

흰쥐 간부분절제 후 간재생시 동반되는 Rb의 인산화 및 Rb Kinase 활성도의 변화

아주대학교 의과대학 생화학교실¹, 외과학교실², 내과학교실¹
이재호¹, 김옥환², 박혜리², 윤차원¹, 조혜성¹

Abstract

Changes in the Expression of Cyclin D1-associated Rb Kinases, Their Activity and Rb Phosphorylation Status during Rat Liver Regeneration after Partial Hepatectomy

Jae-Ho Lee¹, Wook-Hwan Kim², Hyelee Park², Cha-won Yun¹, and Hyeseong Cho¹

Departments of Biochemistry¹, and Surgery², School of Medicine,
Ajou University, Suwon 442-749, Korea

(Background/Aims) The changes of cell cycle regulators which may trigger G0 to G1 transition during liver regeneration have been examined.

(Methods) Liver tissue was removed at various times after 70% partial hepatectomy. Expression of cell-cycle regulators was monitored by Western blot analysis. Association between them was assessed by Western blot analysis after immunoprecipitation. Also, immune complex kinase assay was performed.

(Results and Conclusion) In vivo, thymidine uptake indicated that S-phase began about 18 hrs after partial hepatectomy and the peak of DNA synthesis appeared after 21 to 24 hrs. Immune complex kinase assay revealed that cyclin D1-associated kinase activity was increased two to three fold after the liver resection, which may partly explain the observed increase in the hyperphosphorylated form of Rb protein. As a possible explanation of the increase of kinase activity, the increase of cyclin D1 and CDK4 protein was observed, but not in CDK2. The association of cyclin D1 with CDK4 was also increased. Expression of p21^{CIP1} and p27^{KIP1} proteins increased slightly until 24 hrs. Moreover, association of CKIs with cyclin D1 also increased.

Keyword : Cell cycle, Cell cycle regulator, Partial hepatectomy, Liver regeneration, Cyclin D1-associated kinase activity

서론

간절제술이 간암환자에 있어서 중요한 치료법으로 인정되고, 간경변 및 전격성 간염등에서 간세포의 재생과정이 환자의 예후에 직접적으로 관계됨을 인식하면서, 간재생 현상의 기전에 대한 연구가 더욱 그 중요성을 띄게 되었다. 동물 실험 및 임상적으로 간재생에 영향을 미치는 여러 간재생 인자들에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 근래에 세포주기 조절자들에 관한 연구가 활발히 이루어지면서, 간세포의 재생에 있어서 세포주기 조절자들의 변화를 이해하고 이를 활용하려는 연구가 시도되고 있다.

흰쥐의 간 부분절제 모델은 Higgins와 Anderson¹이 1931년에 보고한 이래 간의 재생에 관한 연구에 있어 중요한 모델로 자리 잡아왔다. 이 간 부분절제 모델은 in vivo에서 세포들을 동시화(synchronization)했다가 동시에 증식시키고, 일정 시간 후 증식을 멈추는 엄격한 조절을 받기 때문에 세포 주기 조절을 연구하는데 있어 좋은 모델이 되고 있다.

세포의 분열에 있어서는 일반적으로 세포주기 조절자라고 불리는 몇 가지 단백질 분자들이 중요한 역할을 한다.

Cyclin과 cyclin-dependent kinases(CDKs) 그리고 CDK inhibitor들(CKIs) 및 Rb, p53 등 기타 단백질들이 그것이다. 이러한 세포주기 조절자들은 세포주기에 있어 적절한 시점에 발현되어, 세포주기가 진행 또는 정지하는데 있어 필수적인 역할을 한다. 간절제 모델에 있어서 절제후 18시간에 thymidine 이입이 증가하게 되는데², 이 시간 동안에 G₀ 상태로 존재하던 간세포가 G₁ 기에 들어가고, 다시 G₁/S check point를 거치게 된다. 이 동안에 정상 상태에서는 거의 발현되지 않던 G₁ 기 cyclin들, 즉 cyclin D1 및 cyclin E mRNA의 발현이 증가하게 되나^{2,4} 일부 연구자들^{2,3}은 cyclin D1 단백질과 cyclin E 단백질의 양에 거의 변화가 없었다고 보고하였다. Albrecht 등³은 cyclin D1과 CDK4간의 결합도 관찰하였는데, 여기서도 역시 뚜렷한 차이를 관찰할 수 없었다고 한다. 그에 반해 본 연구자들은 이전의 논문에서 흰쥐의 간 부분절제시 cyclin D1과 CDK4가 양적으로 증가하고 그 결합도 증가함을 보고하였고⁵ 그후 다른 연구자들도 같은 현상을 관찰

하여 보고하였다^{6,7}. 이러한 cyclin D1 및 CDK4의 증가는 결과적으로 중요 세포조절 단백질중 하나인 Rb 단백질의 인산화를 촉진시켜 저인산화 상태의 Rb 단백질과 결합되어 있던 E2F/DP 단백질을 유리 시킴으로써 세포주기가 진행될 것으로 생각된다⁸.

한편, CDK 활성의 또다른 조절 방식으로 CDK inhibitor들(CKIs)이 있다. CKIs는 크게 1) P16^{INK4/MTS1}을 근간으로 하는 P15, P18등⁹과 2) P21^{CIP1} 계열의 P21^{CIP1}, P27^{KIP1}, P57^{KIP2} 등¹⁰⁻¹²이 있는데, 이들은 각각 특이도가 다르지만, 총체적으로 볼 때 G₁ CDK들의 활성을 분자간 결합에 의해 저해하는 것으로 알려져 있다. 그 결과 CKI의 발현은 세포주기의 정지와 밀접하게 관련됨이 여러 시스템에서 보고되고 있다¹³⁻¹⁵. 본 연구자들은 이전의 논문에서 흰쥐의 간절제 모델에서 G₁ cyclin 단백질의 양적 변화와 더불어 CKI의 변화에 따라 CDK 활성이 조절되고 있을 가능성을 살펴보았다. 그 결과 p27은 약간 증가하였고, p21은 상당히 증가함을 알 수 있었다⁵. 이렇게 부분 간절제후 p21 및 p27이 증가하는 현상은 다른 보고자들도 역시 관찰한 바 있다^{6,7,16}.

본 논문에서는 이미 보고한 바, cyclin D1 및 CDK4의 증가의 결과 Rb 인산화 활성이 증가하며 그 결과 Rb 단백질의 인산화가 진행되는지를 확인하였다. 또한, 간절제 이후의 cyclin과 CDK, 그리고 CKI의 양적인 변화외에 CKI의 활성에 영향을 미칠 수 있는 요소인 cyclin D/CDK 복합체와의 결합을 측정하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

동물

SPF(specific pathogen-free)상태에서 사육한 체중 200-220 g의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐를 대한실험동물 센터에서 구입하여 SPF 상태인 본 대학 동물실에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였다. 적응 기간동안 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

항체

상표화 되어 있는 항체를 사용하였다. Rb 단백질에 대한 항체로는 Pharmingen사의 G3-245 단세포 균 항체를 사용하였다. Cyclin D1에 대한 항체는

Santa Cruz사의 SC-450 단세포균 항체를 사용하였다. CDK4, CDK2에 대한 항체도 역시 Santa Cruz사의 항체를 사용하였다.

기질의 준비

Rb 단백질의 C-말단 60kDa 정도를 포함하고 있는 glutathione S-transferase(GST)-Rb fusion protein construct를 아주의대 의과학 연구소의 하만준 박사로부터 얻었다. *E. coli*를 isopropyl thiogalactoside로 induction한 후 균질액을 얻고, 여기에서 glutathione-agarose column을 이용하여 GST-Rb fusion protein을 얻었다. 이를 CDK4의 활성을 측정하기 위한 기질로 사용하였다.

실험 방법

흰쥐의 간 부분 절제

흰쥐를 에테르로 마취하고 개복하여 중앙엽과 좌측엽을 제거하는 70% 간 부분 절제를 시행하였다. 대조수술군은 간절제외의 다른 조작을 동일하게 시행하였다.

in vivo thymidine uptake

Terasaki 등의 방법¹⁷을 사용하였다. 흰쥐를 희생하기 1시간 전에 phosphate buffered saline(PBS)로 1/10 희석한 [³H]-thymidine을 체중 100g당 30 μ Ci씩 복강에 주사하였다. 1시간 후 개복한 상태에서 간문맥으로 도관을 삽입하고 생리 식염수 50ml로 관류하여 혈액을 제거하였다. 절제된 간 1g을 완충액 9ml와 섞고 잘게 자른후 Brinkman 파쇄기로 조직을 분쇄하였다. 만들어진 균질액에 SDS와 proteinase K를 첨가하고 37°C에서 밤새 정치하였다. 다음 날 이를 원침하여 상층액을 얻은 후 1/2 volume의 30% trichloroacetic acid를 첨가하고 침전을 얻었다. 상층액의 방사능 수준이 background 수준이 될 때까지 세척한 후 침전물을 cocktail solution에 녹이고 liquid scintillation counter(Wallac, Finland)로 측정하였다. dpm을 구하고 DNA 양으로 나누어 data를 얻었다.

조직의 확보

각 시간별로 간절제군 및 대조 수술군의 흰쥐를 에테르로 마취후 개복하고 간을 절제하여 작은 덩어리로 만든 후 액체질소에 즉시 얼렸다. 다음 실험을 시행하기까지 조직을 -70°C에 보관하였다.

Western blotting

냉동상태의 조직을 조직 용해 완충액(50mM Tris, pH7.9, 150mM NaCl, 20mM EDTA, 0.5% NP-40, 20 μ g/ml PMSF, 각 1 μ g/ml의 aprotinin, leupeptin, pepstatin A, 10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 20mM NaF, 20mM beta-glycerophosphate, 0.1mM sodium orthovanadate 및 1mM dithiothreitol)에 넣고, 파쇄기로 파쇄하였다. 상층액을 SDS-PAGE후 electrotransfer한 후 세포주기조절자들을 immunoblotting으로 검색하였다. 발색은 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) 방법을 사용하였다.

면역침전 및 in vitro kinase assay

Mutsushime 등의 방법¹⁸을 사용하였다. 조직을 Western blotting에서의 방법을 사용하여 파쇄하였다. 상층액을 얻어 항 cyclin D1항체를 첨가, 반응시킨 후, protein A-agarose bead로 면역 복합체를 분리, GST-Rb fusion protein을 기질로 사용하고 반응액내에 [³²P] ATP(NEN Dupont, U.S.A.)를 첨가하여 반응시켰다. SDS-PAGE후 autoradiography를 시행하고 densitometer로 측정하였다.

면역침전 및 Western blotting

상기한 방법으로 면역침전을 시행한 후, 면역 복합체에 SDS-sample buffer를 넣고 끓는 물에서 5분간 중탕하였다. 이후 적절한 항체를 사용하여 Western blotting을 시행하였다.

단백질 정량

시료중의 단백질 농도는 우혈청 알부민을 표준물질로 하여 BCA 방법(Pierce, USA)으로 정량하였다.

결과

간부분절제술후 간의 재생

간의 부분절제술후에 tritiated thymidine의 이입은 18시간부터 급격하게 증가하기 시작하여 21시간에 정점에 도달하였으며 24시간까지 약간 감소하는 경향을 보이고 있었으나 높은 수치는 계속 유지되고 있었다(Fig 1).

Rb 인산화 상태

Hypophosphorylated Rb와 hyperphosphorylated Rb가 정상 간에 모두 존재하고 있었다. 간절제후 hyperphosphorylated Rb와 hypophosphorylat-

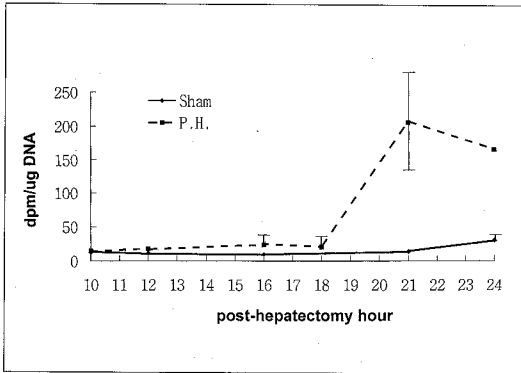


Fig 1. in vivo thymidine uptake At different times after two-thirds hepatectomy, rats were injected with [³H]-thymidine(30 μCi/200 μl/100 g body weight) 1 hr before sacrifice. Livers were perfused with normal saline through portal vein and the radioactivity in remnant liver was determined by trichloroacetic acid precipitation. [³H]-thymidine incorporation into DNA was expressed as counts(dpm) per μg DNA. P/H, individual value of partial hepatectomy group; sham, sham-operated group; P/H av., average value of partial hepatectomy group.

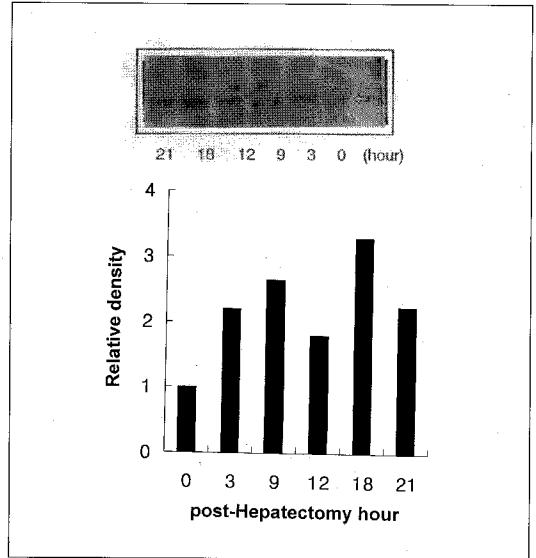


Fig 3. Immune complex kinase assay Immunoprecipitation using anti-cyclin D1 antibody was performed using GST-Rb and [^γ-³²P]ATP as substrates. After the kinase reaction, substrate solution was subjected to SDS-PAGE on a 7.5% gel, and the activity was visualized by autoradiography of the gel. * Relative density means the intensity of the band at a certain time point divided by the intensity of the band at zero time.

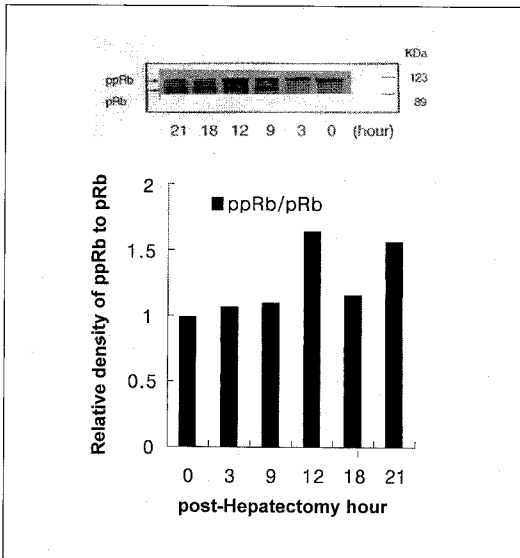


Fig 2. Rb phosphorylation status Homogenates from various time-points were subjected to SDS-PAGE on a 7.5% gel and immunoblotted with anti-Rb monoclonal antibody(14001A, PharMingen). Enhanced chemiluminescence method was adopted for visualization. ppRb denotes hyperphosphorylated form of Rb protein whereas pRb denotes the hypophosphorylated one.

ed Rb의 비가 1.5배 정도 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig 2).

Immune complex kinase assay

GST-Rb 단백질을 기질로 사용하여 측정된 cyclin D1-associated Rb kinase 활성은 부분 간절제후 2-3 배 증가하였다. 활성증가는 술후 3시간부터 관찰되었으며 술후 21시간까지 증가된 상태로 유지되었다(Fig 3).

이러한 cyclin D1-associated Rb kinase 활성의 증가가 Fig 2에서 관찰한 바, Rb 인산화 증가의 원인으로 생각된다.

Cyclin D1과 CDK4 단백질의 발현 및 결합에 있어서의 변화

Albrecht 등²의 보고와 달리 cyclin D1 및 CDK4 단백질의 양이 술후 증가하는 변화를 보였다. 이 현상은 이미 본 저자들의 이전 논문에서 두 가지 다른 항체를 사용하여 증명한 바 있다⁵. Cyclin D1 및 CDK4와는 달리 CDK2 단백질은 부분 간절제 이후

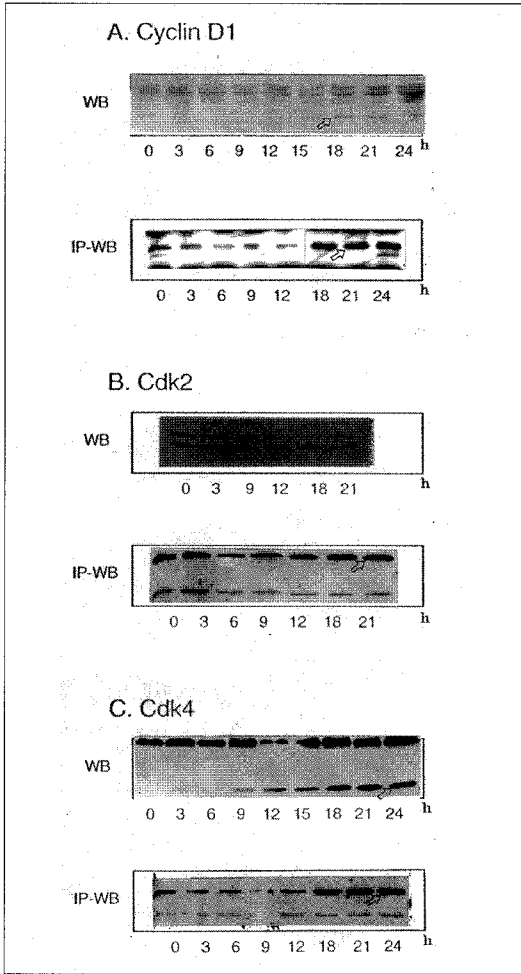


Fig 4. **Changes of cyclin D1 and cyclin D1-associated kinases** Changes in the protein level was detected by Western blot analysis using antibodies for each protein. Changes in the association with cyclin D1 was also detected by Western blot analysis following immunoprecipitation with anti-cyclin D1 antibody. Homogenates at various time points were subjected to SDS-PAGE on a 12% gel, and immunoblot analysis was performed by using anti-cyclin D1 antibody(A:WB), anti-CDK2 antibody(B:WB), and anti-CDK4 antibody(C:WB). Also, immunoprecipitation experiments by using anti-cyclin D1-conjugated agarose were performed, and the immunoprecipitated proteins were also subjected to SDS-PAGE on a 12% gel, and immunoblot analysis was performed by using anti-cyclin D1 antibody(A:IP-WB), anti-CDK2 antibody(B:IP-WB), and anti-CDK4 antibody(C:IP-WB). Each arrow denotes specific protein band.

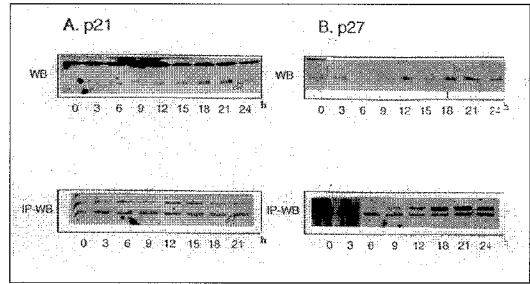


Fig 5. **Changes of CDK inhibitors** Homogenates at various time points were subjected to SDS-PAGE on a 15% gel, and immunoblot analysis was performed by using anti-p21 antibody(A:WB) and anti-p27 antibody(B:WB). Also, immunoprecipitation experiments by using anti-cyclin D1-conjugated agarose were performed, and the immunoprecipitated proteins were also subjected to SDS-PAGE on a 15% gel, and immunoblot analysis was performed by using anti-p21 antibody(A:IP-WB) and anti-p27 antibody(B:IP-WB). Each arrow denotes specific protein band.

에도 양적인 변화가 없었다. CDK가 활성을 나타내기 위해서는 cyclin과 결합하여야 한다. 활성형인 CDK의 양을 측정하기 위하여 항-cyclin D1 항체로 면역침전을 시행한 후 면역 침전내의 CDK2,4의 양을 Western blotting으로 측정하였다. CDK2의 경우 양의 변화가 거의 없었는데 반해 CDK4는 2-3배 정도, cyclin D1과의 결합이 증가함을 볼 수 있었다 (Fig 4).

CKI의 변화

p21이나 p27 단백질은 cyclin-CDK 복합체의 기능을 억제하여 CDK의 활성을 저하시키는 저해 단백질이다. 이러한 단백질들이 상피세포가 G₀ 상태를 유지하는데 중요한 역할을 한다는 보고가 있으므로 간 절제후 그 양이 감소할 것을 예상하였다. Western blot 분석 결과 예상과는 달리 두 단백질의 양적인 감소를 관찰할 수 없었고, 오히려 p21 단백질의 증가를 볼 수 있었다. 한편 cyclin/CDK 복합체에 결합한 p21 및 p27 단백질의 양을 측정하였는데, p21 단백질은 결합양에 거의 변화가 없었고, p27 단백질은 그 결합이 2-3배 가량 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig 5).

고찰

대부분의 간세포는 분열을 멈춘 소위 G₀ 상태의 세포이다. 이 상태로 존재하던 세포들은, 그러나 적절한 자극이 가해지면 다시 세포분열을 재개하게 된다. 이러한 자극들로는 lead nitrate, ethylene dibromide, hypolipidemic peroxisome proliferators, cyproterone acetate, cyclosporine 등의 "direct mitogen"¹⁹과 70% 간 부분 절제, CCl₄, D-galactosamine 등의 간손상이 알려져 있는데, 가장 극적인 상태를 볼 수 있는 대표적인 모델이 간 부분 절제 모델이다. 이 모델은 다음과 같은 몇 가지 특징을 갖고 있어 간세포의 분열에 관하여 연구하는데 있어 좋은 모델이 된다. 즉, 1) 간세포들이 거의 동시성(synchronous)인 상태에서 세포주기가 출발해서 치밀한 조절을 받으며, 2) G₁ 기가 상당히 길고, 3) 초기 3일 동안에는 주로 간 실질세포의 분열이 일어나므로 비 실질 세포의 분열과 관련된 현상들이 영향을 적게 미치는 등²⁰, 간세포의 세포분열 개시점에 초점을 두는 연구의 모델로서 뛰어난 장점을 갖고 있다.

세포의 분열에 있어서는 cyclin과 CDKs 그리고 CKIs 및 Rb, p53 등 세포주기 조절자들이 세포주기에 있어 적절한 시점에 발현되어, 세포주기가 진행 또는 정지하는데 있어 필수적인 역할을 한다. 간절제 모델에 있어서도 전술한 바와 같이 치밀한 조절을 받고 있는데, 그간 여러 실험실에서 이루어진 실험에 근거하여 보면, 70% 간절제후 간세포들은 상당히 긴 G₀/G₁ 기를 가진다. 보고자마다 약간의 차이가 있지만, Sprague-Dawley 흰쥐에 있어서는 18시간 이후에나 thymidine 의 이입이 감지된다². 이 시간동안 G₀ 상태로 존재하던 간세포가 G₁ 기에 들어가고, 다시 G₁/S check point를 거치게 된다. 이 동안에 정상 상태에서는 거의 발현되지 않던 G₁ 기 cyclin들, 즉 cyclin D1 및 cyclin E, 그리고 CDK4 단백질이 양적으로 증가하게 된다⁵⁷. 본 논문에서는 한 걸음 더 나아가 cyclin D1과 CDK4간의 결합이 증가함을 보여 주었다. 전술한 바와 같이 CDK들이 활성을 갖기 위해서는 cyclin과 결합하여야 한다. 따라서 cyclin D1과 CDK4 간의 결합이 증가된 것은 실제 CDK4의 활성이 증가하였을 가능성을 강하게 시사하고 있다. 반면 CDK2의 경우에는 그 양에

변화가 없고 cyclin D1과의 결합에도 변화가 없었다. 물론 cyclin E와의 결합 정도가 달라져 있을 가능성은 배제할 수 없다.

그렇지만 현시점에서는 간절제후 cyclin D1-associated Rb kinase 활성이 증가하였는데 여기에는 적어도 부분적으로 cyclin D1 및 CDK4의 증가, 그리고 그 결합형의 증가가 원인일 것이라고 생각할 수 있다.

G1 cyclin 및 그와 관련된 CDK들의 활성은 CKI에 의해서도 조절된다. 본 연구자들은 흰쥐의 간절제 모델에서 G1 cyclin 단백질의 양적 변화와 더불어 CKI의 변화에 따라 CDK 활성이 조절되고 있을 가능성을 살펴보았다. 그 결과 p27은 약간 증가하였고, p21은 상당히 증가함을 알 수 있었다⁵. 이렇게 부분 간절제후 p21 및 p27이 증가하는 현상은 다른 보고자들도 역시 관찰한 바 있다^{6,7,16}. 본 논문에서는, 양적인 변화외에 그 활성에 영향을 미칠 수 있는 요소인 cyclin D1/CDK 복합체와의 결합을 측정하였다.

흥미롭게도 양적인 증가를 뚜렷이 보였던 p21 단백질의 cyclin D1/CDK 복합체 결합은 거의 변화가 없었던데 반하여 그 변화가 뚜렷치 않았던 p27 단백질의 cyclin D1/CDK 복합체 결합은 상당히 증가하였다.

이러한 결과는 세포주기가 G₀에서 G₁으로 넘어가면서, cyclin D1/CDK 복합체가 p27 단백질에 결합하여 자유 상태의 p27 단백질을 일정한 수준 이하로 낮춘다는 모델²¹에 잘 부합되는 소견이라 하겠다. p21 단백질의 경우, 비록 CKI의 하나이나 사람의 섬유아세포에 있어 세포 주기의 진행동안 G1과 G2/M에서 mRNA의 peak가 나타나는 등 세포주기의 진행에 따라 반드시 그 양이 줄어드는 것이 아니며²², 저농도로 존재할 때는 일종의 매개체로 작용, cyclin D1/CDK 복합체의 생성을 증가시키는데 반해 농도가 높아져 더 많은 p21이 결합하면 기왕에 형성된 cyclin D1/CDK 복합체의 활성을 저해하는 등 양면적인 역할을 한다는 보고가 있다²³. 그렇지만 저자들이 관찰한 바, cyclin D1/CDK 복합체에 결합한 p21의 양이 간절제후 거의 변화가 없다는 사실은 이러한 일반적인 설명이 간세포에서는 적용되지 않을 가능성을 시사해준다.

요약

(목적) 쥐의 간절제후 재생과정에서 G₀ 상태의 세포들이 G₁ 상태로 가게되는 변화에 동반되는 세포주기 조절자들의 양적, 질적 변화를 알아본다.

(방법) 간절제후 일정한 시간 간격으로 간조직을 얻어, Western blotting으로 양적인 변화를 확인하고 세포주기 조절자들의 결합 정도를 면역침전후 Western blotting하여 알아보며, Rb 단백질을 기질로 사용하여 인산화 효소 활성의 변화도 측정하였다.

(결과) 부분 간절제후 18시간에 DNA 합성이 유의하게 증가하였으며, 21-24 시간에 peak에 도달하였다. 세포내 Rb 단백질의 인산화가 이 시간 동안에 증가하였고, 재조합 Rb 단백질을 기질로 하여 cyclin D1에 결합되어있는 Rb 인산화 효소의 활성을 측정한 결과 역시 2-3배 증가하였다. 이러한 Rb 인산화 효소의 활성증가는 cyclin D1 및 CDK4의 양적인 증가 및 그 결합형의 증가와 동반되었다. 한편 CDK 저해 단백질인 p21과 p27은 기대와 달리 간절제후 증가하는 양상을 보였으며, cyclin D1/CDK 복합체와의 결합도 증가하는 양상을 보였다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(기초의학 97-105)에 의하여 연구되었다.

참고 문헌

1. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver; Restoration of the liver of the white rats following partial surgical removal. Arch. Pathol. 1931. 12:186-202
2. Loyer P, Glase D, Cariou S, Baffet G, Meijers L, Guguén-Guillouzo C. Expression and activation of Cdk(1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. J. Biol. Chem. 1994. 269:2491-2500
3. Albrecht JH, Hu MY, Cerra FB. Distinct patterns of cyclin D1 regulation in models of liver regeneration and human liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. 209:648-655
4. Lu XP., Koch KS, Lew DJ et al. Induction of cyclin mRNA and cyclin-associated histone

- H1 kinase during liver regeneration. J. Biol. Chem. 1992. 267:2841-2844
5. Cho HS, Lim IK, Lee, JH. Changes in the expression of cell cycle regulators during rat liver regeneration after partial hepatectomy. Experimental and Molecular Medicine 1996. 28:187
6. Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, Evers BM. Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. Surgery 1997. 122:927-935
7. Rininger JA, Goldsworthy TL, and Babish JG. Time course comparison of cell-cycle protein expression following partial hepatectomy and WY14,643-induced hepatic cell proliferation in F344 rats. Carcinogenesis 1997. 18:935-941
8. Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases(CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors(CKIs). Oncogene 1995. 11:211-219
9. Elledge SJ, Harper JW. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. Curr. Opin. Cell Biol. 1994. 6:847-852
10. Xiong Y, Hannon G, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 1993. 366:701-704
11. Polyak K., Kato JY, Solomon MJ. et al. P27^{KIP1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links TGF-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes and Dev. 1994. 8:9-22
12. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C et al. p57^{KIP2}, a structurally distinct member of the p21^{CIP1} Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. Genes and Dev. 1995. 9:650-662
13. Parker SB, Eidhele G, Zhang P et al. p53-independent expression of p21^{CIP1} in muscle and other terminally differentiating cells. Science 1995. 267:1024-1027
14. Halevy O, Novitch BG, Spicer DB et al.

- Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by Myo D. *Science* 1995. 267:1018-1021
15. Kato J, Matsuoka M, Polyak M, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor(p27^{KIP1}) of cyclin Dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994. 79:487-496
 16. Albrecht JH, Meyer AH, Hu MY. Regulation of cyclin Dependent kinase inhibitor p21 gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology* 1997. 25:557-563
 17. Terasaki M, Kuriki H, Nimura Y, Shionoya S, Kojima K, Yoshida S. Induction of DNA replication and cell growth in rat liver by obstructive jaundice. *Jpn. J. Cancer Res.* 1991. 82:170-175
 18. Mutsushime H., Quelle DE., Shurtleff SA, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin Dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 1994. 14:2066-2076
 19. Shinozuka H, Kubo Y, Katyal SL et al. Roles of growth factors and of TNF-alpha on liver cell proliferation induced in rats by lead nitrate. *Lab. Invest.* 1994. 71:35-41
 20. Le Jossic C., Ilyin GP, Loyer P, Glaise D, Cariou S, Guguen-Guillouzo C. Expression of helix-loop-helix factor Id-1 is dependent on the hepatocyte proliferation and differentiation status in rat liver and in primary culture. *Cancer Research* 1994. 54:6065-6068
 21. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 1994. 79:551-555
 22. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994. 9:2261-2268
 23. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF et al. New functional activities for the p21 family of Cdk inhibitors. *Genes Dev.* 1997. 11:847-862