

## Hepa1c1c-7 Cell에서 리포폴리사카라이드로 유도된 염증성 매개인자 생산에 있어서 코르티코스테론 전처리 효과

채 병 숙<sup>#</sup>

우석대학교 약학대학 약학과

(Received October 5, 2015; Revised December 1, 2015; Accepted December 1, 2015)

### Effect of Corticosterone Pretreatment on the Production of LPS-Induced Inflammatory Mediators in Hepa1c1c-7 Cells

Byeong Suk Chae<sup>#</sup>

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

**Abstract** — Endotoxemia induces production of inflammatory mediators and acute phase proteins, leading to multiorgan injury and systemic inflammation. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation and glucocorticoids (GCs) release modify endotoxemia-induced inflammatory responses. In the present study, we investigated whether pre-exposure of GCs influences endotoxin-induced production of inflammatory mediators in hepatocytes. Hepa1c1c-7 cells were pretreated with low concentrations of corticosterone for 24 h and then cultured without corticosterone in the presence or absence of LPS. Our results demonstrated that LPS alone significantly enhanced production of IL-6 and CRP but reduced vascular endothelial growth factor (VEGF) compared to controls. Combination of corticosterone pretreatment and LPS significantly upregulated production of IL-6, IL-1 $\beta$ , and VEGF but downregulated CRP compared to those in LPS alone. These findings suggest that in low concentration of corticosterone-preexposed hepatocytes, endotoxemia may induce upregulation of IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF and but downregulation of CRP.

**Keywords** □ corticosterone, IL-6, IL-1 $\beta$ , CRP, VEGF, endotoxin, hepatocyte

Endotoxemia는 전신의 면역경로 활성화 및 그로 인한 proinflammatory cytokines, prostanoids 및 acute phase proteins (APPs) 생산증가를 유도하여 acute phase responses(APRs)를 일으키며 과도한 염증, 장기의 손상, septic shock 및 죽음까지도 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 간은 당과 지질 대사의 조절뿐만 아니라 염증과 항상성에 관여하는 비염증성 장기인데, endotoxemia에 의해 유발되는 간의 손상 및 기능 이상은 인슐린 저항성 및 동맥경화와 그에 따른 제 2형 당뇨병 및 심혈관계 질환에 대한 위험성을 높인다.<sup>3,4)</sup> Endotoxin으로 유도되는 monocyte, macrophage 및 kupffer cell 등의 활성화는 TNF- $\alpha$ ,

IL-6 및 IL-1 $\beta$  등 proinflammatory cytokine 및 nitric oxide (NO) 등의 생산을 증가시킴으로써 전신성 염증은 물론 직간접적으로 간의 염증 및 간의 손상에 중요한 역할을 한다.<sup>2,4)</sup> 또한 endotoxin은 hepatocyte에서 TNF- $\alpha$  및 IL-6 등을 포함한 proinflammatory cytokine, NO 및 APPs 등의 생산을 증가시킴으로서 간의 손상을 유도하며 APRs 유발에 관여한다.<sup>5)</sup>

시상하부-뇌하수체-부신(hypothalamic-pituitary-adrenal: HPA) 축의 활성화 및 그에 따라 생산되는 GCs은 endotoxemia를 포함한 여러 스트레스 하에서 항상성 유지 역할을 하며 염증성 cytokine 생성이나 반응에 변화를 일으킨다.<sup>6)</sup> Endotoxin은 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 와 같은 proinflammatory cytokine 생산을 유도하여 HPA 축의 활성화 및 GCs 생산을 증가시킨다.<sup>7)</sup> GCs는 약리학적 고농도에서 강력한 항염증효과 및 endotoxin으로 인한 치사에 대하여 저항성을 증가시켜 endotoxemia 및 sepsis 치료 목적으로 사용되고 있다.<sup>8,9)</sup> 급성염증에 의한 간기능 저하 시 HPA 축의 활성화 및 그에 따른 GCs 생산은 endotoxin의 염증

**#Corresponding Author**

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

반응으로부터 보호작용을 갖는 hepatic IL-10 생산을 증가시켰으며, endotoxic shock 등의 예방에 중요한 역할을 한다고 보고되었다.<sup>10)</sup>

그런데 endotoxin에 의해 유발되는 간의 손상 및 APRs 유발에 있어서 GCs가 관여하는 것으로 나타났다. HPA 축 활성화와 GCs 혈중농도 상승은 지방간 등 간질환을 악화시켰고,<sup>11,12)</sup> 간세포에서 IL-6와 GCs와의 협동작용이 CRP 생산을 자극하였다.<sup>5)</sup> IL-6 및 IL-1 $\beta$ 는 간에서 CRP의 생산을 자극하는데,<sup>13,14)</sup> GCs와 시너지효과를 가져 혈중 CRP가 증가되는 것으로 나타났다.<sup>15,16)</sup> 또한 분리된 흰쥐의 간의 *in situ*에서 정신적 스트레스로 유도될 수 있는 corticosterone 저수준 농도와 LPS를 함께 관류주사 시 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생산이 증가되었으나 간에서 분리된 kupffer cell에서는 오히려 corticosterone이 LPS로 유도되는 cytokine 생산을 저하시켰다.<sup>17)</sup>

이렇듯 endotoxin에 의한 간에서의 손상 및 염증반응에 있어서 GCs 또는 HPA 축 활성화의 영향은 불확실하게 남아있다. 더구나 환경적 스트레스에 의해 증가되는 위장관 투과성 증가는 내인성 GCs에 의해 매개되는데,<sup>18)</sup> 스트레스 상태에서 혈중 GCs의 증가가 장의 투과성을 높이고 문맥을 통해 간에 도달되는 endotoxin의 양을 증가시킬 수 있기 때문에 endotoxin로 인한 간세포의 자극에 의해 유발되는 염증반응과 스트레스 관련 GCs 간의 상호작용의 규명은 매우 중요하다. 따라서 본 연구는 hep1c1c-7 cell에서 저수준의 다양한 농도의 corticosterone 전처리가 endotoxin으로 유도되는 간세포의 염증반응 및 APRs 등과 관련된 IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF 및 CRP 등의 생산에 미치는 영향에 대하여 실험을 실시하였다.

## 실험 방법

### 재료 및 시약

Hepa1c1c-7 cell는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구매를 했으며, 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  $\mu$ g/ml(Invitrogen) 및 antimycotic Amphotericin B(Invitrogen)를 함유한 DMEM 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 Hepa1c1c-7 cell( $1 \times 10^6$  cells/well)을 각각 24 well plate에 분주하고, corticosterone 50 and 200 ng/ml 농도별로 24 hr 전처리 한 후 신선한 배지로 교체한 다음 LPS 10  $\mu$ g/ml로 자극 부재 또는 존재 하에서 24 및 48 hr 동안 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C로 배양하였으며 그 후 세포배양액을 채취하여 IL-6, IL-1 $\beta$ , VEGF 및 CRP 측정을 위해 -70°C에 보관하였다.

### Cytokine의 측정

Hepa1c1c-7 cell의 보관된 세포배양액 중 IL-6 및 IL-1 $\beta$  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 m<sup>2</sup>당 picogram 단위에서 정량하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

### VEGF 측정

Hepa1c1c-7 cell로부터 얻어진 세포배양액 중 VEGF 농도 측정은 VEGF monoclonal antibodies(BD Biosciences Pharmingen, U.S.A.)를 이용하여 ELISA 방법으로 실시되었고, manufacturer's instruction에 따라 ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 결과는 m<sup>2</sup>당 picogram 단위에서 정량을 하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

### CRP 측정

Hepa1c1c-7 cell로부터 얻어진 세포배양액 중 CRP 농도 측정은 CRP ELISA kit(R&D)를 이용하여 ELISA 방법으로 실시되었고, manufacturer's instruction에 따라 ELISA microplate reader(Molecular Devices Co., Ltd., U.S.A.)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 결과는 m<sup>2</sup>당 picogram 단위에서 정량을 하였으며 최저농도의 한계는 5 pg/ml 이상으로 하였다.

### 통계학적 분석

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

## 실험 결과 및 고찰

### Hepa1c1c-7 cell에서 LPS에 의해 유도된 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 생산에 있어서 corticosterone 전처리 효과

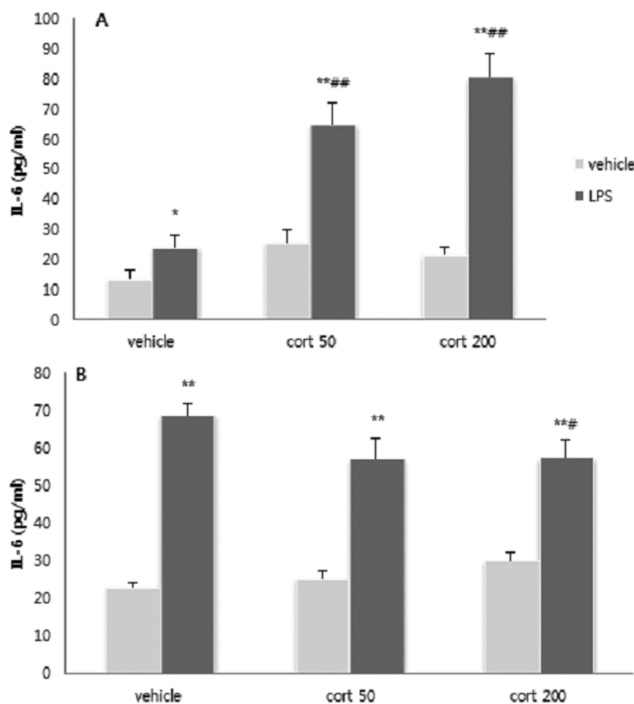
Endotoxin의 자극에 의해 hepatocyte에서 과량 생산되는 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 는 간의 염증을 촉진하고 CRP 생산을 유도하며 간의 기능상실 및 재생능력 저하를 가져오며 전신성 염증유발에도 관여한다.<sup>19-21)</sup> Endotoxin 처리한 hepatocyte에서 p-p38MAPK, TLR4, NF- $\kappa$ B, IL-6 및 IL-1 $\beta$  등의 발현 증가, NO 생산 증가 및 IL-6에 의한 APPs 생산 증가 등이 유도되어 전신성 염증 및 간염증에 관여하였고,<sup>5)</sup> TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 생산 억제제는 endotoxin으로 유도되는 간손상에 대한 보호효과를 가졌다.<sup>22)</sup> 또한 흰쥐에서 LPS 복강주사가 혈중 IL-6의 반응 및 APPs를 유도하였고

hepatocyte에서 IL-6 receptor mRNA 발현도 증가하였다.<sup>23)</sup>

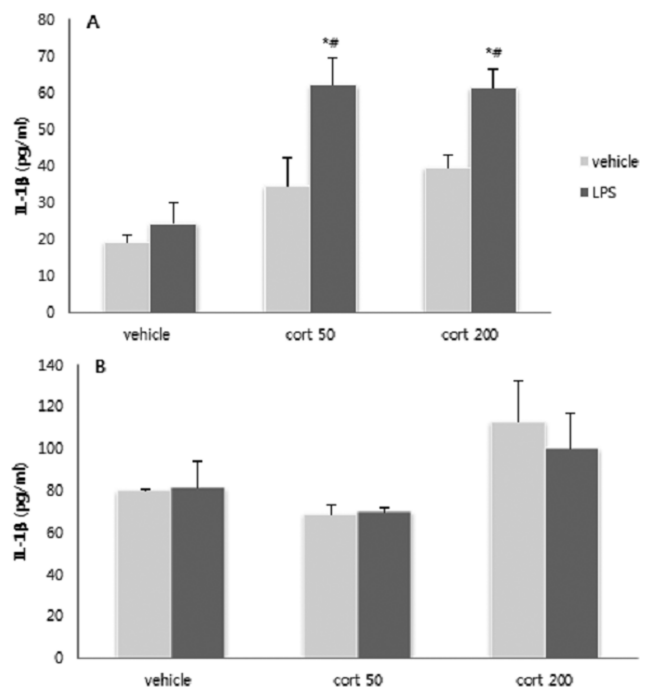
그런데 endotoxemia와 같은 스트레스로 인한 HPA 축의 활성화와 그에 따른 GCs의 혈중농도 상승은 간세포에서 endotoxin에 의한 proinflammatory cytokine 생산에 변화를 가져왔다. IL-6는 LPS로 유도된 HPA 축 활성화에 중추적 역할을 하는데,<sup>24)</sup> 부동화 스트레스를 가한 생쥐에서 LPS 복강주사는 혈중 IL-6 농도 및 간의 IL-6 mRNA 유전자 발현이 증가되었고 특히 hepatocyte에서의 IL-6 생산을 증가하였다.<sup>25)</sup> 또한 흰쥐에 rIL-6 또는 dexamethasone를 복강주사 시 둘 다에서 hepatocyte IL-6R mRNA 발현이 유의성 있게 증가되었다.<sup>23)</sup> 이는 GCs가 hepatocyte에서 IL-6 작용을 더욱 높일 수 있음을 시사한다. 또한 IL-1 $\beta$  유전자는 사회적 스트레스 상태에서 endotoxic shock에 의한 간괴사 시 높게 발현되었는데,<sup>26)</sup> 이는 스트레스에 의해 유발된 GCs가 endotoxin으로 인해 생산된 IL-1 $\beta$ 와 상호작용을 가져 간손상을 더욱 악화시킬 수 있음을 보이고 있다. 또한 Liao 등 (1995)<sup>17)</sup>에 따르면, 분리된 흰쥐의 간의 *in situ*에서 corticosterone

저수준 농도(35~350 ng/ml)와 LPS를 함께 관류주사 시 IL-6 및 TNF- $\alpha$  생산을 증가하였으나 간에서 분리된 kupffer cell에서는 오히려 corticosterone이 LPS로 유도되는 cytokine 생산을 저하시켰다. 이는 hepatocyte에서 corticosterone과 endotoxin이 작용하여 proinflammatory cytokine 생산이 증가되었을 가능성이 높다. 따라서 본 연구에서 LPS에 의해 자극된 hepatocyte에서 corticosterone 전처리시 IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산에 미치는 영향을 알아보았다.

본 연구 결과(Fig. 1 및 Fig. 2), Hepa1c1c-7 cell에서 LPS는 IL-6를 유의성 있게 증가시켰으며 IL-1 $\beta$ 는 약간 상승시켰으나 유의성은 없었다. 이는 HepG 2 cell에서 LPS에 의해 IL-6 생산을 증가하였으나 IL-1 $\beta$ 에는 영향을 주지 못했다는 Panesar 등 (1999)<sup>27)</sup>의 보고와 일치함을 보여주고 있다. Corticosterone 전처리는 50 및 200 ng/ml 농도 둘 다에서 LPS 24 hr으로 자극된 Hepa1c1c-7 cell에서 생산된 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 를 현저히 증가시켰으나, 48 hr 동안 LPS 처리시 corticosterone 200 ng/ml 전처리에서 LPS에 의해 증가된 IL-6의 생산을 유의성 있게 약간



**Fig. 1** – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of IL-6 in Hepa1c1c-7 cells. Hepa1c1c-7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone (cort 50: 50 ng/ml of corticosterone; cort 200: 200 ng/ml of corticosterone) for 24 h and then cultured with refreshed medium for 24 h (A) or 48 h (B) in the presence or absence of LPS. Concentrations of cytokines were measured using ELISA. Each value represents the mean $\pm$ S.E. \* ( $p < 0.05$ ) and \*\* ( $p < 0.01$ ): Significantly different from the value in each LPS negative control. # ( $p < 0.05$ ) and ## ( $p < 0.01$ ): Significantly different from the value in LPS positive controls.

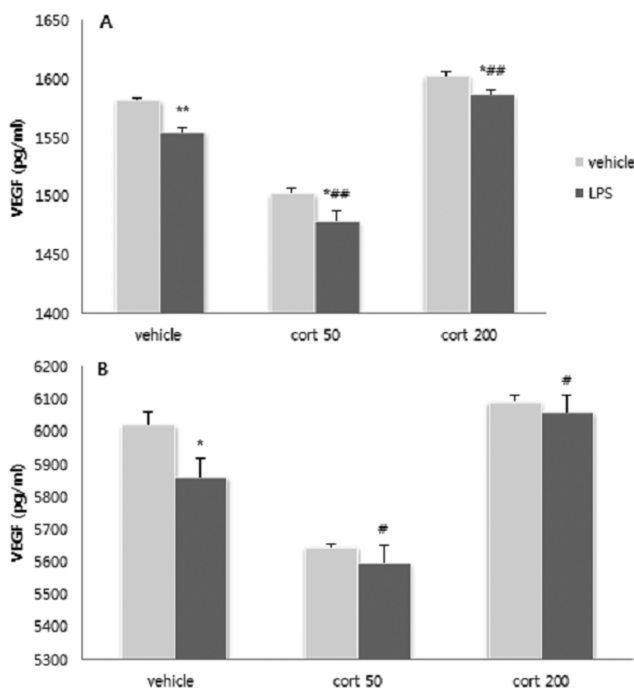


**Fig. 2** – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of IL-1 $\beta$  in Hepa1c1c-7 cells. Hepa1c1c-7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone (cort 50: 50 ng/ml of corticosterone; cort 200: 200 ng/ml of corticosterone) for 24 h and then cultured with refreshed medium for 24 h (A) or 48 h (B) in the presence or absence of LPS. 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 each LPS negative control. # ( $p < 0.05$ ): Significantly different from the value in LPS positive controls.

억제시켰다(Fig. 1B). 따라서 본 연구결과 corticosterone에 미리 노출된 hepatocyte는 미리 노출되지 않은 경우에 비해서 LPS에 의해 자극된 IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산을 반응 초기에 증가시킬 것으로 사료된다.

#### Hepa1c1c-7 cell에서 LPS에 의해 억제된 VEGF 생산에 미치는 corticosterone 전처리 효과

VEGF는 angiogenic factor 및 혈관투과성 인자로서 작용하여 상처치유 복구시스템 및 간의 재생능력에 관여한다.<sup>28,29</sup> GCs는 VEGF의 발현 억제작용을 가지며,<sup>30</sup> cortisol이 높은 경향이 있는 우울증 환자에서 낮은 VEGF 혈중농도가 관찰되었는데,<sup>31</sup> 이는 만성 스트레스와 관련된 농도의 GCs가 VEGF 발현을 억제하여 간의 재생능력 저하효과를 지닐 수 있음을 시사하고 있다. Hepatocyte에서 endotoxin은 apoptosis와 proinflammatory cytokine 생산을 통해 간의 염증 및 심한 손상을 유도하는데,<sup>32</sup> LPS에 의해 유도되는 간손상과 VEGF 발현과의 상관성 및 그에 대한 GCs의 영향에 대해서는 불명확하다.



**Fig. 3** – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-reduced production of VEGF in Hepa1c1c-7 cells. Hepa1c1c-7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone (cort 50: 50 ng/ml of corticosterone; cort 200: 200 ng/ml of corticosterone) for 24 h and then cultured with refreshed medium for 24 h (A) or 48 h (B) in the presence or absence of LPS. Each value represents the mean $\pm$ 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 each LPS negative control. # ( $p < 0.05$ ) and ## ( $p < 0.01$ ): Significantly different from the value in LPS positive controls.

본 연구는 Hepa1c1c-7 cell에서 낮은 농도의 corticosterone 전처리가 LPS 자극 시 생산된 VEGF 농도에 미치는 영향을 알아 보았다. 그 결과 Hepa1c1c-7 cell에서 LPS는 24 hr 및 48 hr 세포 배양 시 VEGF 생산을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3). 이는 간의 손상을 유발하는 LPS가 hepatocyte에서 VEGF 생산을 억제하여 간의 재생능력 저하효과를 지닐 것으로 보인다. 그런데 LPS에 의해 억제된 VEGF 생산을 corticosterone 50 ng/ml 전처리가 유의성 있게 더욱 억제시켰으나 corticosterone 200 ng/ml 전처리 는 LPS에 의해 억제된 VEGF 생산을 대조군의 수준으로 회복시 킴을 보여주었다. 이는 GCs가 VEGF 생산을 억제적으로 작용하여 endotoxin에 의해 억제된 hepatocyte의 VEGF 생산을 더욱 억제시켜 간재생능력이 더욱 저하될 가능성을 지나나 corticosterone 200 ng/ml 전처리는 LPS에 의해 억제된 VEGF 생산을 정상수준으로 높여서 간재생능력을 회복시킬 수 있음을 보여주고 있어 hepatocyte에서의 VEGF 생산은 corticosterone 일정농도 이상에서 유도될 것으로 사료된다. 따라서 hepatocyte에서 LPS에 의해 유도된 VEGF 생산이 corticosterone 전처리 농도에 따라 상반된 결과를 보인 것에 대한 명확한 기전규명 연구가 요구된다.

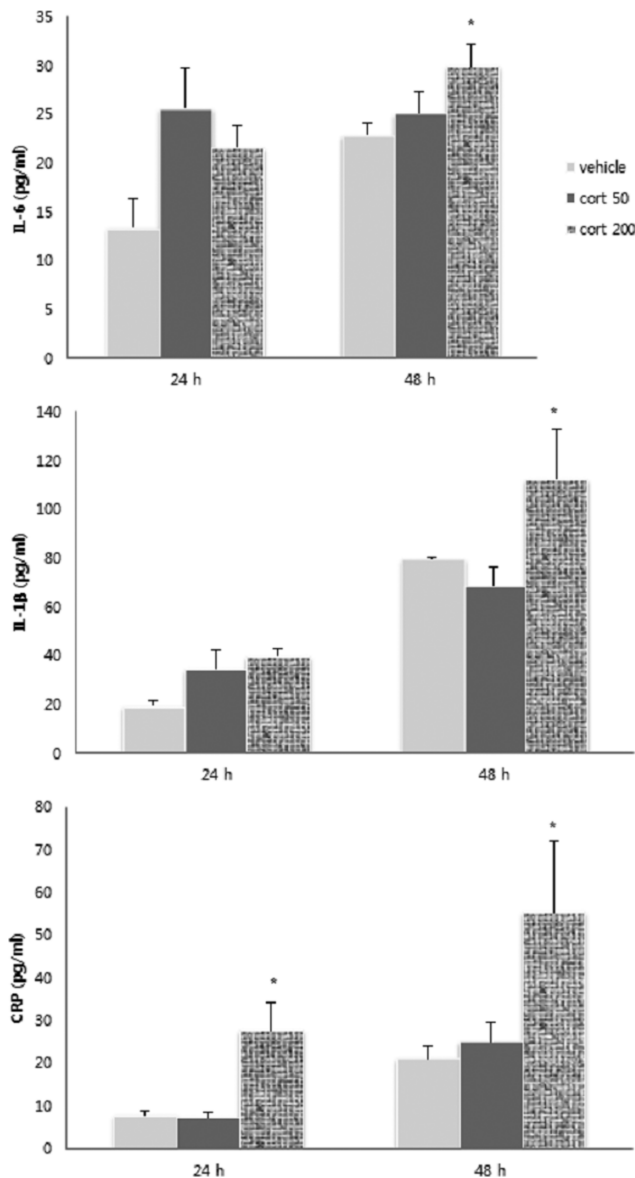
#### Hepa1c1c-7 cell에서 proinflammatory cytokine 및 CRP 생산에 있어서 corticosterone 효과

간세포에서 CRP 발현은 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 에 대한 반응으로 나타 나는데,<sup>13</sup> IL-1 $\beta$ 는 NF- $\kappa$ B 의존적인 IL-6의 유도에 의하여 CRP 합성을 자극하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>33</sup> Weinhold 및 R  ther(1997)<sup>34</sup>에 의하면 hepatocyte에서 IL-6에 의존적인 것은 물론 비의존적으로 IL-1 $\beta$ , oncostatin M 또는 leukaemia inhibitory factor 등에 의해서도 CRP이 유도된다고 보고하였다. GCs 치료가 지방간과 같은 간 손상 및 대사증후군 등을 유발하 였고,<sup>35</sup> 간세포에서 GCs는 IL-6와 서로 협동적으로 작용하여 CRP 생산을 자극하는 것으로 관찰되었으며 CRP 합성은 특히 proinflammatory cytokine와 hormone과의 복잡한 상호작용에 의 지하였다.<sup>15</sup>

본 연구는 LPS 처리 없이 hepatocyte에서 GCs가 IL-6, IL-1 $\beta$  및 CRP 생산에 미치는 영향을 알아보았다. 본 연구결과는 Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, Hepa1c1c-7 cell에서 corticosterone 전처리가 IL-6, IL-1 $\beta$  및 CRP 생산을 유의성 있게 증가시켰다. 따라서 corticosterone에 미리 노출된 간세포에서 IL-6, IL-1 $\beta$  및 CRP의 생산을 증가시켰는데 이는 corticosterone과 IL-6 및 IL-1 $\beta$ 가 서로 협동적으로 작용하여 CRP 생산을 증가시킬 것으로 사료된다.

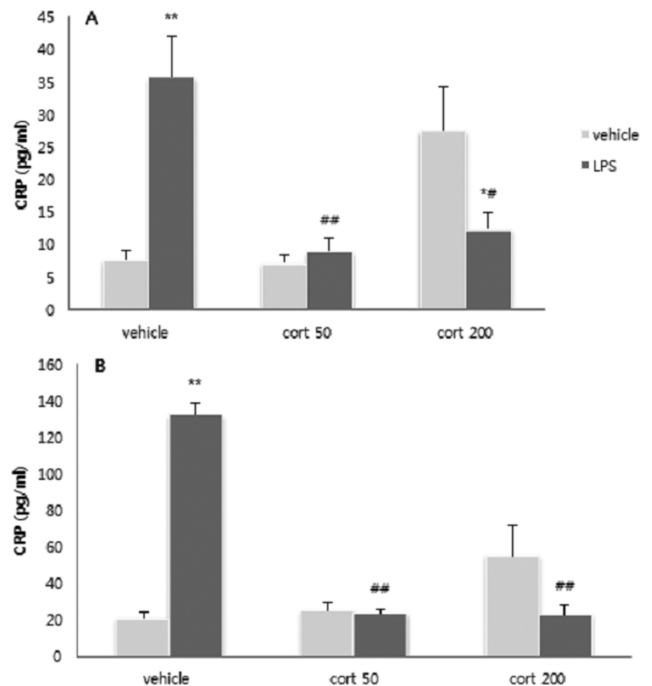
#### Hepa1c1c-7 cell에서 LPS에 의해 증가된 CRP 생산에 있어서 corticosterone 전처리 효과

CRP는 감염, 염증 및 조직손상에 대한 비특이적 반응으로



**Fig. 4** – Effect of corticosterone pretreatment on the production of inflammatory mediators in Hepa1c1c-7 cells. Hepa1c1c-7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone (cort 50: 50 ng/ml of corticosterone; cort 200: 200 ng/ml of corticosterone) for 24 h and then cultured with refreshed medium for 24 h or 48 h in the absence of LPS. 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.

hepatocyte에서 생산되는 APPs이며 급성염증의 출현과 함께 빠르게 급격하게 증가하지만 그 원인이 제거되면 또한 빠르게 감소하는 중요한 염증성 마커이다.<sup>36,37</sup> Endotoxemia에서 CRP의 높은 혈중농도는 스트레스와 동맥경화 및 심혈관계질환을 연결하는 중요한 매개자로서 전신성 염증반응은 물론 간손상 유발과도 유관하다.<sup>5,38</sup> Hepatocyte에서 endotoxin에 의한 CRP의 발현



**Fig. 5** – Effect of corticosterone pretreatment on the LPS-induced production of CRP in Hepa1c1c-7 cells. Hepa1c1c-7 cells were preincubated with various concentration of corticosterone (cort 50: 50 ng/ml of corticosterone; cort 200: 200 ng/ml of corticosterone) for 24 h and then cultured with refreshed medium for 24 h (A) or 48 h (B) in the presence or absence of LPS. 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 each LPS negative control. # ( $p < 0.05$ ) and ## ( $p < 0.01$ ): Significantly different from the value in LPS positive controls.

은 IL-6에 의한 직접적 반응으로 나타나며,<sup>15</sup> IL-1β는 NF-κB의존적인 IL-6의 유도에 의한 CRP 합성을 자극한다고 하였다.<sup>33</sup>

본 연구에서 corticosterone에 미리 노출된 간세포가 IL-6, IL-1β 및 CRP의 생산을 높일 수 있음을 보여주었는데(Fig. 4), 복잡한 염증성 매개자들을 생산하는 LPS에 의한 CRP 생산에 있어서 GCs의 전처리의 영향에 대해서는 불확실하므로 이를 알아보았다. 흥미롭게도, 본 연구 결과에서 Hepa1c1c-7 cell에서 LPS를 24 hr 및 48 hr 처리 시 CRP 생산이 유의성 있게 증가되었으나 corticosterone 50 및 200 ng/ml 전처리로 인하여 LPS로 유도된 CRP 생산이 현저히 억제됨이 관찰되었다(Fig. 5). Lu 등 (2015)<sup>39</sup>에 의하면 GCs는 sepsis 마우스 모델에서 CRP를 억제 하였고 심근손상으로부터 보호효과를 가졌다고 보고하였는데, 이는 GCs가 sepsis의 복잡한 염증성 인자들의 생산에 변화를 유도할 수 있음을 보여준다. 또한 Swain 등(1999)<sup>10</sup>은 급성염증에 의한 간기능 저하 시 HPA 축의 활성화 및 그에 따른 GCs 생산은 endotoxin의 염증반응으로부터 보호작용을 갖는 hepatic IL-10 생산을 증가시켰으며, endotoxic shock 등의 예방에 중요한

역할을 한다고 보고하였는데, 이는 염증에 의한 간기능 저하 상태에서 GCs가 항염증효과를 갖는 IL-10 생성을 높였음을 보여준다. 따라서 본 연구에서 hepatocyte에서 IL-6, IL-1 $\beta$  및 CRP의 생산을 증가시키는 corticosterone 전처리가 LPS와 함께 투여 시 IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산은 증가시켰지만 CRP의 생산은 억제적으로 작용함을 보여주었는데, 이는 LPS와 GCs의 상호작용에 의하여 CRP 생산을 억제하는 매개자의 생산을 높였을 가능성을 지니며 이에 대한 명확한 기전 연구가 더욱 요구된다.

## 결 론

본 연구는 Hepa1c1c-7 cell에서 저농도 corticosterone 전처리가 LPS 자극으로 유도되는 염증성 매개인자들의 생산에 미치는 영향에 대하여 실험을 실시하였다. 그 결과 Hepa1c1c-7 cell에서 LPS는 IL-6, IL-1 $\beta$  및 CRP 생산을 유의성 있게 유도하였으나 VEGF 생산은 억제하였는데, LPS로 자극된 Hepa1c1c-7 cell에서 corticosterone 전처리는 IL-6, IL-1 $\beta$  및 VEGF 생산을 유의성 있게 더욱 증가시켰으나 CRP 생산은 오히려 억제하였다. 결론적으로 저농도의 corticosterone에 노출된 hepatocyte는 endotoxin으로 유도되는 IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산을 더욱 증가시키나 LPS로 유도된 CRP 생산은 오히려 저하시키는 상호작용을 가질 것이다.

## References

- 1) Johnson, H. L., Chiou, C. C. and Cho, C. T. : Applications of acute phase reactants in infectious diseases. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **32**, 73 (1999).
- 2) Morrison, D. C. and Ryan, J. L. : Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv. Immunol.* **28**, 293 (1979).
- 3) Wiernsperger, N. : Hepatic function and the cardiometabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **10**, 379 (2013).
- 4) Toth, C. A. and Thomas, P. : Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* **16**, 255 (1992).
- 5) Saad, B., Frei, K., Schol, F. A., Fontana, A. and Maier, P. : Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alpha mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **229**, 349 (1995).
- 6) Beishuizen, A. and Thijis, L. G. : Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Endotoxin Res.* **9**, 3 (2003).
- 7) Turnbull, A. V. and Rivier, C. L. : Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* **70**, 1 (1999).
- 8) Kasahara, E., Sekiyama, A., Hori, M., Kuratsune, D., Fujisawa, N., Chida, D., Hiramoto, K., Li, J., Okamura, H., Inoue, M. and Kitagawa, S. : Stress-induced glucocorticoid release upregulates uncoupling protein-2 expression and enhances resistance to endotoxin-induced lethality. *Neuroimmunomodulation* **22**, 279 (2015).
- 9) 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).
- 10) Swain, M. G., Appleyard, C., Wallace, J., Wong, H. and Le, T. : Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis and release. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **276**, G199 (1999).
- 11) Chida, Y., Sudo, N. and Kubo, C. : Does stress exacerbate liver diseases? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**(1 Pt 2), 202 (2006).
- 12) Shibli-Rahhal, A., Van Beek, M. and Schlechte, J. A. : Cushing's syndrome. *Clin. Dermatol.* **24**, 260 (2006).
- 13) Prowse, K. R. and Baumann, H. : Interleukin-1 and interleukin-6 stimulate acute-phase protein production in primary mouse hepatocytes. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 55 (1989).
- 14) Ganapathi, M. K., May, L. T., Schultz, D., Brabenec, A., Weinstein, J., Sehgal, P. B. and Kushner, I. : Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 271 (1988).
- 15) 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).
- 16) Ganapathi, M. K., Rzewnicki, D., Samols, D., Jiang, S. L. and Kushner, I. : Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells. *J. Immunol.* **147**, 1261 (1991).
- 17) Liao, J., Keiser, J. A., Scales, W. E., Kunkel, S. L. and Kluger, M. J. : Role of corticosterone in TNF and IL-6 production in isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* **268**(3 Pt 2), R699 (1995).
- 18) Meddings, J. B. and Swain, M. G. : Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* **119**, 1019 (2000).
- 19) Ramadori, G. and Armbrust, T. : Cytokines in the liver. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 777 (2001).
- 20) Gong, X. W., Yang, Q. H., Yan, H. Z., Zhang, Y. P., Liang, Y. J., Liu, Y. Z., Zhang, J.-W., Lin, C. M., Jin, X., Zimmers, T. A., Perez, E. A., Pierce, R. H., Zhang, Z. and Koniaris, L. G. : Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* **43**, 474 (2006).
- 21) Wustefeld, T., Rakemann, T., Kubicka, S., Manns, M. P. and Trautwein, C. : Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* **32**, 514 (2000).

- 22) Li, X., Wang, Z., Zou, Y., Lu, E., Duan, J., Yang, H., Wu, Q., Zhao, X., Wang, Y., You, L., He, L., Xi, T. and Yang, Y. : Pretreatment with lipopolysaccharide attenuates diethylnitrosamine-caused liver injury in mice via TLR4-dependent induction of Kupffer cell M2 polarization. *Immunol. Res.* **62**, 137 (2015).
- 23) Geisterfer, M., Richards, C., Baumann, M., Fey, G., Gwynne, D. and Gauldie, J. : Regulation of IL-6 and the hepatic IL-6 receptor in acute inflammation *in vivo*. *Cytokine* **5**, 1 (1993).
- 24) 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).
- 25) Kitamura, H., Konno, A., Morimatsu, M., Jung, B. D., Kimura, K. and Saito, M. : Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 707 (1997).
- 26) Quan, N., Avitsur, R., Stark, J. L., He, L., Shah, M., Caligiuri, M., Padgett, D. A., Marucha, P. T. and Sheridan, J. F. : Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *J. Neuroimmunol.* **115**, 36 (2001).
- 27) Panesar, N., Tolman, K. and Mazuski, J. E. : Endotoxin stimulates hepatocyte interleukin-6 production. *J. Surg. Res.* **85**, 251 (1999).
- 28) Shimizu, H., Miyazaki, M., Wakabayashi, Y., Mitsuhashi, N., Kato, A., Ito, H., Nakagawa, K., Yoshidome, H., Kataoka, M. and Nakajima, N. : Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J. Hepatol.* **34**, 683 (2001).
- 29) Walter, T. J., Cast, A. E., Huppert, K. A. and Huppert, S. S. : Epithelial VEGF signaling is required in the mouse liver for proper sinusoid endothelial cell identity and hepatocyte zonation *in vivo*. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G849 (2014).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) Zong, L., Yu, Q. H., Du, Y. X. and Deng, X. M. : Edaravone protects endotoxin-induced liver injury by inhibiting apoptosis and reducing proinflammatory cytokines. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **47**, 231 (2014).
- 33) Kramer, F., Torzewski, J., Kamenz, J., Veit, K., Hombach, V., Dedio, J. and Ivashchenko, Y. : Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol. Immunol.* **45**, 2678 (2008).
- 34) Weinhold, B. and R  ther, U. : Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene. *Biochem. J.* **327**, 425 (1997).
- 35) Woods, C. P., Hazlehurst, J. M. and Tomlinson, J. W. : Glucocorticoids and non-alcoholic fatty liver disease. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **154**, 94 (2015).
- 36) Hribal, M. L., Fiorentino, T. V. and Sesti, G. : Role of C Reactive Protein (CRP) in leptin resistance. *Curr. Pharm.* **20**, 609 (2014).
- 37) Dupuy, A. M., Terrier, N., S  n  cal, L., Morena, M., Leray, H., Canaud, B. and Cristol, J. P. : Is C-reactive protein a marker of inflammation? *Nephrologie* **24**, 337 (2003).
- 38) Xu, W., Chen, B., Guo, L., Li, Z., Zhao, Y. and Zeng, H. : High-sensitivity CRP: possible link between job stress and atherosclerosis. *Am. J. Ind. Med.* **58**, 773 (2015).
- 39) Lu, Z. Q., Lu, J. X. and Deng, Y. J. : Glucocorticoids offer protection against myocardial injury in a murine model of sepsis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 12211 (2015).