

Original Article

급성 장염 모델 개발을 위한 LPS 투여 농도 설정 연구: pilot study

김대용#, 변세현, 김미혜\*

우석대학교 한의과대학

Establishment of LPS-induced intestinal inflammation mice model: pilot study

Dae Yong Kim#, Sehyeon Byeon, Mi Hye Kim\*

College of Korean Medicine, Woosuk University, Jeonju 54986, Republic of Korea

**Objectives:** Lipopolysaccharide (LPS), an outer membrane constituent of gram-negative bacteria, plays a vital role on initiation of systemic inflammatory response. This study aimed to optimize the intestinal inflammation mouse model by injecting different doses of LPS.

**Methods:** The experimental mice were induced by the intraperitoneal administration of 5, 10 and 20 mg/kg of LPS. After 12 hours, disease activity index (DAI) was evaluated by 2 different researchers with blinded test. Then, serum and colon tissues were obtained after sacrifice. Hematoxylin and eosin staining was performed to analyze the damage of intestinal tissues. Serum monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** Injection with the 5, 10 and 20 mg/kg of LPS resulted in the increases of DAI score with the changes of fetal status such as diarrhea and hematochezia. However, there was no dose-dependent changes according to the doses of LPS. In addition, the colon length was not changed depends on the doses of LPS. The histopathological grades including intestinal barrier disruption, inflammatory cell infiltration and shape of villi were significantly increased by LPS injection. Moreover, serum MCP-1 levels were markedly increased with the concentrations of LPS.

**Conclusion:** Taken together, LPS effectively induced the intestinal inflammation accompanied with the increment of serum chemokine and destruction of barrier.

**Key words :** Inflammatory bowel disease; Lipopolysaccharide; Intestinal barrier; MCP-1

# First author: Dae Yong Kim

College of Korean Medicine, Woosuk University, Jeonju 54986, Republic of Korea

Tel : +82-63-290-1555; FAX: +82-63-291-9312, E-mail: dykim@woosuk.ac.kr

\*Corresponding author: Mi Hye Kim

College of Korean Medicine, Woosuk University, Jeonju 54986, Republic of Korea

Tel : +82-63-290-1555; FAX: +82-63-291-9312, E-mail: kimmh526@woosuk.ac.kr

Received : 23 September 2024

Revised : 13 December 2024

Accepted : 27 December 2024

## Introduction

궤양성 대장염(ulcerative colitis)와 크론병(Crohn's Disease)를 포함하는 염증성 장질환(Inflammatory bowel diseases)은 소장이나 대장에 비정상적으로 염증 반응이 발생하는 질환으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 전 세계적으로 염증성 장질환을 앓고 있는 환자는 1천만 명 이상인 것으로 추정되며 국내에서도 30년 동안 지속적으로 발병률이 증가하였다<sup>2)</sup>. 염증성 장질환은 Microbiome과 같은 장내 면역 반응이 정상적으로 조절되지 않아서 발생하는 것으로 추정되고 있으며, 이로 인하여 복통, 설사, 혈변이 주증상으로 나타나며 지속될 경우 대장암으로까지 악화될 수 있다<sup>3)</sup>. 또한 증상이 지속적으로 반복되어 환자들의 신체적인 건강뿐만 아니라 정신적인 건강에도 심각한 영향을 미치기 때문에 공중보건 문제로 많은 주목을 받고 있다<sup>4)</sup>.

염증성 장질환 환자의 치료는 기존의 스테로이드 치료와 생물학적 치료를 병행하고 있다. 기존의 스테로이드를 활용한 치료는 독성, azathioprine에 의한 혈구 감소 등의 부작용이 발생할 수 있으며 스테로이드 의존성이 있는 환자에서는 사용이 불가능하다. 이로 인하여 Infliximab, adalimumab, golimumab과 같은 항종양괴사인자(anti-tumor necrosis factor, anti-TNF) 제제가 개발되어 궤양성 대장염 환자의 질병 경과를 개선시켰다<sup>5)</sup>. 또한 2023년 개정된 중등도 이상의 궤양성 대장염의 치료 지침서에서는 “보편적인 치료(5-아미노살리실산, 면역조절제, 스테로이드를 포함함)에 반응하지 않는 중등도-중증 궤양성 대장염 환자에서 관해 유도를 위하여 anti-TNF 제제 외에, vedolizumab, ustekinumab, 또는 tofacitinib 치료를 권고한다(권고 등급: 강함, 근거 수준: 높음)”와 같이 새로운 생물학 제제 및 소분자 약제에 대한 치료 권고문을 제시하였다<sup>6)</sup>. 그러나 생물학적 제제의 유효성과 안전성 간의 균형을 맞추는 것이 어려워, 환자에 맞추어 최적의 약물을 제시하는 것이 제한적이다. 생물학적 치료를 받은 환자 중 1/3 정도는 반응이 없다는 것 또한 염증성 장질환을 치료의 어려움을 반영하고 있다<sup>7)</sup>.

최근 이러한 현실에 맞추어 부작용을 최소화하고 대장염에 효과적인 물질을 개발하고자 하는 연구가 증가하고 있다<sup>8)</sup>. 무반응 혹은 부작용으로 인하여 통상적인 약물 치료에 실패한 환자는 대장절제술과 같은 수술요법을 받아야 하기 때문에 안전하고 잠재력 있는 치료제를 개발하는 것이 반드시 필요한 상황이다. Lipopolysaccharide (LPS)는 Gram-negative bacteria으로부터 생성된 glycolipid로서

면역 시스템을 자극하는 내독소로 잘 알려져 있다<sup>9)</sup>. LPS는 선천 면역과의 상호작용을 통하여 강력한 염증 반응을 유발할 수 있는데, 이를 기반으로 전세계 연구자들이 LPS가 장내 미생물(gut microbiota)을 조절하여 대장의 장벽 기능(gut epithelial barrier)을 손상시키도록 한 후 다양한 치료 소재를 투여하여 예방 또는 치료 효과를 확인하는데 사용하고 있다<sup>10)</sup>. 그러나 각 연구마다 투여하는 LPS의 농도와 시간 등 유도 조건이 달라서 전임상 동물 모델에서 효과적인 대장염 치료 소재를 개발하기가 어려운 것이 현실이다. 또한 LPS의 투여 후 6시간 후 바로 쥐를 희생하는 연구가 많아서 생리활성 물질의 효능을 충분히 확인하기가 어려웠다

## Materials and Methods

## 1. 실험 동물

C57BL/6J 수컷 마우스(7주령)는 다물사이언스 사(Damool Science Co., Ltd., Daejeon, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 우석대학교 중화산캠퍼스 동물 실험실에서 7일간의 적응 기간을 거쳐 실험을 진행하였다. 물과 사료는 자유롭게 제공하였으며 12시간 간격으로 낮과 밤을 유지하면서 실내 온도( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 및 습도( $50 \pm 10\%$ )를 표준 환경으로 유지하였다. 모든 실험은 우석대학교의 동물실험 윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인 번호: WS-2024-02).

## 2. 대장염 유도 실험

실험에 사용된 마우스는 각 군별로 7마리씩 cage에 무작위로 배분하였다. 실험군은 다음과 같다; (1) 정상대조군 (0 mg/kg), (2) LPS5 (5 mg/kg), (3) LPS10 (10 mg/kg), (4) LPS20 (20 mg/kg). 정상대조군을 제외하고 농도별 LPS를 100 $\mu\text{L}$ 씩 복강주사하여 대장염을 유발하였다. 본 실험에서 사용된 LPS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 생리식염수에 녹였다. LPS를 주사한 후 12시간 후 마우스를 희생하였다. 혈액은 심장천자법으로 분리하였고, 이 후 대장 조직을 적출하였다.

## 3. DAI score 및 대장 길이 측정

마우스를 희생하기 바로 전, 마우스의 체중 변화, 변의 굳기, 혈변을 육안으로 확인하여 disease activity index (DAI) score를 측정하였다. 육안적 판단 기준은 다음과 같이 정리하였다(Table 1). 2명의 연구자가 이중맹검시험법을 통하여 DAI score를 객관적으로 측정하였다. 이후 항문

사진을 촬영하였다.

**Table 1.** Scoring of Disease Activity Index (DAI). DAI is the combined scores of weight loss, stool consistency and bleeding divided by 3.

Score	Weight Loss	Stool consistency	Occult rectal bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5%		
2	5-10%	Loose stools	Hemoccult
3	10-20%		
4	>20%	Diarrhea	Gross bleeding

4. 조직학적 분석(Histology)

분리된 대장 조직은 10% neutralized formalin (Sigma-Aldrich)에 담가 24시간 동안 고정하였다. Phosphate-buffered saline에 조직을 세척한 후 70% ethanol, 80% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol, 100% ethanol, xylene 순서대로 탈수하였다. Paraffin 포매 후 조직 section을 4 μm 두께로 연속 절편한 다음 hematoxylin and eosin solution으로 염색하였다. 염색한 슬라이드는 현미경으로 관찰하였으며, 대장 점막의 손상 정도는 histology scoring parameters에 따라 염증 세포의 침윤 정도, 대장 점막 조직의 궤양 등으로 평가하고 각 조직 slide 별로 점수화하였다(Table 2). 점수는 기존 연구를 참고로 기준을 세웠다(12). 조직 score는 Epithelial damage, Mucosa inflammation, Submucosal inflammation로 나눠 손상과 염증의 정도를 확인하였다. Epithelial damage는 조직의 crypt와 goblet cell의 손상 정도에 따라 0-5점으로 측정하였고, Mucosa inflammation, Submucosal inflammation는 점막 및 점막하층에 염증과 부종의 정도를 확인하여 0-3점으로 점수화하였다. 이후 각 슬라이드에 Epithelial damage, Mucosa inflammation, Submucosal inflammation 점수를 합산 후 평균을 내어 비교하였다.

**Table 2.** Criteria for histopathologic grading according to the Chiu's scoring system.

Score	Histopathologic finding
0	Normal mucosal villi
1	Development of a subepithelial space, usually at the tip of the villus, with capillary congestion
2	Extension of the subepithelial space with moderate lifting of the epithelial layer
3	Massive epithelial lifting down the sides of villi
4	Denuded villi with lamina propria, dilated capillaries exposed, increased cellularity of the lamina propria
5	Digestion and disintegration of the lamina propria; hemorrhage and ulceration

5. 혈청 분석(ELISA)

마우스로부터 분리된 혈액을 4°C, 4000 rpm 조건에서 15분 동안 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 내 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) 수준을 평가하기 위하여 BD OptEIA™ Mouse MCP-1 ELISA Set (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 측정하였다. 제조사에서 제공한 instruction manual을 따라서 실험하였다.

6. 통계처리

실험결과의 모든 분석은 각 그룹의 측정값을 평균±표준 오차(standard error of the mean; S.E.M.) 값으로 표시하였다. 통계적 분석은 Analysis of Variance (ANOVA)를 이용하여 Tukey's test를 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성을 인정하였다.

Results

1. LPS로 인한 DAI 변화 및 육안적 분석

마우스를 희생하기 바로 전, 마우스의 체중 변화와 변의 굳기, 혈변을 육안으로 판단하였다. 체중은 LPS 접종 전과 해부 전에 쥐의 몸무게를 측정하여 분석하였다. 체중의 차이가 없으면 0점, 1-5%는 1점, 5-10%는 2점, 10-20%는 3점, 20%이상이면 4점으로 적용하였다. 변의 굳기, 혈변을 육안으로 확인하였을 때 정상변은 0점, <40%의 묽기와 혈이 확인되면 2점, <70%의 변의 묽기와 혈이 확인되면 4점으로 적용하였고, 나온 점수를 전체 점수를 평균내어 통계 처리하였다. 정상군의 마우스가 체중 변화가 크지 않고 정상적인 변을 보이는 것과 달리 LPS를 투여하고 16시간 뒤 마우스는 무른 변 및 육안적인 혈변을 나타내었다(Fig. 1). 체중의 변화는 5 mg/kg LPS 투여군에서 9.9 ± 1.17%, 10 mg/kg LPS 투여군에서 6.1 ± 1.5%, 20 mg/kg LPS 투여군에서 6.5 ± 0.61%의 체중이 감소된 것을 확인할 수 있었다(Table 3). LPS를 주사한 모든 마우스에서 설사와 혈변이 심각하게 나타남을 육안적으로 확인하였다. 그러나 DAI score는 LPS 농도 5, 10, 20 mg/kg 투여에 따라 농도의존적인 증가를 보이지 않았다.

**Table 3.** Changes of body weight in mice.

LPS (mg/kg)	0	5	10	20
<b>Initial body weight (g)</b>	20.10 ± 0.14	20.4 ± 1.12	20.6 ± 0.2	20.5 ± 0.51
<b>Final body weight (g)</b>	20.41 ± 0.42	17.77 ± 0.55	19.20 ± 0.46	18.93 ± 0.47
<b>Weight loss (%)</b>	-0.31 ± 0.33	9.90 ± 1.17	6.10 ± 1.50	6.50 ± 0.61

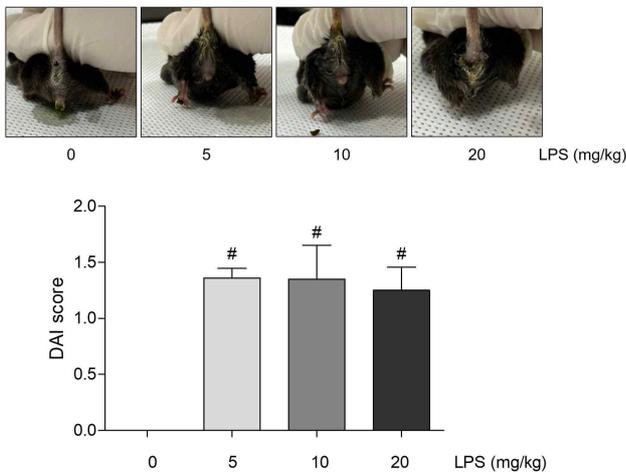


Fig. 1. Changes of Disease Activity Index (DAI) score. Morphological changes of fecal status in mice were photographed. The DAI score determined by 2 different researchers. Results are presented as mean ± standard error of the mean and Tukey's multiple comparison tests were used to determine the statistical significance. #p < 0.05 vs. saline-treated group.

2. LPS로 인한 대장 길이의 변화 분석

정상군의 대장 길이는 평균 6.96 ± 0.30 cm였다. 5 mg/kg LPS를 복강주사한 마우스의 대장 길이는 6.24 ± 0.26 cm였으며, 10 mg/kg LPS를 투여한 군에서는 6.3 ± 0.15 cm, 20 mg/kg LPS를 투여한 군에서는 7.5 ± 0.10 cm였다. 결과적으로 LPS를 투여한 모든 군에서 대장 길이는 정상군과 유의미한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2).

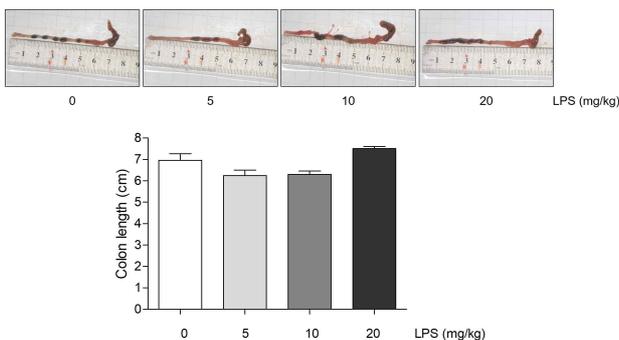


Fig. 2. Changes of length of colon tissues. Results are presented as mean ± standard error of the mean and Tukey's multiple comparison tests were used to determine the statistical significance. There was no significance between each group.

3. LPS로 인한 대장 조직의 손상도 분석

LPS 투여 농도에 따른 대장 조직의 손상은 Histology scoring parameters 기준에 따라 점막 및 점막하층, 결장의 손상 및 염증의 정도를 점수화한 뒤 합산하였고 평균화하

여 비교하였다. 정상 대조군과 비교하였을 때, LPS를 투여한 군에서는 결장 조직의 형태가 무너지고 염증으로 인하여 염증 세포가 침윤되었으며 대장 점막 조직이 손상되었다. LPS 5 mg/kg를 투여한 쥐에서는 gland necrosis가 나타났지만 염증 세포의 침윤은 다른 군에 비하여 상대적으로 덜 나타났다. LPS를 10 mg/kg 투여한 쥐는 대장점막 조직 손상이 뚜렷하게 나타났으며, 특히 LPS 20 mg/kg를 투여한 쥐의 장 조직에서는 cryptal gland의 감소 및 surface epithelium 손상이 관찰되고 점막 부분의 전반적인 염증세포의 침윤이 확인되었다. 결과적으로 LPS의 투여 농도에 따라 대장 조직의 손상이 유의적으로 심해지는 것을 확인하였다(Fig. 3).

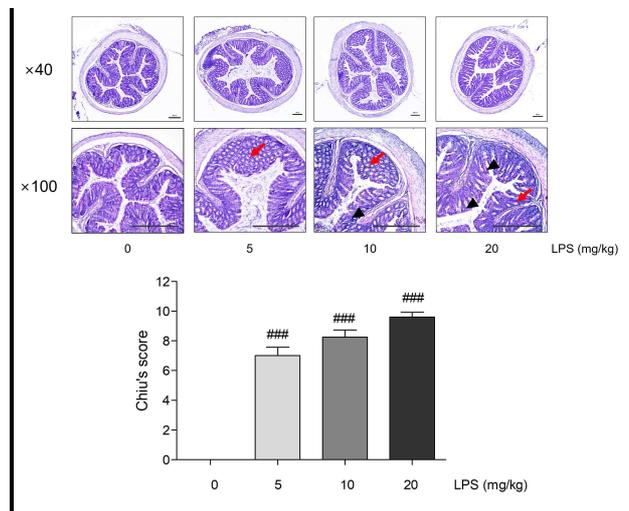


Fig. 3. Histopathologic changes of colon tissues according to the criteria of Chiu's scoring system. The magnification was 40× and 100×. Scale bar was 100 μ m. The point arrows indicate the damaged parts and inflammatory of the colon; grand necrosis (red arrows) and epithelial inflammation (black arrowheads). Results are presented as mean ± standard error of the mean and Tukey's multiple comparison tests were used to determine the statistical significance. #p < 0.05 and ###p < 0.01 vs. saline-treated group.

4. LPS로 인한 혈청 내 MCP-1 수준의 변화 분석

정상대조군에서는 혈청 MCP-1이 검출되지 않은 것에 비해 LPS를 투여한 군에서는 혈청 MCP-1이 유의적으로 증가하였다. LPS5군에서는 142.1 ± 12.6 pg/mL, LPS10군에서는 848.3 ± 173.6 pg/mL, LPS20군에서는 1286.0 ± 229.7 pg/mL이었으며, 결과적으로 LPS의 투여 농도가 증가함에 따라 혈청 내 MCP-1의 수준이 유의적으로 증가하는 양상을 확인하였다(Fig. 4)

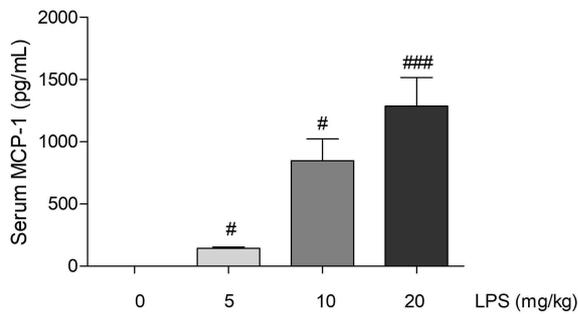


Fig. 4. Levels of serum MCP-1. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean and Tukey's multiple comparison tests were used to determine the statistical significance. # $p < 0.05$  and ### $p < 0.001$  vs. saline-treated group.

## Discussion

본 연구는 대장염을 유발하는 LPS를 농도별로 투여하여 육안적인 소견 및 조직학적인 염증 수준을 확인함으로써 대장염에 효과적인 치료 소재를 탐색하기 위한 최적화된 대장염 전임상 동물 모델을 구축하는 것을 목적으로 하였다. LPS는 대식세포를 활성화시키고 염증성 사이토카인과 케모카인을 생성하게 하여 급성 염증을 유도하는 그람 음성균 박테리아의 외벽의 주요 구성 성분이다<sup>13)</sup>. LPS로 인하여 유도되는 사이토카인은 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15와 TGF- $\beta$  등으로 매우 다양하다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. LPS는 짧은 시간 동안 전신 염증 반응을 일으킬 수 있어 기관을 손상시키고 결과적으로는 패혈증으로 인하여 사망에 이르게 할 수 있다<sup>15)</sup>. 최근 연구에 따르면 LPS로 인하여 면역 반응이 비정상적으로 조절되고 점막 장벽이 무너짐으로써 감염성 장 조직의 염증 반응을 유도하여 급성 장염을 유도한다고 보고되었다<sup>16)</sup>.

이에 기존 연구를 바탕으로 본 연구에서는 C57BL/6J 마우스에 5, 10, 20 mg/kg의 LPS를 복강주사하여 염증 유발 정도와 대장 조직의 손상을 확인하였다. LPS를 농도별로 처리한 결과, 무른 변과 설사, 혈변 및 체중 감소가 나타났다. 일반적으로 염증성 장질환 환자가 체중 감소, 복통, 설사, 혈변, 발열 등의 증상을 나타내는 것을 고려하면 장 염증이 효과적으로 유발되었음을 알 수 있었다. 다만 LPS 투여 농도별로 유의미한 차이는 나타나지 않았다. 대장 조직의 길이는 LPS의 투여 여부와 관계없이 유의미한 감소 또는 증가를 나타내지 않았다. Zhang이 2022년 발표한 연구에서 6주령 specific pathogen free 암컷 KM 마우스에 6 mg/kg LPS를 복강주사하였을 때 결장(colon)과 맹장(cecum)의 길이가 유의미하게 감소된 것을 보면, 마우스의 종(specimen)에 따라 LPS에 대한 민감도가 다를 수 있다는 것을 유추할 수 있다<sup>17)</sup>.

대장 조직을 Hematoxylin and Eosin solution으로 염색

하여 LPS로 인한 대장 조직 상피세포(epithelial cells)의 모양, 융모(villi) 및 점막고유층(lamina propria)의 손상 정도를 확인하였다. LPS 투여 농도에 따라 Histology score가 유의하게 증가하였으며, 이와 일치하게 조직학적 분석에서도 대장 조직이 심하게 손상된 것을 확인하였다. 또한 혈청 MCP-1의 수준도 LPS 농도에 따라 유의미하게 증가하였다. LPS는 Toll-like receptors 4 (TLR4)를 자극하여 케모카인인 MCP-1의 분비를 증가시키며, 이로 인하여 대식세포를 끌어들여 염증 반응을 촉진시킨다고 보고되었다(18). LPS의 투여 농도가 높아짐에 따라 TLR4를 농도의존적으로 자극하여 혈청 MCP-1의 분비가 증가하였음을 유추할 수 있다.

이상의 연구 결과를 종합하면 LPS는 급성 장염을 효과적으로 유도하여 혈청 내 케모카인을 증가시키고 장 조직을 손상시킬 수 있음을 발견하였다. LPS를 투여한 마우스에서 설사, 혈변, 체중감소 등의 증상이 나타났으며, 이는 사람의 염증성 장 질환과 유사한 양상을 보이는 것으로 확인되었다. 다만 조직학적 손상 정도나 증가된 혈청 MCP-1 수준과는 다르게 LPS의 투여 농도에 따른 DAI score와 육안적인 변화는 큰 차이를 나타내지 않았기 때문에 LPS가 전신성 염증 반응을 야기한다고 하더라도 실제 표현형으로 나타나기까지 시간이 걸릴 수 있다고 사료된다. 향후 염증성 장질환 치료를 위한 다양한 생리활성 물질들의 효능 및 작용기전 연구를 위한 기초자료로서 사용될 수 있을 것이다.

## Funding

이 논문은 2024년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. RS-2023-00261934).

## References

1. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*. 2019;50(4):992-1006.
2. Weisman MH, Stens O, Kim HS, Hou JK, Miller FW, Dillon CF. Inflammatory Bowel Disease Prevalence: Surveillance data from the U.S. National Health and Nutrition Examination Survey. *Preventive Medicine Reports*. 2023;33:102173.
3. Lee SH, Lee JA, Shin MR, Park HJ, Roh SS. Citrus unshiu Peel Attenuates Dextran Sulfate Sodium-Induced Ulcerative Colitis in Mice due to Modulation of the PI3K/Akt Signaling Pathway and MAPK and NF- $\kappa$ B. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022;2022:4041402.

4. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;12(12):720–7.
5. Shin SY, Park SJ, Kim Y, Im JP, Kim HJ, Lee KM, Kim JW, Jung SA, Lee J, Kang SB, Shin SJ, Kim ES, Kim YS, Kim TO, Kim HS, Park DI, Kim HK, Kim ES, Kim YH, Kim DH, Teng D, Kim JH, Kim W, Choi CH. Clinical outcomes and predictors of response for adalimumab in patients with moderately to severely active ulcerative colitis: a KASID prospective multicenter cohort study. *Intestinal Research* 2022;20:350–60.
6. Na SY. Advancements in the Management of Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis : A Revised 2023 Korean Treatment Guidelines. *Korean Journal of Medicine*. 2023;98(5):223–30.
7. Miehsler W, Novacek G, Wenzl H, Vogelsang H, Knoflach P, Kaser A, Dejaco C, Petritsch W, Kapitan M, Maier H, Graninger W, Tilg H, Reinisch W. A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2010;4:221–56.
8. Lin Z, Wu H, Fu Y, Dai S. Application of Herbaceous Medications for Inflammatory Bowel Disease as a Complementary and Alternative Therapy. *Inflammatory bowel diseases*. 2019;25(12):1886–95.
9. Bertani, B.; Ruiz, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*. 2018, 8:10.
10. Candelli M, Franza L, Pignataro G, Ojetti V, Covino M, Piccioni A, Gasbarrini A, Franceschi F. Interaction between Lipopolysaccharide and Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12), 6242.
11. Zhang L, Wei X, Zhang R, Si D, Petite JN, Ahmad B, Zhang M. A Novel Peptide Ameliorates LPS-Induced Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Damage via Its Antioxidant and Antiendotoxin Effects. 2019;20(16):3974.
12. Fung KY, Putoczki T. In Vivo Models of Inflammatory Bowel Disease and Colitis-Associated Cancer. *Methods In Molecular Biology*. 2018;1725:3–13.
13. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium*. 2006;13:423–9.
14. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology*. 2011;31:379–446.
15. Anand AR, Bradley R, Ganju RK. LPS-induced MCP-1 Expression in Human Microvascular Endothelial Cells is mediated by the tyrosine kinase, Pyk2 via the p38 MAPK/NF- $\kappa$ B dependent pathway. *Molecular Immunology*. 2009;46(5):962–8.
16. Sartor RB. Mechanisms of disease: Pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*. 2006;3(7):390–407.
17. Zhang HX, Li YY, Liu ZJ, Wang JF. Quercetin effectively improves LPS-induced intestinal inflammation, pyroptosis, and disruption of the barrier function through the TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling pathway in vivo and in vitro. *Food & Nutrition Research*. 2022:66.
18. Kopp A, Buechler C, Neumeier M, Weigert J, Aslanidis C, Scholmerich J, Schaffler A. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(4):648–56.

