

## Interleukin-2 Inhibits Secretin-Induced Bile Secretion in Cholangiocytes

Yoo-Seung Ko<sup>1</sup>, Seock-Yeon Hwang<sup>2,†</sup> and Jae-Seung Park<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>*School of Life Sciences, Immune Synapse Research Center and Cell Dynamics*

*Research Center, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 500-712, Korea*

<sup>2</sup>*College of Applied Science and Industry, Daejeon University, 96-3 Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon 300-716, Korea*

<sup>3</sup>*Department of Clinical Pathology, Sohae University, 6 Seohae-daegil, Gunsan-si, Jeonllabuk-do 573-717, Korea*

Cholestatic liver is associated with hepatic inflammation and elevated proinflammatory cytokines. Recent studies indicate that certain cytokines can modulate bile secretion. In the present study, we have examined the role of interleukin (IL-2) on the bile secretion by a combination of study models. To examine the relevance of IL-2 on bile secretion, the expression of IL-2 and IL-2 receptor (IL-2R) of isolated normal and bile duct ligated (BDL) rats cholangiocytes was first measured by RT-PCR. In BDL rats, the expression of IL-2 and IL-2R was significantly increased compared with normal rats. To study the effect of IL-2 on bile secretion, bile flow was measured in normal and BDL rats. At the level of cholangiocytes, secretory responses of isolated bile duct unit (IBDU)s were quantified by videomicroscopy. The administrations of IL-2 had no significant effect on basal bile secretion in normal and BDL rats. There was no significant effect of IL-2 on basal bile ductular secretion as evidenced by no significant difference in luminal area of the IBUs perfused with 100 pM of IL-2 from those of albumin carrier control. However, the secretin-stimulated bile ductular secretion was significantly ( $P < 0.01$ ) inhibited by  $34 \pm 4\%$  (normal,  $n = 12$ ),  $21 \pm 5.3\%$  (BDL 2 wk,  $n = 12$ ) and  $15 \pm 5.2\%$  (BDL 4 wk,  $n = 12$ ) with the co-administration of IL-2. As with other cytokines, physiologically relevant concentration of IL-2 can significantly inhibit secretin-stimulated bile ductular secretion. These findings support the important roles of cytokines in modulating bile secretion and may contribute to the cholestasis seen in cholestatic liver diseases.

**Key Words:** Interleukin-2, Secretin, Cholangiocytes, Bile secretion, Cholestatic liver, Bile duct ligation (BDL)

간 내 담관 세포 (intrahepatic bile duct cells, IBDCs)는 삼투압 조절 (osmoregulation)에 중요한 역할을 수행할 뿐만 아니라 담즙 생성 및 변성 그리고 세포 내 pH 조절과 유전자 발현 등에 있어서 주요한 기능을 수행하고 (Feranchak et al., 2000; Braunstein et al., 2001), 간에서 생성되는 담즙생성의 약 15~30%를 차지하고 있다 (Alpini et al., 1989). 원발성담즙성간경변 (primary biliary cirrhosis),

원발성경화성담관염 (primary sclerosing cholangitis), 그리고 자가면역성담관병변 (autoimmune cholangiopathy) 등 많은 간 질환 (liver diseases)에서 간 내 담관 세포들이 변형되어 기능에 이상이 생기며, 특히 이러한 병변으로 인하여 면역-매개성 간 내 담관 세포의 변형 (immune-mediated IBDCs modification)을 일으킨다 (Roberts et al., 1997; Reynoso-Paz et al., 1999).

사이토카인 (cytokines) 중 종양괴사인자 (tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 와 인터루킨 (interleukin, IL) - 6는 패혈증으로 유도된 담즙분비정체 (sepsis-induced cholestasis)에서 나트륨 (Na) - 의존성 담즙산 (sodium- dependent bile acid)의 흡수율을 저해함으로써 간세포 (hepatocytes)의 담즙 수송을 저해한다 (Green et al., 1994; Whiting et al., 1995). 또한 비패혈증 (nonsepsis)에 대한 실험 모델에서, 알코올 중독자 (alcoholic)와 바이러스성 간염 (viral hepatitis)에 걸린 사람으로부터 림프구 (lymphocytes)를 분리, 배양한 후

\*Received: October 17, 2012 / Revised: March 4, 2013

Accepted: June 19, 2013

†Corresponding author: Jae-Seung Park. Department of Clinical Pathology, Sohae University, 6 Seohae-daegil, Gunsan-si, Jeonllabuk-do 573-717, Korea.

Tel: +82-63-460-9255, Fax: +82-63-460-9258

e-mail: jaespark@sohae.ac.kr

†Corresponding author: Seock-Yeon Hwang. College of Applied Science and Industry, Daejeon University, 96-3 Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon 300-716, Korea.

Tel: +82-42-280-2902, Fax: +82-42-280-2904

e-mail: syhwang@dju.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

배양액을 실험 동물에 주사한 후 관찰하였던 바 형태학적 변화는 전혀 없었으나 담즙 생성은 감소하였다 (Marbet et al., 1984).

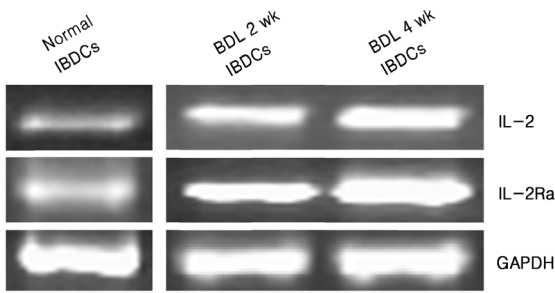
원발성담즙성간경변 또는 만성 간질환 (chronic liver disease) 환자의 간을 생검 (biopsy)하여 염증성 사이토카인들의 발현 정도를 측정된 결과, 대부분의 환자에서 IL-2와 많은 염증성 사이토카인들이 현저히 증가됨을 알 수 있다 (Dumolin et al., 1997). 그렇지만, 간 내 담관 세포의 담즙 분비에 있어서 IL-2와의 관계에 대한 연구는 찾아볼 수 없었다. 많은 연구에서 상피 세포 (epithelial cells)의 분비에는 염화 이온 통로 (chloride ion channels)가 관여한다고 보고하였다 (Clarke et al., 1992 ; Gabriel et al., 1994; Gray et al., 1993). 비폐쇄성 담즙 분비 정체 (nonobstructive biliary cholestasis) 현상은 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis)과 관련이 있으며 (Trauner et al., 1998), 이는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 유전자에 변이 (mutation)가 생기면 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-의존성 염화 이온 통로에 결함이 생긴다 (Riordan et al., 1989). 면역화학 (immunohistochemistry) 법과 전기생리 (electrophysiology) 법을 이용하여 간 내 담관 세포에서 CFTR이 발현됨이 밝혀졌다 (Mcgill et al., 1994; Cohn et al., 1993). 이는 담즙 분비 정체에 있어서 담관 세포의 염화 이온 통로가 어떻게 그 기능을 수행하는지 또한 이러한 담즙 분비 기능 결함에 대한 연구를 하는데 많은 도움이 되고 있다.

IL-2는 T 세포에서 분비되며 T 세포의 성장과 증식 그리고 분화에 관여하는 물질이다 (Cantrell and Smith, 1984). IL-2의 작용 기전은 세포막에 존재하는 IL-2 수용체 (receptor, IL-2R)에 특이적으로 결합함으로써 세포를 자극하고 분화를 촉진한다 (Sten and Smith, 1986; Beadling et al., 1993). 이러한 IL-2에 대한 수용체는 담관 세포 (cholangiocytes)에서 발현되고 있다고 알려져 있다 (Ueno et al., 2003). 원발성담즙성간경변, 원발성경화성담관염, 그리고 자가면역성담관병변 등 많은 간 질환에서 간 내 담관세포들은 T 세포-매개성 면역 반응 기전에 의하여 간 내 담관 세포의 변형을 일으킨다고 알려져 있다 (Krams et al., 1993; Williams and Thiele, 1994). 이에 본 연구에서는 정상과 담관 절제술 (bile-duct ligation)을 시행한 실험동물로부터 간 내 담관 세포를 분리하여 IL-2가 담관 세포의 분비에 미치는 영향에 대하여 실험하였다.

먼저 간 내 담관 절편의 분리는 Cho and Boyer (1999)와 Park et al (2007)의 방법을 이용하였다. 숫컷 Spraque-

Dawley 랫트 (200~350 g)를 정상 대조군으로 사용하였다. 담관 절제술 시행은 150~200 g 랫트의 온쓸개관 (common bile duct)을 절제하여 시행하였고, 담관 절제술 시행 후 2주와 4주에 간으로부터 담관 절편을 분리하여 이용하였다. 담관 절편의 분리는 실험동물을 마취하고 (Mennone et al., 1995), 마취된 랫트의 간문맥을 통하여 10분 동안 EDTA (0.019%) (Sigma, St. Louis, MO)가 첨가된 마그네슘과 칼슘이 제외된 HBSS ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -free Hanks'buffer) 용액을 순환시킨 후 collagenase D (63.8 U/Liter) (Roche, indianapolis, IN)를 첨가한 마그네슘과 칼슘이 제외된 HBSS 용액으로 10분간 순환시켰다. 간을 적출하여 간세포를 제거하고, 얻어진 간 내 담관을 절단한 후 FCS (2.9%), BSA (0.1%), collagenase (0.032%), pronase (0.032%), DNase (0.004%) 그리고 항생제를 함유한 MEM 배지를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 교반 배양하였다. 배양 후 100  $\mu$ m와 30  $\mu$ m 구멍의 막으로 통과시켜 여과한 후 30  $\mu$ m의 막에 남아있는 절편들을 수거한 후 hyaluronidase (0.034%)를 첨가한 MEM 배지에 부유하여 37°C에서 20분 동안 교반 배양하였다. 배양 후 다시 30  $\mu$ m 구멍의 막을 통과시켜 여과한 후 막에 남아있는 절편들을 수거하여 FCS (3.6%), 2 mM L-glutamin, 0.1  $\mu$ M insulin, 그리고 항생제가 들어있는  $\alpha$ -MEM 배지에 부유하여 배양용 접시 안에 있는 Matrigel이 코팅된 작은 유리조각 (2~4 mm) 위에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 존재 하에서 배양하였다. 분주 후 24~72시간 사이에 실험에 사용하였다. 담관 절편의 순수 분리를 검사는 담관 세포에서 발현이 되는 세포 표면 표지 항원에 대한 항체인 cytokeratin-7과 -19를 반응 시킨 후 면역 형광법으로 측정하였다 (Cho et al., 2001).

분리한 담관 세포로부터 total RNA를 분리한 후 역전사 효소 (reverse transcriptase) (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 각각의 primers ; IL-2, sense 5'-GCAGGCCACAGAATTGAAAC-3', anti - sense 5'-AGATGGCTAT CCATCTCCTC-3', 233 bp와 IL-2R $\alpha$ , sense 5'-GGTTCACCTGGCAACATAGAT-3', anti - sense 5'-CGAAAAGTGACCACACCATC-3', 367 bp 그리고 GAPDH, sense 5'-GTGGAGTCTACTGGCGTCTT-3', anti - sense 5'-GCCTGCTTACCACCTTCTT-3', 509 bp를 이용하여 PCR을 시행하였다. IL-2와 IL-2R $\alpha$  mRNA의 변화를 측정된 결과 이들 유전자가 정상 랫트에서 발현됨을 알 수 있었고, 담관 절제술을 시행한 실험 동물로부터 분리된 담관 세포에서는 IL-2와 IL-2R $\alpha$  유전자 발현이 시간-의존적으로 증

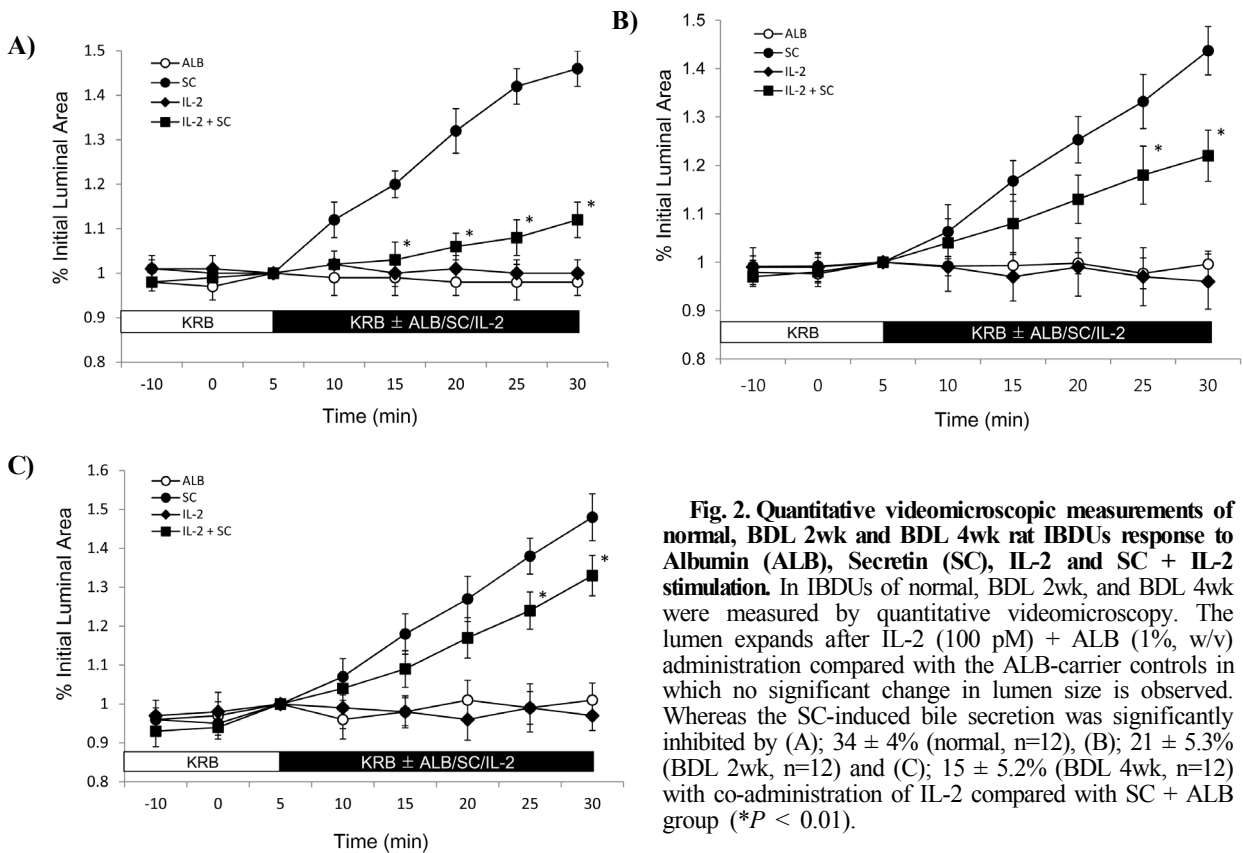


**Fig. 1. The expression of IL-2 and IL-2R in cholangiocytes.** Specific IL-2 and IL-2R fragments were amplified by RT-PCR from total RNA in isolated normal and BDL rat cholangiocytes.

가함을 알 수 있었다 (Fig 1). 이는 담관 절제술이 원발성담즙성간경변 등 많은 간 질환을 유발함으로써 면역-매개성간 내 담관 세포들의 변형을 유발하고 기능 이상을 초래할 것으로 사료된다. 이러한 담관 세포의 변형은 시간이 지날수록 중증으로 진행되었다.

분비율의 정량적 측정은 Lumen이 생성된 유리 조각을 비디오가 부착된 현미경으로 읊긴 후 1% 소 혈청 알부민 (negative control, bovine serum albumin, ALB), secretin

(positive control, SC), 1% ALB + IL-2, 1% ALB + SC, 그리고 1% ALB + IL-2 + SC을 Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) 용액에 용해하여 담관 세포를 자극하여 분비를 유도하였다 (Cho et al., 2001; Cho and Boyer, 1999). 정량적 측정은 사진상의 담관 절편에서 보여주는 luminal 영역의 증가 정도를 측정하여 자극하기 전의 측정 값과 비교하여 매 5 분에 대한 증가율을 산출하였다 (Cho et al., 2001). 신경전달 물질 (neuropeptid)들이 담관 세포로부터 분비를 유도한다는 보고들이 많이 있다 (Cho et al., 2001; Cho and Boyer, 1999). 담관세포의 분비물들은 대부분 전해질과 콜레스테롤 등을 분비하여 위 (stomach)로부터 소화된 물질들을 중화시키며, 지방의 소화를 돕고 삼투압 조절에 관여한다. 이에 본 연구에서는 대조군과 담관 절제군에서 100 nM SC과 100 pM IL-2, 그리고 SC과 IL-2를 동시에 자극하여 luminal 영역의 증가율을 측정하여 각각의 자극에 대한 분비율을 측정하였고 (Fig. 2), IL-2 자극이 담관 세포의 분비에 미치는 영향에 대하여 실험하였다. 그 결과 정상군과 담관 절제군 랫트의 담관 절편에서 IL-2만을 이용한 자극은 알부민 처리군과 비교하여 분비 분비에 아무런 영향을 주지 않았지만, SC로 담즙분



**Fig. 2. Quantitative videomicroscopic measurements of normal, BDL 2wk and BDL 4wk rat IBDUs response to Albumin (ALB), Secretin (SC), IL-2 and SC + IL-2 stimulation.** In IBDUs of normal, BDL 2wk, and BDL 4wk were measured by quantitative videomicroscopy. The lumen expands after IL-2 (100 pM) + ALB (1%, w/v) administration compared with the ALB-carrier controls in which no significant change in lumen size is observed. Whereas the SC-induced bile secretion was significantly inhibited by (A);  $34 \pm 4\%$  (normal, n=12), (B);  $21 \pm 5.3\%$  (BDL 2wk, n=12) and (C);  $15 \pm 5.2\%$  (BDL 4wk, n=12) with co-administration of IL-2 compared with SC + ALB group (\* $P < 0.01$ ).

비를 유도하면서 IL-2를 처리한 결과 SC 만을 처리한 군의 담즙분비보다 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 2).

정상군에서 SC 자극에 대한 IL-2의 분비 억제율은  $34 \pm 4\%$  이었고 (Fig. 2A), 담관 절제군에서는 분비를 유도한 후 30분에  $21 \pm 5.3\%$  (BDL 2wk)와  $15 \pm 5.2\%$  (BDL 4wk)의 억제율을 보였다 (Fig. 2B 그리고 2C). IL-2에 의한 억제는 정상군에 비하여 담관 절제군의 분비율 억제가 낮았다 (Fig. 2). 이는 담관 절제군은 담관 절편을 분리하기 전 담즙울체성 간 질환 (cholestatic liver disease)이 유발되어 병태생리학적 변화와 더불어 IL-2에 의한 자극이 유발되었다. 그러므로, 실험실에서 담관 절제군의 담관 절편에 대한 IL-2의 자극은 정상군보다 반응이 약할 것으로 사료된다. 또한 이러한 병태생리학적 변화는 시간-의존적으로 진행됨을 알 수 있었다. 세포 생존율은 실험이 끝난 후 trypan blue를 이용하여 담관 절편의 생존율을 확인하였으며, 모든 연구 결과는 Student's *t*-test를 대조군과 실험군간의 측정치에 대한 통계처리와 각군의 측정치에 대한 통계처리에 이용하였고, 분석결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표기하였다 ( $P < 0.01$ ). 이러한 결과들은 IL-2가 많은 간질환에서 발현이 증가된다는 보고와 일치하였고 (Dumoulin et al., 1997), 여러 가지 간 병변에 의한 염증성 사이토카인들의 증가와 더불어 염증성 사이토카인들이 담즙분비에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 (Green et al., 1994; McGill et al., 2001), IL-2 또한 담즙분비에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. SC과 글루카곤 (glucagon) 그리고 vasoactive intestinal peptide (VIP) 호르몬 (hormones) 등 많은 호르몬들은 세포막에 존재하는 SC 수용체와 SC 수용체의 G-단백질 결합 수용체 (protein coupled receptors)의 활성을 조절한다. SC은 췌장관 세포 (pancreatic duct cells)와 간 내 담관세포 (liver cholangiocytes) 그리고 부고환 상피세포 (epididymis epithelial cells)에서 물과 전해질 수송을 조절하여 삼투압을 유지시킨다 (Chow et al., 2004; Marinelli et al., 1997).

이러한 조절은 SC이 G-단백질 결합 수용체를 활성화시키며, 세포 내 신호 전달은 cAMP 신호 경로 (cAMP signal pathway)나 phosphatidylinositol (PtdIns) 신호 경로를 통하여 이루어진다 (Gilman, 1987). 더 나아가 G-단백질 결합 수용체의 신호 전달에 의해 면역세포 활성화나 염증반응 등의 조절이 이루어진다. 여러 사이토카인들의 신호전달 시작은 단백질 인산화효소 (protein kinase phosphorylation)이나 G-단백질 의존성 PtdIns의 변화에 의해서도 일어난다 (LeRoy et al., 1990). IL-2 자극에 의한 IL-2 수용체의 세포

내 신호 전달은 Mitogen-activated protein(MAP) kinase 경로와 Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 경로 그리고 Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) 경로를 통해 이루어진다 (Moon et al., 2004).

PI3K 효소는 PtdIns에 있는 inositol ring의 세번째 hydroxyl group을 인산화 (phosphorylation) 시킴으로써 세포 내 신호 전달 경로에 관여한다. 세포내에서의 신호전달은 다양한 경로를 이용하고 있음을 알 수 있다. 그러므로 담관 절제술이 시행된 담관 세포에서는 정상인군에 비하여 이러한 신호 전달 경로가 활성화되어 있음을 시사한다. 앞으로 더 많은 연구를 통하여 염증성 사이토카인들이 간 내 담관세포에서 담즙분비를 억제하는 기전을 밝힘으로써 많은 간 질환, 특히 면역-매개성 간질환에서 발생하는 담즙분비 중지 예방에 크게 기여할 수 있으리라 생각된다. 본 연구의 결과 IL-2 자극이 신경전달물질로 유도한 담즙세포의 분비를 억제함을 알 수 있었고, 이는 여러 가지 염증성 사이토카인들이 원발성 담즙성간질환 및 면역-매개성 간 질환 등의 담즙 분비에 기여함을 알 수 있었다.

## REFERENCES

- Alpini G, Lenzi R, Zhai WR, Slott PA, Liu MH, Sarkozi L, Tavoloni N. Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1989. 257: G124-G133.
- Beadling C, Johnson KW, Smith KA. Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. 90: 2719-2723.
- Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG, Schwiebert EM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem.* 2001. 276: 6621-6630.
- Cantrell DA, Smith KA. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science.* 1984. 224: 1312-1316.
- Cho WK, Mennone A, Boyer JL. Isolation of functional polarized bile duct units from mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001. 280: G241-G246.
- Cho WK, Boyer JL. Vasoactive intestinal polypeptide is a potent regulator of bile secretion from rat cholangiocytes.

- Gastroenterology. 1999. 117: 420-428.
- Chow BK, Cheung KH, Tsang EM, Leung MC, Lee SM, Wong PY. "Secretin controls anion secretion in the rat epididymis in an autocrine/paracrine fashion". *Biol Reprod*. 2004. 70: 1594-1599.
- Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC. Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science*. 1992. 257: 1125-1128.
- Cohn JA, Strong TV, Picciotto MR, Nairn AC, Collins FS, Fitz JG. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells. *Gastroenterology*. 1993. 105: 1857-1864.
- Dumoulin FL, Bach A, Leifeld L, El-Bakri M, Fischer HP, Sauerbruch T, Spengler U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 1997. 175: 681-685.
- Feranchak AP, Fitz JG, Roman RM. Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. *J Hepatol*. 2000. 33: 174-182.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science*. 1994. 266: 107-109.
- Gilman AG. "G proteins: transducers of receptor-generated signals". *Annu Rev Biochem*. 1987. 56: 615-649.
- Gray MA, Plant S, and Argent BE. cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1993. 264: C591-C602.
- Green RM, Whiting JF, Rosenbluth AB, Beier D, Gollan JL. Interleukin-6 inhibits hepatocyte taurocholate uptake and sodium-potassium-adenosinetriphosphatase activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1994. 267: G1094-G1100.
- Krams SM, Ascher NL, Martinez OM. New immunologic insights into the requirement for specific antigen stimulation is clear, be- mechanisms of allograft rejection. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993. 22: 381-400.
- LeRoy EC, Trojanowska MI, Smith EA. Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw*. 1990. 1: 215-219.
- Marbet UA, Shefer S, Leevy CM. Studies of the influence of immunological and serological factors from patients with cholestasis due to alcoholic or viral hepatitis on biliary function in the rat. *Eur J Clin Invest*. 1984. 14: 346-353.
- Marinelli RA, Pham L, Agre P, LaRusso NF. "Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1". *J Biol Chem*. 1997. 272: 12984-12988.
- Mcgill JM, Basavappa S, Gettys TW, Fitz JG. Secretin activates Cl<sup>-</sup> channels in bile duct epithelial cells through a cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1994. 266: G731-G736.
- Mcgill JM, Yen MS, Cummings OW, Alpini G, Lesage G, Pollok KE, Miller B, Engle SK, Ann P, Stansfield AP. Interleukin-5 inhibition of biliary cell chloride currents and bile flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001. 280: G738-G745.
- Mennone A, Alvaro D, Cho W, Boyer JL. Isolation of small polarized bile duct units. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92: 6527-6531.
- Moon JJ, Rubio ED, Martino A, Krumm A, Nelson BH. "A permissive role for phosphatidylinositol 3-kinase in the Stat5-mediated expression of cyclin D2 by the interleukin-2 receptor". *J Biol Chem*. 2004. 279: 5520-5527.
- Park JS, Choi YJ, Siegrist VJ, Ko YS, Cho WK. Permissive role of calcium on regulatory volume decrease in freshly isolated mouse cholangiocytes. *Pflügers Arch*. 2007. 455: 261-271.
- Reynoso-Paz S, Coppel RL, Mackay IR, Bass NM, Ansari AA, Gershwin ME. The immunobiology of bile and biliary epithelium. *Hepatology*. 1999. 30: 351-357.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989. 245: 1066-1073.
- Roberts SK, Ludwig J, LaRusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*. 1997. 112: 269-279.
- Stern JB, Smith KA. Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression. *Science*. 1986. 233: 203-206.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998. 339: 1217-1227.
- Ueno Y, Alpini G, Yahagi K, Kanno N, Moritoki Y, Fukushima K, Glaser S, LeSage G, Shimosegawa T. Evaluation of differential gene expression by microarray analysis in small and large cholangiocytes isolated from normal mice. *Liver Int*. 2003. 23: 449-459.

Whiting JF, Green RM, Rosenbluth AB, Gollan JL. Tumor necrosis factor-alpha decreases hepatocyte bile salt uptake and mediates endotoxin-induced cholestasis. *Hepatology*. 1995. 22: 1273-1278.

Williams FH, Thiele DL. The role of major histocompatibility

complex and non-major histocompatibility complex encoded antigens in generation of bile duct lesions during hepatic graft-vs.-host responses mediated by helper or cytotoxic T cells. *Hepatology*. 1994. 19: 980-988.

