DOI:10.16016/j.2097-0927.202201199

褪黑素通过 JNK/c-Jun 信号通路抑制胆汁酸诱导 Cxcl2 表达的机制研究

谭 雅,唐 菀,徐子芊,赵 楠,张晓珣,柴 进 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院消化内科,代谢性肝病中心和胆汁淤积肝病中心

[摘要] **目的** 研究褪黑素抑制胆汁酸诱导趋化因子 Cxcl2 表达的分子调控机制。**方法** 喂养小鼠含有 1% 胆酸(cholic acid,CA)的饲料 2 周,构建胆汁淤积小鼠模型,给予褪黑素腹腔注射(100 mg/kg,1 次/d)。收集肝组织后 HE 染色,根据 Scheuer 系统进行病理组织学评分。采用 Real-time qPCR 及 Western blot 方法检测褪黑素对小鼠肝脏内 Cxcl2、Cxcr2、Mpo、c-Jun 表达的影响。使用免疫组化方法检测小鼠肝脏内 c-Jun 的表达。分离并培养小鼠原代肝细胞,使用结合型胆汁酸 TCA 联合褪黑素处理小鼠原代肝细胞,在体外水平进一步探索褪黑素抑制胆汁酸诱导的 Cxcl2 表达的机制。使用 JNK 激动剂 Anisomycin 和褪黑素共同处理小鼠原代肝细胞,检测趋化因子 Cxcl2 表达。**结果** 褪黑素给药明显减轻胆汁淤积诱导的炎症性肝损伤($P<0.05$)。褪黑素明显抑制胆汁淤积小鼠肝脏内趋化因子 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 表达,并抑制肝脏内中性粒细胞标志物 Mpo 和转录因子 c-Jun 的表达($P<0.05$)。褪黑素显著减少 TCA 诱导的小鼠原代肝细胞内趋化因子 Cxcl2 的表达($P<0.05$)。JNK 激动剂 Anisomycin 逆转褪黑素对 Cxcl2 的抑制作用($P<0.05$)。**结论** 褪黑素通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路来降低胆汁酸诱导的趋化因子 Cxcl2 表达。

[关键词] 胆汁淤积;褪黑素;趋化因子 Cxcl2
[中图法分类号] R575; R966; R977.1 [文献标志码] A

Melatonin inhibits bile acids-initiated Cxcl2 expression through JNK/c-Jun signalling pathway

TAN Ya, TANG Wan, XU Ziqian, ZHAO Nan, ZHANG Xiaoxun, CHAI Jin Center for Metabolic Liver Diseases and Center for Cholestatic Liver Diseases, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the underlying molecular mechanism by which melatonin suppresses bile acids (BAs)-initiated expression of chemokine C-X-C motif chemokine ligand 2 (Cxcl2). **Methods** Mice were fed a 1% cholic acid (CA)-supplemented diet for 2 weeks to establish a model of cholestatic disease, and were given an intraperitoneal injection of melatonin (100 mg/kg) once a day for 2 weeks. Then, the liver tissues were collected for HE staining, and the liver histology was scored using the Scheuer scoring system. Effects of melatonin on the expression of Cxcl2, Cxcr2, myeloperoxidase (Mpo) and c-Jun in the liver tissues at mRNA and protein levels were detected by real-time qPCR and Western blotting. The expression of c-Jun in the liver tissues was measured by immunohistochemical assay. Primary mouse hepatocytes were isolated and cultured, and then treated with taurine-conjugated bile acid, taurocholic acid (TCA) and melatonin in order to explore the mechanism of melatonin reducing BAs-initiated Cxcl2 expression. Furthermore, these primarily cultured cells were treated with anisomycin (JNK agonist) and melatonin to further detect the expression of Cxcl2. **Results** Melatonin treatment significantly ameliorated cholestasis-induced inflammatory liver injury ($P<0.05$), and reduced the elevated expression of Cxcl2, Cxcr2, Mpo(a biomarker of neutrophils) and the transcription factor c-Jun in the livers of cholestatic disease mice

[基金项目] 国家自然科学基金优秀青年科学基金(81922012);重庆市杰出青年科学基金(cstc2021jcyj-jqX0005)
[通信作者] 柴 进,E-mail:jin.chai@cldcsw.org

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

($P<0.05$). In addition, melatonin suppressed TCA-stimulated Cxcl2 in primary mouse hepatocytes ($P<0.05$). Anisomycin reversed melatonin-inhibited Cxcl2 ($P<0.05$). **Conclusion** Melatonin treatment can decrease BAs-initiated expression of Cxcl2 *via* inhibition of JNK/c-Jun signaling pathway in mouse hepatocytes.

[**Key words**] cholestasis; melatonin; chemokine C-X-C motif chemokine ligand 2

Supported by the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (81922012) and the Outstanding Youth Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-jqX0005). Corresponding author: CHAI Jin, E-mail: jin.chai@cldcsw.org

胆汁酸(bile acids, BAs)是胆固醇的衍生物,是胆汁的主要成分,在营养吸收和新陈代谢中起着重要作用[1]。胆汁淤积是一种常见的肝脏临床综合征,其特征性的病理生理学改变是胆汁流量减少和胆汁酸积聚。慢性胆汁淤积性肝病可逐渐进展为肝纤维化、肝硬化及终末期肝病[2]。在胆汁淤积状态下,胆汁酸在肝脏内过度积累,使肝细胞氧化应激和线粒体损伤,释放大量炎症因子和招募大量免疫细胞,从而导致肝实质细胞死亡[3]。其中,C-X-C 基序趋化因子配体 2(C-X-C motif chemokine ligand 2, Cxcl2)在胆汁淤积性肝病患者或动物模型的肝脏和血清中增加,Cxcl2 招募和激活的中性粒细胞通过释放各种炎性介质来加速肝脏炎症,有研究在胆汁淤积动物模型上验证拮抗 Cxcl2 可减轻肝损伤[4-5]。因此,炎症反应在胆汁淤积这一病理过程中至关重要,是治疗胆汁淤积性肝损伤的新靶点。

褪黑素(melatonin, Mel)几乎存在于从细菌到动物的每一种生物,主要在大脑中由松果体合成,还能在视网膜、骨髓、肾和胃肠道(包括胆道上皮)等外周组织中产生。褪黑素参与胆道功能的调节,并通过褪黑素受体来发挥其作用。这些受体在肝脏上的肝细胞和胆管细胞上均有所表达[6-7]。褪黑素具有强大的抗氧化、抗凋亡等功能,能在如酒精、药物、肿瘤等病因引起的肝损伤中发挥保护作用[8]。但褪黑素抑制胆汁酸诱导的趋化因子 Cxcl2 这一作用和分子机制尚不明确。本研究设计体外实验,验证褪黑素是否通过抑制 Cxcl2 的表达来减轻胆汁淤积诱导的炎症反应,分离并培养小鼠原代肝细胞,进一步探讨褪黑素是否通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/c-Jun 信号通路以减少趋化因子 Cxcl2 的产生。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

胆酸(cholic acid, CA)、褪黑素(M5250)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)购自 Sigma Aldrich 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒、TB Green Premix *Ex Taq* Ⅱ购自 TaKaRa 公司,HE 染色试剂盒购自 Solarbio 公司,免疫组织化学试剂盒购自中杉金桥公司,JNK 激动剂 Anisomycin(ANI,Cat#HY-18982)购自 MedChemExpress 公司,p-c-Jun(#3270)、c-Jun(#9165)、p-JNK(#9255)抗体及辣根过氧化酶标记的抗兔、抗鼠二抗购自 Cell Signaling Technology 公司,GAPDH(10494-1-AP)、Mpo(66177-1-Ig)抗体购自 Proteintech 公司,JNK(SC-7345)抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 动物模型

雄性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体质量 20~23 g,购自陆军军医大学实验动物中心。所有动物实验和方案已经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准,批准编号:AMUWEC20211902。小鼠按随机数字表法分为 3 组,每组 5 只,分别为对照组、1%CA 组及 1%CA+Mel 组。除对照组以常规饲料喂食外,其他组以 1%CA 饲料喂食。1%CA+Mel 组小鼠腹腔注射 100 mg/kg 溶于生理盐水的褪黑素溶液,对照组、1%CA 组小鼠腹腔注射等量生理盐水,连续 2 周。禁食过夜后处置小鼠,留取肝组织冻存或固定。

1.3 分离、培养及处理小鼠原代肝细胞

小鼠原代肝细胞通过胶原酶灌注从 10~20 周龄 C57BL/6J 小鼠中分离出,然后培养在 5%FBS-Williams E 培养基中[9]。将结合型胆汁酸 TCA、TCDCA、褪黑素、JNK 激动剂 Anisomycin 溶于 DMSO。使用褪黑素(10 μmol/L)、褪黑素(10 μmol/L)联合 JNK 激动剂 Anisomycin(ANI,5 μmol/L)预处理小鼠原代肝细胞 30 min,然后加入 25 μmol/L 结合型胆汁酸 TCA 或 TCDCA,对照组均加入等体积的 DMSO。处理 12 h 或 24 h 后,提取总 RNA 或总蛋白。

1.4 总 RNA 提取、逆转录及 Real-time qPCR

使用 TRIzol 试剂提取小鼠肝组织或小鼠原代肝细胞的总 RNA,然后将 1 μg RNA 通过逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。利用 TB Green Premix *Ex Taq* Ⅱ进行 qPCR,检测体系(10 μL)为:TB Green 5 μL,上下游引物分别 0.5 μL,cDNA 2 μL,无酶水 2 μL。引物序列如下:18S 上游 5′-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3′,下游 5′-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3′;β-actin 上游 5′-GTTGGAGCAAACATCCCCCA-3′,下游 5′-ACGCGACCATCCTCCTCTTA-3′;Cxcl2 上游 5′-AGGCATCTGCTTCGGGGACTCTGGC-3′,下游 5′-GCAAACTCAGCCACAGGGGCGAAGG-3′;Cxcr2 上游 5′-GCACCTGCTCTG-

TCACCGATGTCT-3′,下游 5′-AGAATATCTTGCACAGG-GTTGAGCC-3′;c-Jun 上游 5′-CATTGCCGCCTCCAAG-TGCC-3′,下游 5′-GCGTTAGCATGAGTTGGCACCC-3′。

1.5 Western blot 检测

参考课题组前期报道方法[10-11],提取小鼠肝组织和小鼠原代肝细胞蛋白。蛋白样本由 10%SDS-PAGE 分离后转入 PVDF 膜。孵育一抗及其浓度如下:GAPDH(1∶5 000)、Mpo(1∶1 000)、p-c-Jun(1∶1 000)、c-Jun(1∶1 000)、p-JNK(1∶2 000)、JNK(1∶1 000)。

1.6 HE 染色及免疫组织化学染色

小鼠肝样本由 4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋肝组织制备病理切片。脱蜡后使用 HE 染色试剂盒染色,根据 Scheuer 系统对炎症活动度进行评分。使用 c-Jun 抗体(1∶200)对肝组织切片进行免疫组织化学染色,具体步骤参考该抗体说明书。

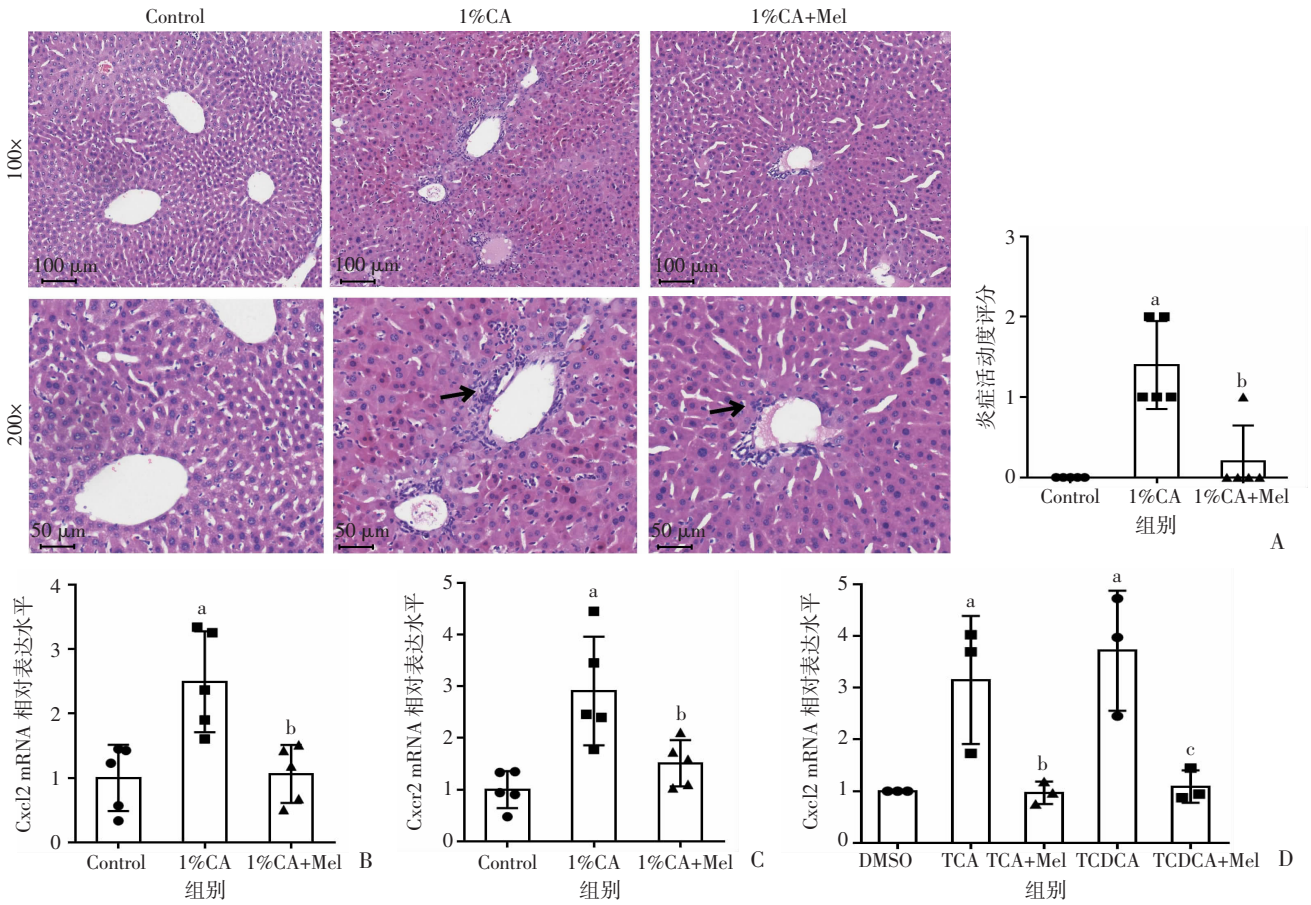
1.7 统计学分析

所有数据由 GraphPad Prism, version 6.01 进行统计,均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组之间比较使用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 褪黑素显著抑制胆汁淤积小鼠肝脏内和胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞内趋化因子 Cxcl2 表达

病理组织学分析结果显示,与对照组相比,1%CA 组小鼠肝内炎性浸润增加;与 1%CA 组相比,1%CA+Mel 组小鼠肝内炎性浸润减少。1%CA+Mel 组小鼠肝内炎症活动度较 1%CA 组小鼠肝内明显降低($P<0.05$,图 1A)。利用 Real-time qPCR 检测褪黑素对胆汁淤积状态下小鼠肝内和小鼠原代肝细胞内 Cxcl2 mRNA 水平的影响。如图 1B、C 所示,与对照组相比,1%CA 组小鼠肝内趋化因子 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 mRNA 水平显著升高($P<0.05$);与 1%CA 组相比,1%CA+Mel 组小鼠肝内 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 mRNA 水平显著降低($P<0.05$)。体外实验结果与上述结果一致,结合型胆汁酸 TCA、TCDCA 诱导肝细胞内 Cxcl2 mRNA 的表达($P<0.05$),而褪黑素可抑制胆汁酸诱导的 Cxcl2 表达($P<0.05$,图 1D)。

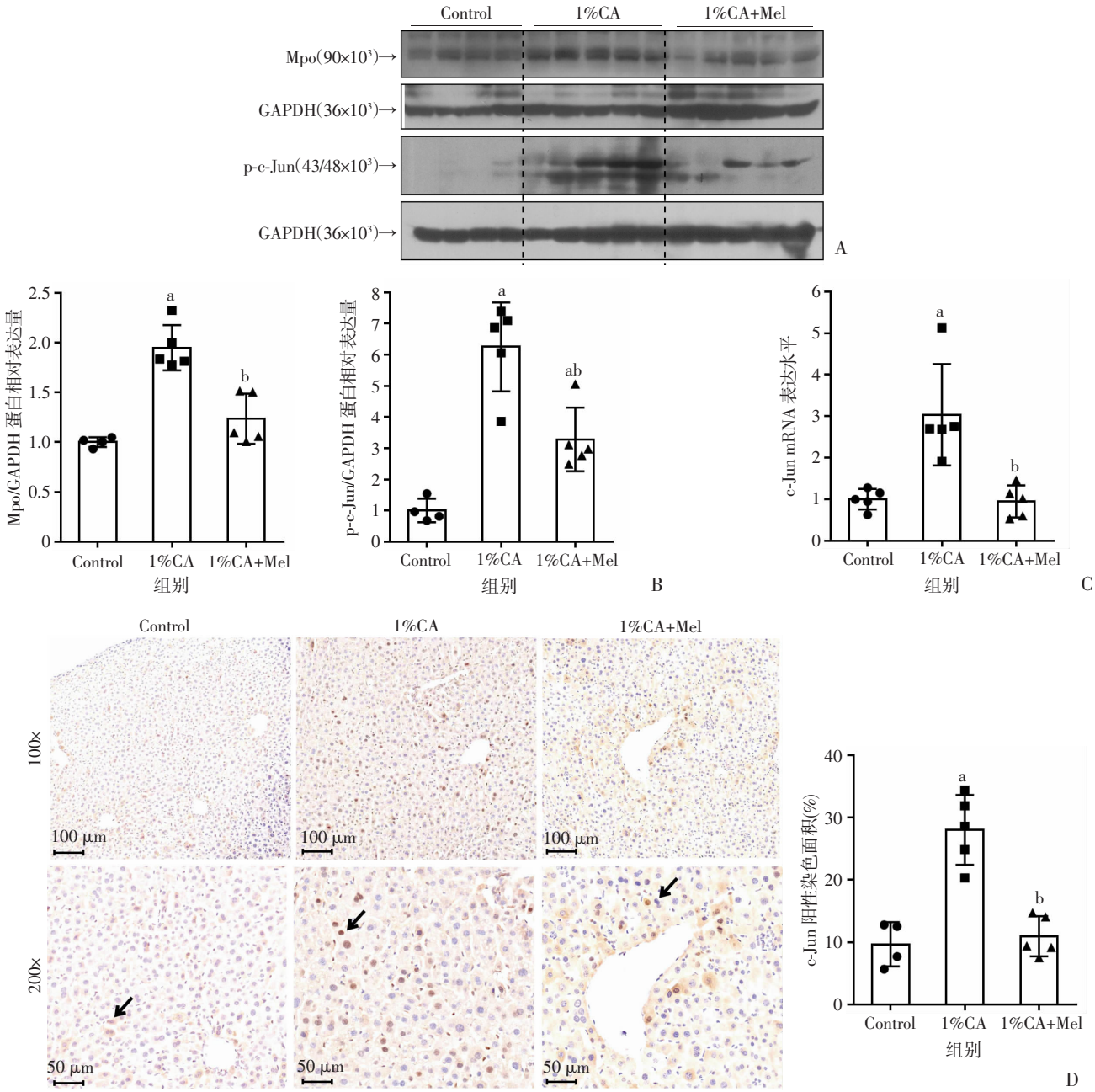


A:各组小鼠肝组织病理学表现及炎症活动度评分(HE),箭头示炎性细胞浸润;B、C:各组小鼠肝脏内趋化因子 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 mRNA 水平;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 1%CA 组比较;D:各组小鼠原代肝细胞 Cxcl2 mRNA 水平;a:$P<0.05$,与 DMSO 组比较;b:$P<0.05$,与 TCA 组比较;c:$P<0.05$,与 TCDCA 组比较

图 1 褪黑素对胆汁淤积小鼠肝脏内和小鼠原代肝细胞内 Cxcl2 表达水平的影响

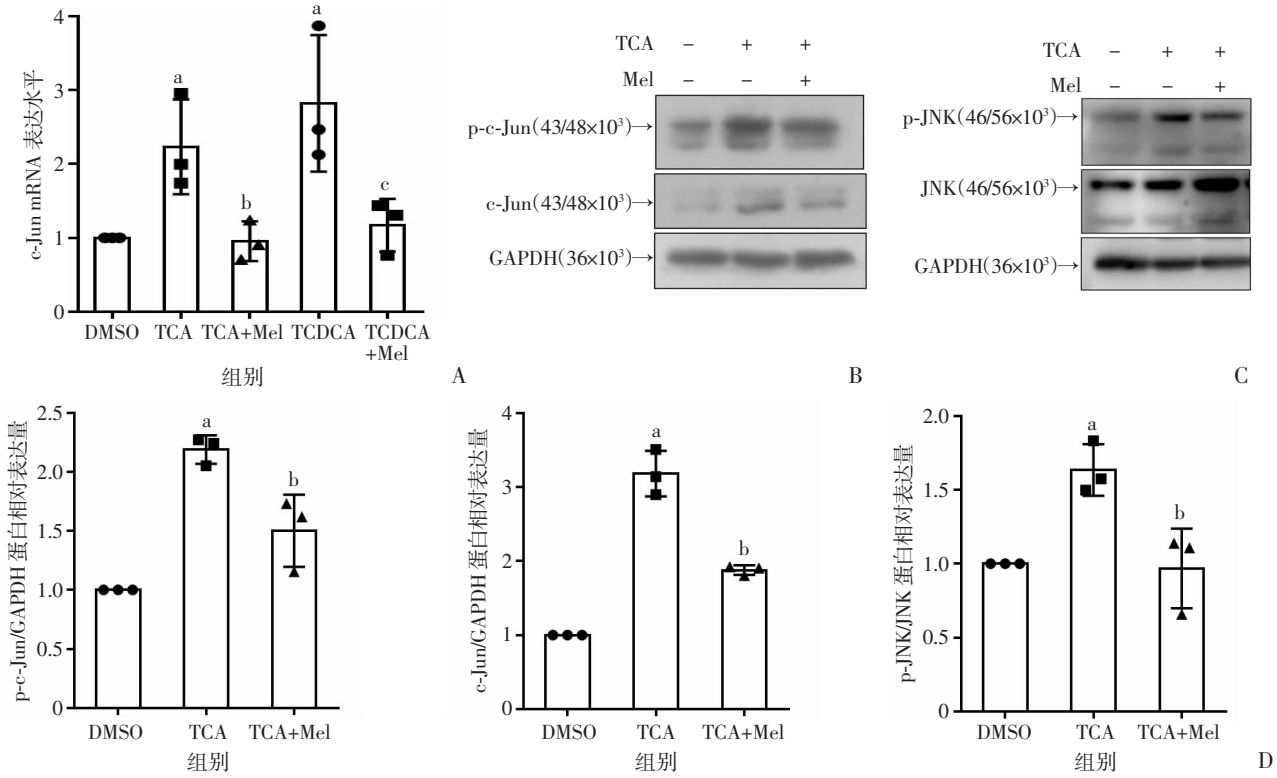
2.2　褪黑素显著减少胆汁淤积小鼠肝脏内中性粒细胞浸润和转录因子 c-Jun 的表达

图 2A、B 显示,1%CA+Mel 组小鼠肝脏内中性粒细胞标志物 Mpo 表达较 1%CA 组降低,且差异具有统计学意义($P<0.05$)。检测褪黑素对 1%CA 喂养小鼠肝脏内 c-Jun、p-c-Jun 水平的影响,结果发现褪黑素可显著减少 1%CA 喂养小鼠肝脏内 c-Jun mRNA 和 p-c-Jun 蛋白的表达($P<0.05$,图 2A~C)。免疫组织化学检测结果也显示,与对照组相比,1%CA 组小鼠肝细胞核 c-Jun 表达明显增多;与 1%CA 组相比,1%CA+Mel 组小鼠肝细胞核 c-Jun 表达明显减少($P<0.05$,图 2D)。



A、B:各组小鼠肝组织 p-c-Jun、Mpo 蛋白水平;C:各组小鼠肝组织 c-Jun mRNA 水平;D:免疫组织化学检测各组小鼠肝组织中 c-Jun 的表达及半定量分析,箭头示 c-Jun 阳性区域;a:$P<0.05$,与对照组比较,b:$P<0.05$,与 1%CA 组比较

图 2　褪黑素对喂养 1%CA 小鼠肝脏内 c-Jun、p-c-Jun、Mpo 表达水平的影响



A:各组原代小鼠肝细胞 Cxcl2 mRNA 水平;B~D:各组原代小鼠肝细胞 p-JNK、JNK、p-c-Jun、c-Jun 蛋白水平;a:$P<0.05$,与 DMSO 组比较;b:$P<0.05$,与 TCA 组比较;c:$P<0.05$,与 TCDCA 组比较

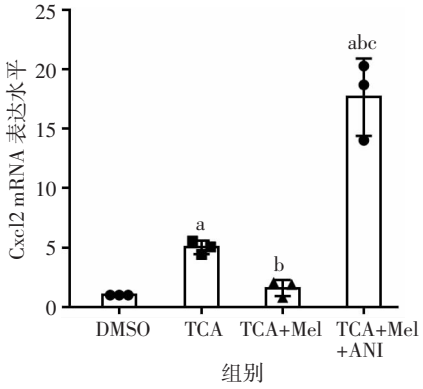
图 3 褪黑素对结合型胆汁酸诱导下原代小鼠肝细胞内 JNK/c-Jun 通路的影响

2.3 褪黑素抑制结合型胆汁酸激活 JNK/c-Jun 通路

在小鼠原代肝细胞上进一步检测褪黑素对结合型胆汁酸诱导下原代小鼠肝细胞内 JNK/c-Jun 通路的影响。结果显示,结合型胆汁酸 TCA、TCDCA 明显增加了原代小鼠肝细胞内转录因子 c-Jun mRNA 的表达,而褪黑素显著减轻了这种改变($P<0.05$)。Western blot 检测结果也显示,与 DMSO 组相比,TCA 组 p-c-Jun、c-Jun、p-JNK 蛋白水平显著升高;与 TCA 组相比,TCA +Mel 组 p-c-Jun、c-Jun、p-JNK 蛋白水平显著降低($P<0.05$,图 3)。

2.4 褪黑素通过 JNK 信号通路调控 TCA 诱导的 Cxcl2 表达

为了验证褪黑素是通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路来减少胆汁淤积小鼠肝细胞内 Cxcl2 的表达,采用 JNK 特异激动剂 Anisomycin 和褪黑素联合预处理原代小鼠肝细胞,结果发现 Anisomycin 极大程度地逆转了褪黑素对 TCA 诱导 Cxcl2 mRNA 的抑制作用($P<0.05$,图 4)。因此,褪黑素可通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路而减少胆汁淤积小鼠肝细胞内 Cxcl2 的表达来发挥抗炎作用。



a:$P<0.05$,与 DMSO 组比较;b:$P<0.05$,与 TCA 组比较;c:$P<0.05$,与 TCA+Mel 组比较

图 4 JNK 激动剂逆转褪黑素对 TCA 诱导的 Cxcl2 的抑制作用

3 讨论

本研究发现 1%CA 喂养小鼠肝组织炎症活动度、趋化因子 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 的表达显著升高,随后对 Cxcl2 趋化的中性粒细胞标志物 Mpo 和调控 Cxcl2 的转录因子 c-Jun 进行检测,发现 1%CA 喂养小鼠肝内 Mpo 和 c-Jun 的表达也明显增加,而褪黑素给药可

以减轻这些改变。在体外实验上进一步研究分子机制发现,褪黑素是通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路来减少结合型胆汁酸诱导的小鼠原代肝细胞内 Cxcl2 的表达,以此发挥其抗炎和护肝作用。

褪黑素是一种免疫调节剂,在脓毒症、缺血/再灌注和脑损伤等炎症病理状态下可观察到其强大的抗炎作用。褪黑素可通过降低 Mpo 活性来抑制炎症细胞的激活,并且能够在多种重度炎症模型中减少促炎症细胞因子(如 IL-6、TNF-α 等)的产生[12]。有研究表明,褪黑素合成酶 5-羟色胺 N-乙酰基转移酶(arylalkylamine N-acetyltransferase,AANAT)过表达或褪黑素给药,可通过抑制 BDL 大鼠和 Mdr2 基因敲除小鼠的时钟基因和 miR-200b,减轻胆汁淤积诱导的导管反应和肝纤维化[13]。炎症反应在胆汁淤积性肝损伤的病理过程中发挥着重要作用。胆汁淤积状态下的肝细胞通过释放趋化因子 Cxcl2 参与炎症反应,中性粒细胞收到化学信号后向炎症部位迁移,以其强大的细胞毒性对肝细胞造成破坏[14-16]。有研究发现,小鼠肝细胞特异性 Tlr9 基因敲除能通过减少 Cxcl2 的产生以减轻 BDL 诱导的胆汁淤积性肝损伤[5]。Cxcl2 与中性粒细胞上表达的受体 Cxcr2 结合,导致中性粒细胞募集到损伤部位。小鼠 Cxcr2 基因敲除能减轻 BDL 诱导的中性粒细胞浸润和肝损伤[17]。为了探索褪黑素对胆汁淤积引起的肝脏炎症的作用,本研究构建 1%CA 喂养小鼠模型。1%CA 喂养小鼠是一种用于诱导胆汁酸稳态失衡和胆汁淤积的广泛应用的疾病模型,其血清和肝内总胆汁酸显著升高[18]。本研究对其肝组织切片进行病理学评分,结果显示褪黑素可明显减轻 1%CA 喂养小鼠模型肝内炎性细胞浸润和炎症活动度。然后检测其肝内 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 的表达量,发现褪黑素可显著减少 1%CA 喂养小鼠模型肝内 Cxcl2 及其受体 Cxcr2 的表达。褪黑素抑制胆汁淤积状态下肝内 Cxcl2 的产生,减少中性粒细胞的浸润,Cxcr2 主要表达于中性粒细胞表面,因此中性粒细胞减少,Cxcr2 也随之减少。TCA 是小鼠体内主要的内源性胆汁酸,在肝内过多积聚后刺激肝细胞释放大量趋化因子 Cxcl2,引起肝组织炎性浸润及坏死[19]。有研究报道 TCA 显著增加 Cxcl2 在小鼠肝细胞的表达,而不增加 Cxcl2 在肝内非实质细胞或胆管细胞上的表达,因此本研究中分离并培养原代小鼠肝细胞,验证褪黑素对胆汁淤积下肝细胞的抗炎作用,结果与体内实验保持一致,褪黑素确实能够明显减少结合型胆汁酸 TCA/TCDCA 诱导的原代小鼠肝细胞内 Cxcl2 的产生。

已有文献报道 Cxcl2 的转录受 c-Jun 调控,在炎症性疾病中起重要作用[20]。为了进一步研究褪黑素减少胆汁淤积下肝细胞内 Cxcl2 的分子机制,本研究通过体内外实验检测褪黑素对转录因子 c-Jun 的影响,结果显示褪黑素显著抑制 1%CA 喂养小鼠肝内和结合型胆汁酸 TCA/TCDCA 诱导的原代小鼠肝细胞内 c-Jun 的表达。已知 c-Jun 能被 JNK 介导的信号通路激活。本研究结果也表明,褪黑素能有效减少 TCA 诱导的原代小鼠肝细胞内 p-JNK 的蛋白水平。褪黑素减少 TCA 诱导的肝细胞内 Cxcl2 的作用被 JNK 特异激动剂 Anisomycin 逆转,证明褪黑素需要通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路来减少胆汁淤积下肝细胞内 Cxcl2 的表达。本研究仅构建一种胆汁淤积小鼠模型,尚未利用其他胆汁淤积小鼠模型进行验证。褪黑素是否能通过其他信号通路对趋化因子 Cxcl2 进行干预或者通过其他途径减轻炎症反应也还未阐明,需后续工作进行探索。

综上所述,本研究表明褪黑素能够通过抑制 JNK/c-Jun 信号通路来减少胆汁淤积小鼠肝细胞内 Cxcl2 的表达,为褪黑素作为治疗胆汁淤积性肝病的潜在药物提供理论依据。

参考文献:

[1] CHIANG J Y L, FERRELL J M. Bile acids as metabolic regulators and nutrientsensors[J]. Annu Rev Nutr, 2019, 39: 175-200. DOI: 10.1146/annurev-nutr-082018-124344.

[2] WAGNER M, ZOLLNER G, TRAUNER M. New molecular insights into the mechanisms ofcholestasis[J]. J Hepatol, 2009, 51(3): 565-580. DOI: 10.1016/j.jhep.2009.05.012.

[3] CAI S Y, BOYER J L. The role of bile acids incholestatic liver injury[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(8): 737. DOI: 10.21037/atm-20-5110.

[4] QIN C C, LIU Y N, HU Y, *et al*. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(17): 3043-3052. DOI: 10.3748/wjg.v23.i17.3043.

[5] CAI S Y, OUYANG X S, CHEN Y L, *et al*. Bile acids initiatecholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response[J]. JCI Insight, 2017, 2(5): e90780. DOI: 10.1172/jci.insight.90780.

[6] CIPOLLA-NETO J, AMARAL F G D. Melatonin as a hormone: new physiological and clinicalinsights[J]. Endocr Rev, 2018, 39(6): 990-1028. DOI: 10.1210/er.2018-00084.

[7] GLASER S, HAN YY, FRANCIS H, *et al*. Melatonin regulation of biliary functions[J]. Hepatobil Surg Nutr, 2014, 3(1): 35-43. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2013.10.04.

[8] BAIOCCHI L, ZHOU T H, LIANGPUNSAKUL S, *et al*. Possible application of melatonin treatment in human diseases of the biliary tract[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 317(5): G651-G660. DOI: 10.1152/ajpgi.00110.2019.

[9] CAI S Y, GAUTAM S, NGUYEN T, *et al*. ATP8B1 deficiency disrupts the bilecanalicular membrane bilayer structure in hepatocytes, but FXR expression and activity are maintained[J]. Gastroenterology, 2009, 136(3): 1060-1069. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.025.

[10] CHAI J, CAI S Y, LIU X C, *et al*. Canalicular membrane MRP2/ABCC2 internalization is determined by Ezrin Thr567 phosphorylation in human obstructive cholestasis[J]. J Hepatol, 2015, 63(6): 1440-1448. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.07.016.

[11] CHAI J, HE Y, CAI S Y, *et al*. Elevated hepatic multidrug resistance-associated protein 3/ATP-binding cassette subfamily C3 expression in human obstructive cholestasis is mediated through tumor necrosis factor alpha and c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase-signaling pathway[J]. Hepatology, 2012, 55(5): 1485-1494. DOI: 10.1002/hep.24801.

[12] HARDELAND R. Melatonin and inflammation—Story of a double-edgedblade[J]. J Pineal Res, 2018, 65(4): e12525. DOI: 10.1111/jpi.12525.

[13] WU N, MENG F Y, ZHOU T H, *et al*. Prolonged darkness reduces liver fibrosis in a mouse model of primarysclerosing cholangitis by miR-200b down-regulation[J]. FASEB J, 2017, 31(10): 4305-4324. DOI: 10.1096/fj.201700097R.

[14] ZHANG Y C, HONG J Y, ROCKWELL C E, *et al*. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver[J]. LiverInt, 2012, 32(1): 58-69. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02662.x.

[15] ALLEN K, JAESCHKE H, COPPLE B L. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructivecholestasis[J]. Am J Pathol, 2011, 178(1): 175-186. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.026.

[16] LI M, CAI S Y, BOYER J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. Mol Aspects Med, 2017, 56: 45-53. DOI: 10.1016/j.mam.2017.06.001.

[17] KONISHI T, SCHUSTER R M, GOETZMAN H S, *et al*. Cell-specific regulatory effects of CXCR2 oncholestatic liver injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 317(6): G773-G783. DOI: 10.1152/ajpgi.00080.2019.

[18] LI J N, DAWSON P A. Animal models to study bile acid-metabolism[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(5): 895-911. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.05.011.

[19] CAI S Y, GE M X, MENNONE A, *et al*. Inflammasome is activated in the liver of cholestatic patients and aggravates hepatic injury in bile duct-ligated mouse[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 9(4): 679-688. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2019.12.008.

[20] OH S, WOO J I, LIM D J, *et al*. ERK2-dependent activation of c-Jun is required fornontypeable Haemophilus influenzae-induced CXCL2 upregulation in inner ear fibrocytes[J]. J Immunol, 2012, 188(7): 3496-3505. DOI: 10.4049/jimmunol.1103182.

(收稿:2022-01-21;修回:2022-03-11)

(编辑 邓强庭)