 경우에는 LPS에 의해 유도된 I κ B α 분해가 억제됨을 확인하였다(Figure 1A). 다음으로 인슐린 처리를 시간별



로 나누어 처리하였을 때의 변화 양상을 확인하여 보았다. 이 경우 인슐린의 I κ B α 분해 억제 효과는 4시간째부터 나타나서 24시간째까지 지속되었다(Figure 1B).

2. 대식세포주에서 LPS 자극에 의한 I κ B α 인산화에 인슐린이 미치는 영향

대식세포주에서 LPS 자극에 의한 I κ B α 인산화에 인슐린이 미치는 영향을 확인하기 위해서 phosphorylated I κ B α antibody로 I κ B α 인산화 여부를 Western 분석으로 평가하였다. LPS 자극 후 30분째 I κ B α 인산화가 최대인 것으로 확인되었고, 이렇게 증가되었던 I κ B α 인산화는 인슐린 전처치에 의해 감소함을 확인하였다(Figure 2). 이 결과를 통해 인슐린은 LPS 자극에 의한 I κ B α 인산화를

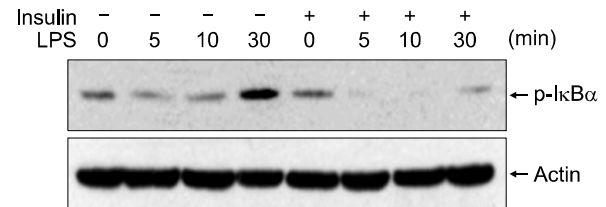


Figure 2. Insulin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced I κ B α phosphorylation in macrophage cell line. Raw 264.7 cells were pre-treated with 10 μ g/mL of insulin for 6 hours and then treated with 1 μ g/mL of LPS for 0, 5, 10, 30 minutes. Phosphorylated I κ B α and actin expressions were evaluated by Western blot. Results are representative of three distinct experiments.

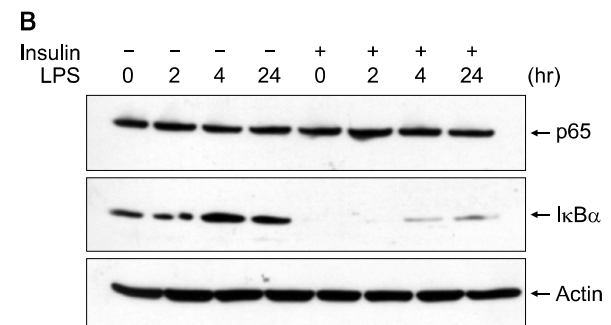


Figure 1. Insulin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced I κ B α degradation in macrophage cell line. (A) Raw 264.7 cells were pre-treated with 10 μ g/mL of insulin for 6 hours and then treated with 1 μ g/mL of LPS for 0, 0.5, 2, 4 hours. (B) Raw 264.7 cells were pre-treated with 10 μ g/mL of insulin for 0, 2, 4, 24 hours and then treated with 1 μ g/mL of LPS for 30 minutes. I κ B α and actin expressions were evaluated by Western blot. Results are representative of three distinct experiments.

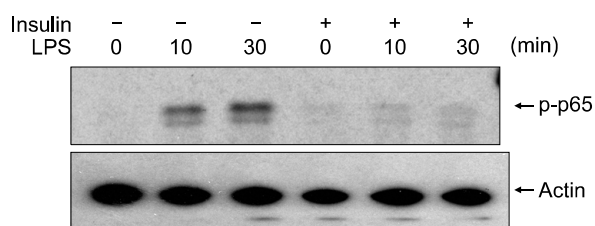


Figure 3. Insulin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced p65 in macrophage cell line. Raw 264,7 cells were pre-treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of insulin for 6 hours and then treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS for 0, 10, 30 minutes. Phosphorylated p65 and actin expressions were evaluated by Western blot. Results are representative of three distinct experiments.

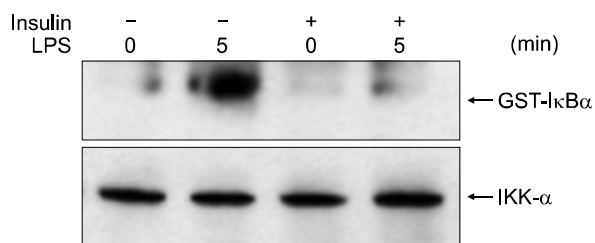


Figure 4. Insulin inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced I κ B kinase (IKK) activation in macrophage cell line. Raw 264.7 cells were pre-treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of insulin for 6 hours and then treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS for 5 minutes. IKK activity was evaluated by *in vitro* immune complex kinase assay. Results are representative of three distinct experiments.

억제함을 알 수 있었다.

3. 대식세포주에서 LPS 자극에 의한 p65 인산화에 인슐린이 미치는 영향

인슐린이 NF κ B/I κ B 경로 중 p65 인산화에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 LPS 자극에 의한 p65 인산화 여부를 phosphorylated p65 antibody를 이용하여 Western 분석으로 평가하였다. LPS 자극 후 10분 후부터 증가되었던 p65의 인산화는 인슐린 전처치에 의하여 역시 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 3).

4. 대식세포주에서 LPS 자극에 의한 IKK 활성화에 인슐린이 미치는 영향

인슐린이 I κ B 조절 기전 중 IKK 활성화에 영향을 미치

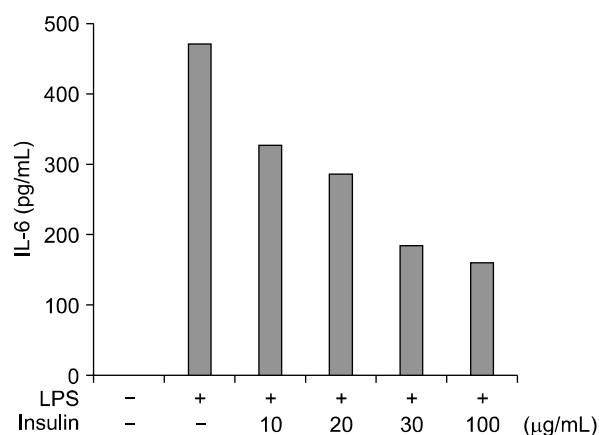


Figure 5. Insulin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced interleukin-6 (IL-6) secretion dose-dependently in macrophage cell line. Raw 264,7 cells were pre-treated with 0, 10, 20, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of insulin for 6 hours and then treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS for 24 hours. Levels of secreted IL-6 were evaluated by ELISA. Results are representative of three distinct experiments.

는지를 규명하기 위하여, 인슐린으로 전처치 후 LPS에 의한 IKK 활성화에 미치는 효과를 평가하였다. 세포 내 IKK 활성도는 GST-I κ B를 기질로 이용한 생체의 면역 침강법 (*in vitro* immune complex kinase assay)을 이용하였다. Raw 264.7 세포주에서 LPS 자극 후 5분 뒤에 IKK 활성도가 증가함을 확인하였고, 이러한 활성도 증가는 인슐린 전처치에 의하여 감소함을 확인하여, 인슐린이 IKK level에서도 영향을 미침을 추정할 수 있었다(Figure 4).

5. 대식세포주에서 LPS 자극에 의한 interleukin-6 (IL-6) 분비 증가에 인슐린이 미치는 영향

인슐린이 NF κ B/I κ B 경로의 상위 level부터 영향을 미쳐 항염증작용을 유발할 수 있음을 확인하였기에 다음으로 실제 cytokine 분비능에도 작용을 하는지 확인하고자 실험을 진행하였다. Raw 264.7 세포주에 LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 후 24시간 뒤 배양액에서 IL-6 농도를 ELISA 기법으로 측정하였다. LPS 자극 후 IL-6 농도가 470 pg/mL 정도 까지 상승함을 확인하였고, 이는 인슐린 전처치에 의하여 통계적으로 유의하지는 않지만 감소하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다(Figure 5).

고 찰

중환자실에서 혈당이 높은 경우 환자의 나쁜 예후와 연관이 있고, 인슐린으로 혈당을 적극적으로 조절하는 것이 예후에 도움이 된다는 보고들이 발표되어 왔다^{6,7}. 물론 최근에는 적극적인 혈당 조절이 중환자 진료에 있어 예후와는 무관하고 오히려 저혈당 위험성을 높인다는 보고가 있어 아직 결론을 내리기는 어려우나^{16,17}, 일부 환자군에서는 인슐린 치료가 도움이 될 가능성이 충분히 있다. 중환자에서 인슐린 치료를 하였을 때 사망률을 줄이는 기전에 대해서는 아직 자세히 밝혀진 바가 없다. 이러한 상황에서 한 가지 제시되는 기전은 혈당이 높은 환자에서는 호중구의 탐식 능력이 떨어져 있는데 인슐린을 통하여 혈당을 낮춤으로써 세균에 대한 탐식 능력을 개선시킨다는 것이다. 최근 들어서 인슐린 자체의 효능에 대한 연구가 진행 중이며, 이 중 인슐린이 항염증 작용을 보인다는 연구 결과들이 속속 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 인슐린의 항염증 작용이 대표적인 염증매개 경로인 NF- κ B/I κ B와 연관이 있음을 규명하고자 하였다.

NF- κ B는 구조상 같은 계열(Rel family)에 속한 단백질 heterodimer나 혹은 homodimer 형태로 존재하는데, 가장 대표적인 것이 p50과 p65의 heterodimer 형태이다. 이 물질은 세포질 내에서 억제 인자인 I κ B 단백질과 결합한 비활성화 형태(dormant complex)로서 존재하게 되는데, 여러 가지 다양한 세포 외의 자극에 의하여 I κ B가 인산화되고, ubiquitination 되어 proteasome system에 의하여 I κ B가 분해되고 나면¹⁸, 유리된 NF- κ B 복합체의 형태로 세포핵 내로 이동하여 여러 유전자의 B element (GGGA ATTCCC)에 결합함으로써 표적 유전자(target gene)의 전사 활성을 조절하게 된다¹⁹. 이런 경로를 통해 전사가 활성화되는 대표적인 염증매개 물질로는 TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, lymphotoxin, GM-CSF, γ -IFN, adhesion molecule 등이 알려져 있으며, NF- κ B의 활성화에는 LPS를 포함한 여러 병원체나 TNF, IL-1 등의 염증성 사이토카인, T-cell receptor TCR signaling 등 여러 신호전달 체계가 관여한다는 사실이 밝혀지고 있다.

인슐린이 이러한 NF- κ B/I κ B 경로와 관련이 있다는 연구 결과들이 있었다.

한 연구 결과에서는 인슐린 처리에 의해 human aortic endothelial cells에서의 intercellular adhesion molecule-1 발현이 억제되어 인슐린이 염증 반응을 차단하는 데 도움이 될 수 있음을 보고하였고²⁰, 또 다른 연구에서는 hu-

man aortic endothelial cell에서 인슐린 처리에 의해 NF- κ B 및 MCP-1 발현이 억제됨을 보고하였다¹⁴. 한편 Dandona 등¹⁵은 비만한 환자의 혈액으로부터 뽑은 mononuclear cell을 가지고 인슐린 처리를 하여 I κ B 발현이 증가되고 NF- κ B의 핵내 이동이 억제된다는 결과를 발표하였다.

실제 NF- κ B/I κ B 경로가 활성화되거나 억제되기 위해서는 여러 종류의 효소 및 기질이 관여하고, 여러 단계의 과정이 필요하다고 알려져 있다. 최종 결과만 보아서는 과연 어느 단계가 관여하여 이런 결과가 나왔는지를 알기 어려운 것이다. 기존의 연구 결과들은 단지 인슐린에 의하여 NF- κ B 핵내 이동이 억제된다는 사실을 보고한 것이 대부분이다. 또한, 지금까지 인슐린과 NF- κ B/I κ B 경로와의 관련성을 본 연구 결과들은 주로 기저 상태의 세포에 인슐린을 처리하여 I κ B 발현 정도나 NF- κ B 핵내 이동 정도를 확인한 실험들이었다. 그렇지만, 실제 패혈증 환자에서의 인슐린 치료 효과의 기전을 밝히기 위해서는 LPS 등의 외부 자극을 주어 세포 내 NF- κ B/I κ B 경로의 활성화를 유도하였을 때 인슐린에 의하여 활성화가 억제되는지를 확인하는 것이 훨씬 중요할 것으로 판단된다. 이에 본 연구에서는 패혈증에서 주요 역할을 담당한다고 알려진 대식세포의 세포주를 이용하여, LPS에 의하여 활성화되는 NF- κ B/I κ B 경로가 인슐린 전처치에 의하여 활성도가 억제되는지, 억제된다면 NF- κ B/I κ B의 어느 단계에서 억제되는지를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 NF- κ B/I κ B 경로에서 인슐린이 상위 단계인 IKK level부터 영향을 미침을 보여주었다. LPS 자극에 의하여 증가되었던 IKK 활성도가 인슐린 전처치에 의하여 감소되었고, 그 다음 단계인 I κ B α 인산화 및 I κ B α 분해도 인슐린 전처치에 의해 억제되었다. 그렇지만, densitometer를 통한 정량적 분석이 뒷받침되지 못한 것은 이번 연구의 제한점 중 하나라고 볼 수 있다.

이러한 인슐린의 항염증 작용이 효과를 보이기 위해서는 결국 NF- κ B/I κ B 경로에 의하여 활성화되는 염증매개 사이토카인의 분비가 최종적으로 억제되어야 한다. 본 연구에서는 LPS 자극에 의한 IL-6 분비가 인슐린 전처치에 의하여 감소되는 경향을 보였다. 그렇지만, 아쉽게도 통계적 유의성을 확인할 수는 없었다. 이를 보완하기 위해서는 NF- κ B의 조절을 받는 IL-1이나 TNF- α 등과 같은 다른 염증매개 사이토카인 분비능에 대한 평가가 추가적으로 이루어져야 할 것이며 Northern blotting이나 RT-PCR를 통해 RNA level에서의 증가 여부도 함께 평가되어

야 할 것으로 사료된다.

또한, 본 연구에서는 인슐린에 의해 p65 인산화가 억제 되는 것까지 확인되었으나, 그 이후 p65의 핵내 이동 및 promoter binding, transcription activity 등에 어떤 영향을 미치는지를 확인하지는 못하였다. 향후 electrophoretic mobility shift assay나 luciferase assay를 통하여 이에 대한 평가가 뒷받침되어야 할 것이다.

한편, 이번 연구에서는 대식세포주에서 인슐린의 항염증 작용을 관찰하였는데, 염증반응에 관여하는 다른 염증 세포에서도 인슐린이 항염증 작용을 나타낼 수 있음을 보여주는 연구 결과들이 발표되었다. Viardot 등²¹은 인슐린 처리에 의하여 T 림프구 분화가 Th2 방향으로 전환되어 Th1/Th2 ration를 감소시킴으로써 항염증 작용을 강화시킬 수 있음을 보여주었으며, 혈관 내피 세포에서 인슐린이 NF- κ B/I κ B 경로를 억제할 수 있음을 입증한 연구들도 있다^{14,20}. 또한, 개개의 염증 세포를 대상으로 하지 않고 동물 실험을 통해 인슐린이 패혈증 모델에서 각 장기에서의 염증 반응을 줄인다는 연구 결과도 있어, 인슐린의 항염증작용이 대식세포에만 국한된 것이 아님을 간접적으로 보여주고 있다²².

결론적으로 인슐린은 대식세포주에서 LPS 자극에 의하여 유도된 NF- κ B/I κ B 경로 활성화를 IKK level에서부터 부분적으로 억제시킴으로써 항염증 효과에 기여할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
2. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-8.
3. Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1991;324:429-36.
4. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1697-702.
5. Fisher CJ Jr, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, et al. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med* 1994;22:12-21.
6. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345:1359-67.
7. Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:978-82.
8. Van den Berghe G, Wouters PJ, Bouillon R, Weekers F, Verwaest C, Schetz M, et al. Outcome benefit of intensive insulin therapy in the critically ill: insulin dose versus glycemic control. *Crit Care Med* 2003;31:359-66.
9. Martins JO, Ferracini M, Ravanelli N, Landgraf RG, Jancar S. Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF-kappaB activation in alveolar macrophages. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:279-86.
10. Martins JO, Ferracini M, Ravanelli N, Landgraf RG, Jancar S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. *Cell Physiol Biochem* 2008;21:297-304.
11. Baeuerle PA, Baltimore D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 1988;242:540-6.
12. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
13. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-32.
14. Aljada A, Ghanim H, Saadeh R, Dandona P. Insulin inhibits NFkappaB and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:450-3.
15. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3257-65.
16. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl*

- J Med 2008;358:125-39.
17. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, et al. Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006;354:449-61.
 18. Baeuerle PA, Baltimore D. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev* 1989;3:1689-98.
 19. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
 20. Aljada A, Saadeh R, Assian E, Ghanim H, Dandona P. Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2572-5.
 21. Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D. Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology* 2007;148:346-53.
 22. Barkhausen T, Probst C, Hildebrand F, Pape HC, Krettek C, van Griensven M. Insulin therapy induces changes in the inflammatory response in a murine 2-hit model. *Injury* 2009;40:806-14.
-