

RAW 264.7 Cell에서 리포폴리사카라이드로 유도된 염증성 매개인자들의 생산에 있어서 Corticosterone 전처리 효과

채 병 숙[#]

우석대학교 약학대학 약학과

(Received July 20, 2015; Revised August 25, 2015; Accepted August 26, 2015)

Effect of Corticosterone Pretreatment on the Production of LPS-Induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Cells

Byeong Suk Chae[#]

College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract — Glucocorticoids are known to have anti-inflammatory effect. To investigate whether corticosterone pretreatment enhances or not lipopolysaccharide (LPS)-induced production of inflammatory mediators, RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of corticosterone for 24 h and then cultured without corticosterone in the presence or absence of LPS. Our results demonstrated that LPS remarkably increased production of TNF- α , IL-6, IL-1 β , vascular endothelial growth factor (VEGF), and NO (nitric oxide). Corticosterone pretreatment significantly attenuated LPS-induced production of TNF- α , IL-1 β , and VEGF, while significantly enhanced IL-6 and NO. These findings suggest that corticosterone pretreatment may contribute to LPS-induced inflammatory responses in macrophages via pro- and anti-inflammatory imbalance of inflammatory mediators.

Keywords □ corticosterone, TNF- α , IL-6, IL-1 β , VEGF, NO, endotoxin

스트레스 시스템의 하나인 시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal: HPA) 축의 활성화는 급성자극에 의해 유도되며 최종산물인 glucocorticoids(GCs)의 혈중농도를 높여 대사, 에너지 균형 및 국소적 순환 등에 대한 항상성 유지에 있어서 중요한 역할을 한다.¹⁾ 또한 GCs는 면역억제, 항염증 및 항스트레스 작용을 지니 자가면역질환 및 염증을 억제하고 장기이식 후 면역거부반응 등 치료목적으로 사용되고 있다.^{2,3)}

그런데 육체적 또는 정신적 스트레스에 의한 HPA 축의 만성적 활성화는 GCs 혈중농도의 저수준 상승 상태를 나타내며 T 세포 면역반응 및 염증억제작용 등에 있어서 저하효과를 유도한다.^{4,5)} 스트레스 시스템의 만성적 활성화는 GCs의 생산증가의 특징을 보이는 Cushing 증후군의 복부비만관련 대사증후군과 유

사한 증상을 나타내며,⁶⁾ 낮은 수준의 염증상태와 관련한 복부비만, 제 2형 당뇨병 및 대사증후군 유발을 매개하는 것으로 나타났다.^{7,8)} 만성적 HPA 축의 활성화와 그에 따른 GCs의 생산은 염증성 매개인자들의 유발에 관여하지만, 또한 역으로 면역 및 염증 반응 중에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 NO 등과 같은 inflammatory mediator들은 스트레스 시스템의 주요 구성물질을 활성화 시키고 HPA 축을 자극하며 cortisol 혈중농도를 증가시켜 서로 시너지효과를 갖는다.^{9,10)}

Endotoxemia는 그람음성균의 세포벽에 있는 독소인 endotoxin의 혈중 농도가 증가된 상태로써 그람음성균 감염에 따른 면역활성화 및 그에 따른 전신성 급성염증 유발의 특징을 나타낸다.¹¹⁾ Endotoxemia로 인한 전신성 염증반응 및 proinflammatory cytokine 생산증가는 폐를 포함한 다양한 장기의 기능상실과 손상을 유발하며, 비만, 인슐린저항성 및 동맥경화 등에도 관여하여 그에 따른 제 2형 당뇨병 및 심혈관계질환을 초래하고 사망률을 높인다.^{12,13)} 높은 사망률을 보이는 sepsis 상태에서는 HPA 축의 기능이 상실되어 GCs 작용에 대한 항상성 장애를 나타내

[#]Corresponding Author

Byeong Suk Chae
College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea
Tel.: 063-290-1426 Fax.: 063-290-1560
E-mail: cbse@woosuk.ac.kr

는 것이 중요한 병리적 기전 중의 하나이며,¹⁴⁾ 항염증 작용을 지니는 hydrocortisone와 같은 GCs의 치료요법이 endotoxemia 치료목적 및 septic shock을 개선시키기 위해 사용되고 있다.^{15,16)}

그런데 감염에 따른 염증성 cytokine 생산에 있어서 GCs의 노출시간과 용량이 중요한 결정인자가 되는 것으로 나타났다. Smyth 등¹⁷⁾은 RAW 264.7 cell에서 corticosterone 35 ng/ml 전처리에 의해 LPS 자극으로 유도된 TNF- α , IL-6 및 NO 생산 증가가 관찰되었고 NF- κ B 활성화와 TNF- α 유전자 발현을 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 dexamethasone으로 12 h 동안 전처리 한 후 LPS 투여한 생쥐에서는 TNF 생산이 차단되었다고 Fantuzzi 등¹⁸⁾은 보고하였다. Yeager 등¹⁹⁾은 사람의 endotoxemia 실험모델에서 endotoxin 투여 전 스트레스 상태에서 관찰되는 농도 수준으로 cortisol을 전처리 하였을 때, 대조군에 비하여 cortisol의 낮은 농도(6.3 mg/hr/70 kg)에서는 유의성 있는 혈중 IL-6 증가와 IL-10 감소 등을 유발하여 endotoxin에 대한 전신성 염증반응이 증가됨을 보여주었으나, 고농도(12.6 mg/hr/70 kg)에서는 변화가 없었다. Barber 등²⁰⁾에 의하면 사람에게 endotoxin과 hydrocortisone을 동시투여 시 발열을 저하시키고 염증성 인자들의 혈중농도가 저하되었으나 GCs 투여 후 최소한 12시간 간격으로 endotoxin 투여한 경우는 지연성 염증효과가 나타났다.

GCs는 endotoxin과 같은 여러 감염성 자극뿐만 아니라 정신적 스트레스와 같은 비감염성 자극에 의해서도 혈중농도가 증가될 수 있으며, 따라서 육체적 및 정신적 스트레스 노출에 의한 혈중 cortisol 농도 상승은 현대인의 건강하지 못한 생활습관이나 감염에 따른 endotoxin 노출로 인한 IL-6를 비롯한 염증반응을 더욱 더 유도하는 높은 위험인자로 작용할 수 있다.^{21,22)} 그러나 여러 원인에 의해 GCs 혈중농도가 저수준으로 상승된 후 endotoxin 노출 시 농도 및 시간에 따라 좌우되는 염증반응 유도 가능성을 지나나 그 효과 및 그 기전은 아직 불확실한 상태이다.

따라서 본 연구는 RAW 264.7 cell에서 endotoxin으로 유도되는 염증성 매개인자들인 TNF- α , IL-6, IL-1 β , VEGF 및 NO 등의 생산에 있어서 corticosterone 전처리 영향에 대하여 실험을 실시하였다.

실험방법

재료 및 시약

RAW 264.7 cell는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매했으며, corticosterone(Sigma, St. Louis, MO)은 *in vitro* 실험을 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 사용하였다.

세포 배양

10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml(Invitrogen) 및 antimycotic Amphotericin

B(Invitrogen)를 함유한 DMEM 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 RAW 264.7 cell(1×10^6 cells/well)을 각각 24 well plate에 분주하고, corticosterone 50, 100, and 200 ng/ml 농도별로 24 h 전처리 한 후 신선한 배지로 교체한 다음 LPS 10 μ g/ml로 자극을 주어 6 h 및 24 h 동안 5% CO₂ incubator에서 37°C로 배양하였으며 그 후 세포배양액을 채취하여 cytokine, VEGF 및 NO 측정을 위해 -70°C에 보관하였다.

Cytokine의 측정

RAW 264.7 cell의 보관된 세포배양액 중 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등 cytokine의 농도측정은 cytokine monoclonal antibodies(BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 실시되었고, ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 결과는 m당 picogram 단위에서 정량하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

VEGF 측정

RAW 264.7 cell로부터 얻어진 세포배양액 중 VEGF 농도 측정은 VEGF monoclonal antibodies(BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.)를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 실시되었고, manufacturer's instruction에 따라 ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 결과는 m당 picogram 단위에서 정량을 하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

NO 측정

RAW 264.7 cell로부터 얻어진 세포배양액 중 NO 농도 측정은 96-well plate에 시료 100 μ l에 Griess reagent 100 μ l를 가한 후 10분에 ELISA microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

모든 자료는 means \pm standard error(S.E.)로 나타냈으며, 유의성 검사는 students' *t*-test로 행하였다.

실험결과 및 고찰

RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokine의 생산에 있어서 corticosterone 전처리 효과

GCs는 급성자극 시 항염증효과로 잘 알려져 있지만 육체적 또는 정신적 만성스트레스에 따른 HPA 축 활성화 및 혈중 GCs의

지속적인 상승은 염증 및 인슐린저항성은 물론 복부비만, 고지혈증, 인슐린 저항성 및 제 2형 당뇨병 등 염증관련 대사질환에 대한 높은 위험성을 지닌다.⁶⁻⁸⁾ TNF- α , IL-6, IL-1 β , platanoids 및 NO 등 염증성 매개인자들은 HPA 축의 활성화 유발관련 염증성 질환에서 중요한 역할을 한다.⁹⁾ 그런데 몇몇 연구들¹⁷⁻²⁰⁾에 의하면, GCs는 노출 시간 및 농도 의존적으로 염증유도효과에 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이는 GCs가 농도 및 시간에 따라 endotoxin에 의해 유도되는 염증반응이 좌우될 것임을 시사한다.

본 연구는 macrophage에서 GCs의 전처리가 시간 및 농도에 따라 LPS에 의해 유도된 proinflammatory cytokine 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시되었다. RAW 264.7 cell에 각각 corticosterone를 50, 100 및 200 ng/ml의 농도별로 24 h 동안 전처리 한 후 신선한 배지로 교체한 다음 LPS 10 μ g/ml로 자극을 주어 6 h 및 24 h 동안 배양하였으며 세포배양액 중

proinflammatory cytokine 농도를 측정하였다. 본 연구 결과에서 6 h 동안 LPS 자극으로 RAW 264.7 cell의 TNF- α 및 IL-6 생산이 유의성 있게 증가되었으나, corticosterone 전처리는 농도의존적으로 LPS에 의해 유도된 TNF- α 생산만을 유의성 있게 억제시켰다(Fig. 1A and 2A). 또한 본 연구에서 24 h 동안 LPS 자극 시 IL-6 및 IL-1 β 생산은 현저히 상승했으나, LPS에 의해 유도된 IL-1 β 는 corticosterone 전처리에 의해 농도의존적으로 유의성 있게 억제되었다(Fig. 3B). 그런데 본 연구는 RAW 264.7 cell에서 corticosterone 전처리가 LPS에 의해 유도된 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 생산에 있어서 TNF- α 및 IL-1 β 는 농도의존적으로 억제하였으나 IL-6는 6 h LPS 자극이 아닌 24 h LPS 자극의 경우에서 저농도 corticosterone 50 및 100 ng/ml 전처리에 의해 오히려 상승됨이 관찰되었다(Fig. 2B). 따라서 TNF- α 및 IL-1 β 는 proinflammatory cytokine으로 염증반응 및 지방세포의 인슐린저항성을 연결하는데 있어서 중요한 역할을 하는데,^{23,24)} 본 연구결과에서 corticosterone 전처리가 LPS에 의해 유도되는 RAW 264.7 cell의 TNF- α 및 IL-1 β 생산을 억제함을 보여줌

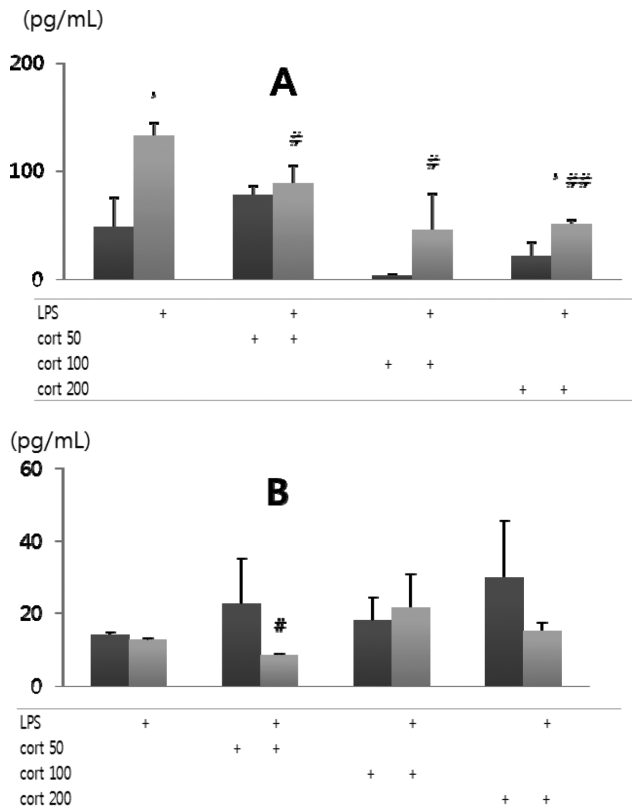


Fig. 1 – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone for 24 h and then cultured with refreshed medium for 6 h (A) or 24 h (B) in the presence or absence of LPS. Concentration of cytokines was measured using ELISA. Each value represents the mean \pm S.E. * ($p < 0.05$): Significantly different from the value in negative control. # ($p < 0.05$) and ## ($p < 0.01$): Significantly different from the value in LPS positive controls.

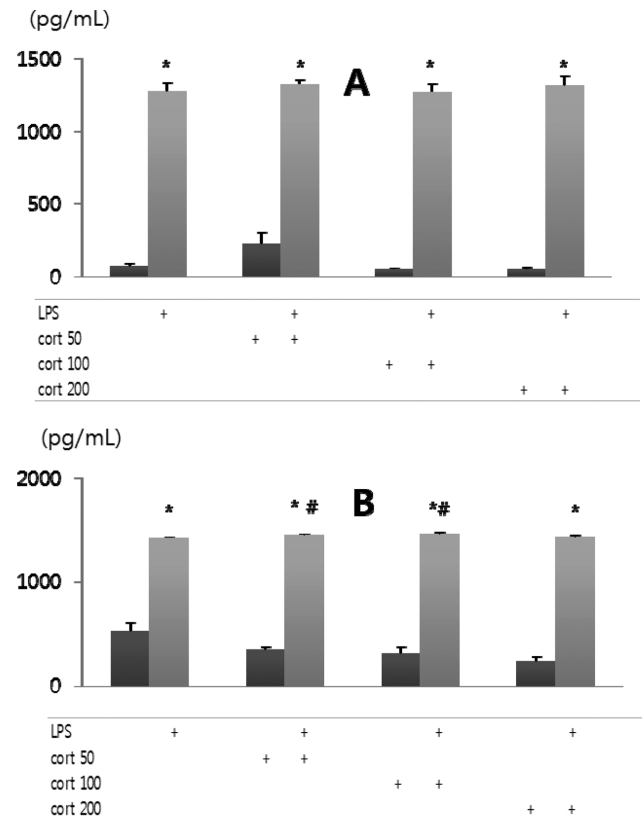


Fig. 2 – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of IL-6 in RAW 264.7 cells. Each value represents the mean \pm S.E. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * ($p < 0.05$): Significantly different from the value in negative control. # ($p < 0.05$): Significantly different from the value in LPS positive controls.

로써 GCs 전처리가 항염증효과 및 HPA 축 활성화도 억제효과를 가져올 것으로 보인다. 또한 사람에게 GCs 전처리 후 최소한 12 시간 간격으로 endotoxin 투여한 경우 지발성 염증효과가 나타났다는 Barber 등²⁰⁾에 의하면, 본 연구결과가 보여준 corticosterone 고농도가 아닌 저농도의 전처리 시 LPS 6 h보다는 24 h 자극으로 유도된 IL-6의 생산을 더욱 유의성 있게 증가 시킨 것으로 보아 corticosterone 저농도에서 endotoxin의 IL-6 생산 증가를 통하여 지발성 염증반응을 유발할 것으로 사료되며, 더구나 GCs는 상피세포에 있는 IL-6 수용체와의 친화력을 증가 시키기 때문에²⁵⁾ corticosterone 전처리 시 IL-6 수용체와의 친화력 증가에 따른 IL-6 염증유발효과를 더욱 상승시킬 수 있음을 시사하고 있다.

IL-6는 면역계를 자극하여 염증관련 만성질환 유발하는 주 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있으며, 염증성 자가면역질환 및 암에 있어서도 중요한 타겟이 되고 있고,^{26,27)} 지방조직 및 간의 인슐린저항성 유발에 관여한다.²⁸⁾ IL-6는 endotoxemia, 조직손상, 염증성 면역반응 및 육체적 정신적 스트레스 등에 있어서 의해

그 혈중농도가 증가되며,²⁹⁾ GCs호르몬과 상호작용을 하여 CRP를 유도하여 그로 인한 동맥경화 유발에 관여한다.³⁰⁾ 또한 IL-6는 HPA 축을 자극하며 cortisol 혈중농도 증가를 유발하는데 관여함으로써 낮은 농도의 GCs 전처리는 endotoxin에서 염증반응의 악순환을 유발시킬 수 있다.³¹⁾ 따라서 육체적 정신적 스트레스에 의한 HPA 축의 만성적 활성화로 유도된 혈중 GCs 농도의 저수준 상승상태는 endotoxin 노출 시 유도된 macrophage의 IL-6 생산을 더욱 증가시켜 그에 따른 염증관련 만성질환에 대한 위험성을 높일 것이다.

RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 억제된 VEGF 생산에 미치는 corticosterone 전처리 효과

VEGF는 내피세포, 염증성 면역세포 및 신경세포 등에 영향을 주는 강력한 angiogenic factor로서 작용하여 상처치유 복구시스템을 활발하게 하며,³²⁾ 신경보호 및 신경기능향상 작용을 갖는다.³³⁾ 그러나 과잉의 VEGF는 혈관내피세포의 투과성을 증가시켜³⁴⁾ 염증과 혈액응집에 기여하며 류마티스성 관절염, 염증성 장

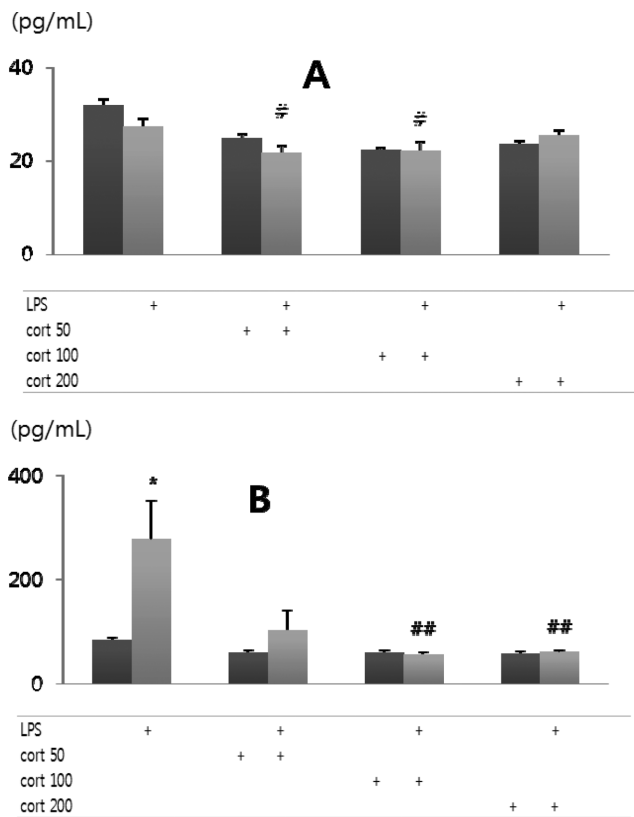


Fig. 3 – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of IL-1β in RAW 264.7 cells. Each value represents the mean±S.E. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * (p<0.05): Significantly different from the value in negative control. # (p<0.05) and ## (p<0.01): Significantly different from the value in LPS positive controls.

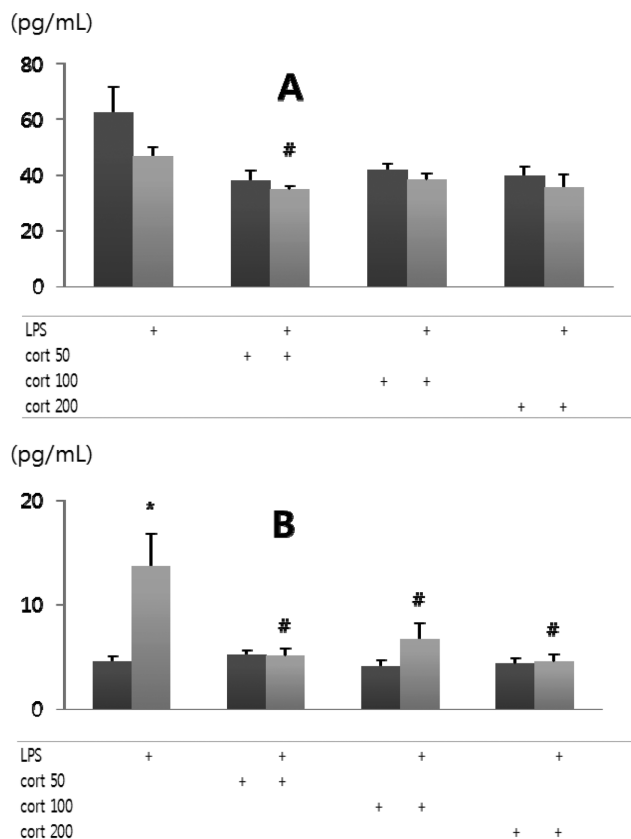


Fig. 4 – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of VEGF in RAW 264.7 cells. Each value represents the mean±S.E. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * (p<0.05): Significantly different from the value in negative control. # (p<0.05): Significantly different from the value in LPS positive controls.

질환, 동맥경화 및 암 등에서 병리적 증가자 역할을 한다.³⁵⁾ VEGF는 sepsis의 사망률과 유병율에 결정적인 인자로 작용한다.³⁶⁾ GCs는 VEGF의 발현 억제작용을 가지며,³⁷⁾ 혈중 cortisol이 높은 경향이 있는 우울증 환자에서 낮은 VEGF 혈중농도가 관찰되었다.³⁸⁾ 본 연구에서는 RAW 264.7 cell에 corticosterone를 50, 100 및 200 ng/ml의 농도별로 24 h 전처리 한 후 신선한 배지로 교체한 다음 LPS 10 µg/ml로 자극한 후 6 h 및 24 h 동안 더 배양하였으며 그 후 세포배양액을 채취하여 VEGF 농도를 측정하였다. 그 결과 RAW 264.7 cell에서 24 h 세포배양 시 LPS는 VEGF 생산을 유의성 있게 증가시켰으며 corticosterone 전처리는 LPS에 의해 증가된 VEGF 생산을 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 4B). 따라서 corticosterone 전처리는 endotoxin에 의해 증가된 macrophage의 VEGF 생산을 농도의존적으로 억제

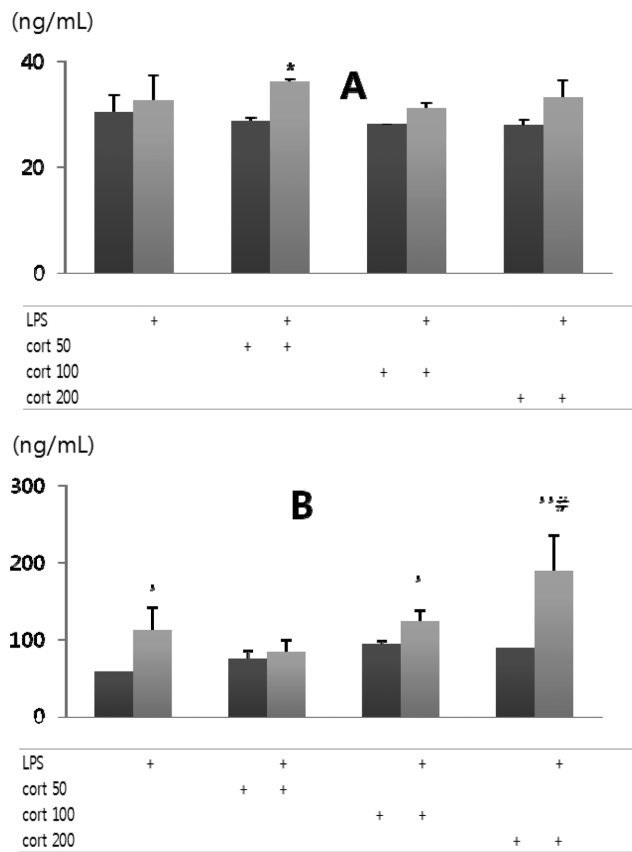


Fig. 5 – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of NO in RAW 264.7 cells. The concentrations of NO in the supernatants obtained in RAW 264.7 cells harvested from the culture were assayed by adding 100 µl of freshly prepared Griess reagent to 100 µl of the sample, and then reading the absorbance at 540 nm after 10 minutes using ELISA. Each value represents the mean±S.E. Other legends and methods are the same as in Fig. 1. * (p<0.05) and ** (p<0.01): Significantly different from the value in negative control. ## (p<0.01): Significantly different from the value in LPS positive controls.

하여 LPS에 의한 증가된 혈관투과성을 억제하고 염증을 저하시킬 것이다.

RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 증가된 NO 생산에 있어서 corticosterone 전처리 효과

염증성 cytokine이나 스트레스와 같은 여러 자극에 의해 NO 생산 및 inducible nitric oxide synthase 활성 등의 증가는 염증 및 인슐린저항성과 관련한 것으로 알려져 있다.³⁹⁾ Fantuzzi 등¹⁸⁾은 생쥐에서 GCs가 endotoxin에 대한 NO 생산증가 등을 통해 염증반응의 증가를 유도하였다고 보고하였는데, 이와 반대로, Radomski 등⁴⁰⁾은 GCs가 vascular endothelial cell에서 NO를 합성하는 inducible nitric oxide synthase를 억제하였다고 하였다. 이는 세포종류나 실험조건에 따라 NO 생성에 미치는 GCs의 효과가 상반될 수 있음을 보여주고 있다. 본 연구는 RAW 264.7 cell에서 corticosterone를 농도별로 24 h 전처리 한 후 신선한 배지로 갈아준 다음 LPS 10 µg/ml로 6 h 및 24 h 동안 자극을 주었으며 Griess 시약을 사용하여 그 세포배양액 중 NO 농도를 측정하였다. 본 연구결과 RAW 264.7 cell에서 LPS는 NO 생산을 유의성 있게 증가시켰고, LPS 처리 후 24 h 배양 시 LPS에 의해 유도된 NO 생산은 corticosterone 50 및 100 ng/ml 전처리에서 변화가 없었으나 corticosterone 200 ng/ml 전처리 시 유의성 있게 증가됨을 보여주었다(Fig. 5B). 이는 RAW 264.7 cell에 corticosterone 전처리 시 NO 생산증가를 가져왔다는 Smyth 등¹⁷⁾의 보고와 일치하고 있다. 따라서 본 연구결과는 macrophage에서 corticosterone 전처리는 endotoxin으로 유도된 NO 생산을 농도의존적으로 증가시켜 염증반응을 더욱 악화시킬 것이다.

결론

본 연구는 RAW 264.7 cell에서 corticosterone 전처리가 6 h 및 24 h 동안 LPS 자극으로 유도되는 염증성 매개인자들의 생산에 미치는 영향에 대하여 실험을 실시하였고 그 결과 RAW 264.7 cell에서 6 h 배양에서 LPS는 TNF-α 및 IL-6 생산을 유의성 있게 유도하였으나 corticosterone 전처리에 의해 TNF-α 생산이 농도의존적으로 유의성 있게 감소되었다. 24 h 배양에 있어서는 LPS는 IL-6, IL-1β, VEGF 및 NO 생산을 현저히 증가시켰으나 corticosterone 전처리에 의해 IL-1β 및 VEGF 생산은 농도의존적으로 유의성 있게 저하되었으나 LPS에 의해 유도된 NO 생산은 농도의존적으로 유의성 있게 증가되었다. 그런데 LPS에 의해 증가된 IL-6 생산은 고농도 corticosterone 200 ng/ml보다 낮은 농도인 50 및 100 ng/ml에서 더욱 증가되었다. 결론적으로 corticosterone 전처리는 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도되는 TNF-α, IL-1β 및 VEGF 생산을 농도의존적으로 억제하나

LPS로 유도되는 IL-6 및 NO 생산을 더욱 증가시켜 그에 따른 염증성 및 항염증성 불균형을 통하여 endotoxin에 의해 유도된 염증반응에 영향을 줄 것으로 사료된다.

References

- 1) Chrousos, G. P. : The HPA axis and the stress response. *Endocr. Res.* **26**, 513 (2000).
- 2) Wilckens, T. : Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 193 (1995).
- 3) Annane, D., Bellissant, E. and Bollaert, P. E. : Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* **301**, 2362 (2009).
- 4) Chrousos, G. P. : The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 38 (2000).
- 5) Chrousos, G. P. : Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequelae. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**(5 Suppl), S275 (2000).
- 6) Constantinopoulos, P., Michalaki, M., Kottorou, A., Habeos, I., Psyrogiannis, A., Kalfarentzos, F. and Kyriazopoulou, V. : Cortisol in tissue and systemic level as a contributing factor to the development of metabolic syndrome in severely obese patients. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, 69 (2015).
- 7) van Raalte, D. H., Ouwens, D. M. and Diamant, M. : Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 81 (2009).
- 8) Pasquali, R., Vicennati, V., Cacciari, M. and Pagotto, U. : The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1083**, 111 (2006).
- 9) Wolf, G. : Glucocorticoids in adipocytes stimulate visceral obesity. *Nutr. Rev.* **60**(5 Pt 1), 148 (2002).
- 10) Chrousos, G. P. : The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1351 (1995).
- 11) Morrison, D. C. and Ryan J. L. : Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* **28**, 293 (1979).
- 12) Rojas, M., Woods, C. R., Mora, A. L., Xu, J. and Brigham, K. L. : Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **288**, L333 (2005).
- 13) Bastard, J. P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J. and Feve, B. : Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* **17**, 4 (2006).
- 14) Kanczkowski, W., Sue, M., Zacharowski, K., Reincke, M. and Bornstein, S. R. : The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **S0303-7207**, 00422 (2014).
- 15) Briegel, J. : Cortisol in critically ill patients with sepsis--physiological functions and therapeutic implications. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**(Suppl 1), 9 (2002).
- 16) Sprung, C. L., Annane, D., Keh, D., Moreno, R., Singer, M., Freivogel, K., Weiss, Y. G., Benbenishty, J., Kalenka, A., Forst, H., Laterre, P. F., Reinhart, K., Cuthbertson, B. H., Payen, D. and Briegel, J. : CORTICUS Study Group : Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N. Engl. J. Med.* **358**, 111 (2008).
- 17) Smyth, G. P., Stapleton, P. P., Freeman, T. A., Concannon, E. M., Mestre, J. R., Duff, M., Maddali, S. and Daly, J. M. : Glucocorticoid pretreatment induces cytokine overexpression and nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *J. Surg. Res.* **116**, 253 (2004).
- 18) Fantuzzi, G., Demitri, M. T. and Ghezzi, P. : Differential effect of glucocorticoids on tumour necrosis factor production in mice: up-regulation by early pretreatment with dexamethasone. *Clin. Exp. Immunol.* **96**, 166 (1994).
- 19) Yeager, M. P., Rassias, A. J., Pioli, P. A., Beach, M. L., Wardwell, K., Collins, J. E., Lee, H. K. and Guyre, P. M. : Pretreatment with stress cortisol enhances the human systemic inflammatory response to bacterial endotoxin. *Crit. Care Med.* **37**, 2727 (2009).
- 20) Barber, A. E., Coyle, S. M., Marano, M. A., Fischer, E., Calvano, S. E., Fong, Y., Moldawer, L. L. and Lowry, S. F. : Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J. Immunol.* **150**, 1999 (1993).
- 21) Morrow, L. E., McClellan, J. L., Conn, C. A. and Kluger, M. J. : Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am. J. Physiol.* **264**(5 Pt 2), R1010 (1993).
- 22) Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., DePaoli, M. and Rabin, B. S. : Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **133**, 2523 (1993).
- 23) Permana P. A., Menge, C. and Reaven, P. D. : Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 507 (2006).
- 24) Tack, C. J., Stienstra, R., Joosten, L. A. and Netea, M. G. : Inflammation links excess fat to insulin resistance: the role of the interleukin-1 family. *Immunol. Rev.* **249**, 239 (2012).
- 25) Snyers, L., De Wit, L. and Content, J. : Glucocorticoid up-regulation of high-affinity interleukin 6 receptors on human epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2838 (1990).
- 26) Puchner, A. and Blüml, S. : IL-6 blockade in chronic inflammatory diseases. *Wien. Med. Wochenschr.* **165**, 14 (2014).

- 27) Shacter, E., Arzadon, G. K. and Williams, J. : Elevation of interleukin-6 in response to a chronic inflammatory stimulus in mice: Inhibition by Indomethacin. *Blood* **80**, 194 (1992).
- 28) Kim, H. J., Higashimori, T., Park, S. Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y. J., Noh, H. L., Cho, Y. R., Cline, G., Kim, J. H., Bachmann, R. A. and Chen, J. : Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam. Horm.* **80**, 613 (2009).
- 29) Kiecolt-Glaser, J. K., Preacher, K. J., MacCallum, R. C., Atkinson, C., Malarkey, W. B. and Glaser, R. : Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9090 (2003).
- 30) Depraetere, S., Willems, J. and Joniau, M. : Stimulation of CRP secretion in HepG2 cells: cooperative effect of dexamethasone and interleukin 6. *Agents Actions.* **34**, 369 (1991).
- 31) Mastorakos, G., Weber, J. S., Magiakou, M. A., Gunn, H. and Chrousos, G. P. : Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 934 (1994).
- 32) Briançon-Marjollet, A., Pépin, J. L., Weiss, J. W., Lévy, P. and Tamisier, R. : Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med.* **15**, 1425 (2014).
- 33) Segi-Nishida, E., Warner-Schmidt, J. L. and Duman, R. S. : Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11352 (2008).
- 34) Koczy-Baron, E. and Kasperska-Zajac, A. : The role of vascular endothelial growth factor in inflammatory processes. *Postępy. Hig. Med. Dosw. (Online)* **68**, 57 (2014).
- 35) Tang, X., Yang, Y., Yuan, H., You, J., Burkatovskaya, M. and Amar, S. : Novel transcriptional regulation of VEGF in inflammatory processes. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 386 (2013).
- 36) Yano, K., Liaw, P. C., Mullington, J. M., Shih, S. C., Okada, H., Bodyak, N., Kang, P. M., Toltl, L., Belikoff, B., Buras, J., Simms, B. T., Mizgerd, J. P., Carmeliet, P., Karumanchi, S. A. and Aird, W. C. : Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J. Exp. Med.* **203**, 1447 (2006).
- 37) Gao, T., Lin, Z. and Jin, X. : Hydrocortisone suppression of the expression of VEGF may relate to toll-like receptor (TLR) 2 and 4. *Curr. Eye Res.* **34**, 777 (2009).
- 38) Carvalho, L. A., Torre, J. P., Papadopoulos, A. S., Poon, L., Juruena, M. F., Markopoulou, K., Cleare, A. J. and Pariante, C. M. : Lack of clinical therapeutic benefit of antidepressants is associated overall activation of the inflammatory system. *J. Affect Disord.* **148**, 136 (2013).
- 39) Perreault, M. and Marette, A. : Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* **7**, 1138 (2001).
- 40) Radomski, M. W., Palmer, R. M. J. and Moncada, S. : Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 10043 (1990).