

The Effect of Epidermal Growth Factor on Cell Proliferation and Its Related Signal Pathways in Pig Hepatocytes

Dong-il Kim, Ho-jae Han and Soo-hyun Park[†]

Bio-therapy Human Resources Center, Department of Veterinary Physiology,
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

It has been reported that liver is a very important organ to xenotransplantation. Pig is known to be a most suitable species in transplantation of human organs. However, the physiological function of pig hepatocytes is not clear elucidated. Epidermal growth factor (EGF) is known to be a mitogen in various cell systems. Thus, we examined the effect of EGF on cell proliferation and its related signal cascades in primary cultured pig hepatocytes. EGF stimulates cell proliferation in a dose (> 1 ng/ml) dependent manner. EGF-induced increase of [³H]-thymidine incorporation was blocked by AG 1478 (10^{-6} M, an EGF receptor antagonist) genistein and herbimycin A (tyrosine kinase inhibitors, 10^{-6} M), suggesting the role of activation and tyrosine phosphorylation of EGF receptor. In addition, EGF-induced increase of [³H]-thymidine incorporation was prevented by neomycin (10^{-4} M), U73122 (10^{-5} M) (phospholipase C [PLC] inhibitors), staurosporine (10^{-8} M), or bisindolylmaleimide I (10^{-6} M) (protein kinase C [PKC] inhibitors), suggesting the role of PLC and PKC. Moreover, EGF-induced increase of [³H]-thymidine incorporation was blocked by PD 98059 (a p44/42 mitogen activated protein kinase [MAPK] inhibitor), SB 203580 (a p38 MAPK inhibitor), and SP 600125 (a JNK inhibitor). EGF increased the translocation of PKC from cytosol to membrane fraction and activated p42/44 MAPK, p38 MAPK and JNK. In conclusion, EGF stimulates cell proliferation via PKC and MAPK in cultured pig hepatocytes.

Key Words: Epidermal growth factor, Protein kinase C, Mitogen activated protein kinase, Pig hepatocytes

서 론

인간에게서 이종 장기이식은 최근 화두로 떠오르고 있다. 인간과 면역학적 유사성 때문에 영장류가 가장 적절한 장기 원이지만, 윤리학적 문제와 더불어 대단위 육성 및 신속한 성장의 장애 때문에 이들의 사용은 호의적이지 않고 있다. 장기를 인간에게 이식할 경우 가장 적합한 동물은 insulin 생성, 포도당 조절이 인간과 유사하고 신속한 성장이 된다는 점에서 돼지가 가장 각광을 받고 있다 (Saif et al., 1996; Miller & Ullrey, 1987). 돼지 태아의 췌장세포를 당뇨병 환자에게 이식 보고 및 돼지의 간세포를 간질환 환자에게 이식했다는 보고 역시 이를 뒷받침 해주고 있다 (Groth, 1995; Tector et al., 2001). 최근 돼지의 간세포 배양을 통한 인공장기의 구축이 필요하다고 하는 보고 역시 간이식에 있어서 간세포가

중요성을 갖는다고 하겠다 (Li et al., 2005).

간세포의 성장은 간의 이식 등에 있어서 세포 손상에 대한 보상기전으로 이용되고 있다 (Fausto & Riehle, 2005). 이러한 간세포의 성장에는 다양한 세포성장인자들이 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Michalopoulos, 1990). 간세포에서 Insulin like growth factors (IGFs) 및 hepatocyte growth factor (HGF)가 세포성장을 증가 시킨다고 보고되었다 (Kimura & Ogihara, 1997b; 1998). EGF 역시 간세포의 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Kong et al., 2000; Tsai et al., 2001). EGF는 수용체에 결합하여 이량화를 유도하여 tyrosine kinase 잔기에 자가인산화가 되어 EGF 수용체 복합체의 활성을 야기하여 세포기능에 관여하는 것으로 알려져 있지만 (Yarden & Sclessinger, 1987), 돼지의 간세포에서 EGF의 세포성장을 비롯한 세포기능에 대한 보고는 이루어지고 있지 않고 있다.

일반적으로 세포에 대한 성장 효과는 다양한 신호전달계가 관여한다. 이들 중 protein kinase C (PKC)는 phospholipase C (PLC)의 PIP₂ 분해에 의한 DAG 활성화에 의해 활성화되며 세포성장 등의 다양한 세포내 반응 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Musashi et al., 2001). Mitogen activated protein kinases (MAPKs)는 일반적으로 p44/42 MAPK, p38 MAPK 및

*논문 접수: 2006년 8월 18일

수정재접수: 2006년 8월 28일

[†]교신저자: 박수현, (우) 500-757, 광주광역시 북구 용봉동 300, 전남대학교 수의과대학 생리학교실
Tel: 062-530-2832, Fax: 062-530-2809
e-mail: parksh@chonnam.ac.kr

SAPK/JNK으로 구분이 되며 세포의 성장 및 스트레스 등의 다양한 반응에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Bogatcheva et al., 2003). 이러한 보고들은 PKC 및 MAPK의 활성이 EGF에 의한 간세포 성장에 신호전달 매개체로 작용할 수 있음을 말해 주고 있다. 그러나 지금까지 이에 대한 연구는 미약한 실정에 있다. 따라서 본 실험에서는 돼지의 간세포를 초대 배양하여 EGF가 세포 성장에 미치는 효과와 이와 관련된 신호전달계에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase는 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose, staurosporine, H-7, PD 98059는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Bisindolylmaleimide I, SB 203580 및 SP 600125는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 실험에 이용된 모든 시약들은 고품질의 시약을 사용하였다.

2. Hepatocyte의 초대 배양

간세포는 2~3 kg 돼지를 이용하여 분리하였다. Li 등 (2005)에 의해 발표된 두 단계의 collagenase 관류 방법이 이용되었다. 간단히 기술하면 isoflurane/O₂ 마취를 시도한 후 복경중선을 따라 개복을 실시하였다. 이후 문맥의 아랫부분을 결찰한 후 catheter를 삽입한 후 30 mM HEPES가 들어 있는 Mg²⁺/Ca²⁺이 없는 Hanks buffer로 37°C에서 약 10분 동안 관류 시켰다. 이후 0.05% type I collagenase가 있는 Eagle's 배지로 교환하였다. 이후 분리된 간을 petri dish에 놓고 Glisson 피막을 벗긴다. 세포수는 5×10⁵ 정도의 세포로 배양 시켰다. 세포의 생존율은 trypan blue exclusion 방법을 이용하여 실시하였으며 생존율이 90%가 넘는 경우에만 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 돼지들은 실험동물사에서 사육되었고 실험 기간 동안 사육 환경은 23±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하였고, 인공조명 (12시간 점등, 12시간 소등)하에서 사육하였으며, 사료와 정제수는 자유로이 급여하였다. 모든 실험은 서울대학교 실험동물연구지원센터 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 동물실험 표준작업지침서 (Standard Operation Procedures [SOP])에 따라 수행되었다.

3. [³H]-thymidine incorporation

간세포들이 50~60% 성장하여 subconfluent를 형성하였을 때, 배지를 교환하였다. [³H]-thymidine incorporation 실험은

Brett 등 (1993)에 의해 기술된 대로 실시하였다. 세포들에 1 μCi의 [³H]-thymidine을 투여 후 4시간 후에 시료를 처리하여 8시간 배양 시킨 후 실험에 사용하였다. 세포들은 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척한 후 10% trichloroacetic acid (TCA)에서 15분간 고정시켰다. 이후 5% TCA를 5분간 2번 세척을 하였다. 산에 불용성인 부분을 실온에서 2N NaOH를 처리하여 Liquid scintillation counting에 의하여 방사성을 측정하였다. 실험결과는 대조군의 %로 보정하였다.

4. Western immunoblotting

배지를 제거한 간세포를 PBS로 2번씩 세척한 후, 각기 150 μl의 lysis buffer (10× PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A)를 처리하여 균질화를 시켰다. 균질화된 세포를 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 각각 60 μg의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 차단을 시켰고, 각각의 항체 (CDK-2, CDK-4, p27 kip1, p21 WAF1/Cip1, p44/42 MAPK, p38 MAPK, pJNK)를 1% skim milk에 1,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1× TBS에 10분 간격으로 3번 세척하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 배양한 후, 3번 세척을 거쳐서 ECL 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

5. 통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P 값 <0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means ± S.E로 하였다.

결 과

1. EGF가 간세포 성장 및 세포성장 조절 단백질에 미치는 효과

EGF가 간세포의 세포 성장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 EGF를 농도별로 (0~1,000 ng/ml) 처리한 후 thymidine incorporation 실험을 실시하였다. 실험결과 0.1 ng/ml에서는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 1 ng/ml 이상에서 유의성 있는 증가 작용이 인정되었으며 이러한 작용은 100 ng/ml에서 가장 큰 효과를 보였다 (Fig. 1). 이러한 EGF가 세포성장 조절 단백질들과 어떠한 관련이 있는지를 western immunoblotting을 실시하여 알아보았다. Figure 2에서

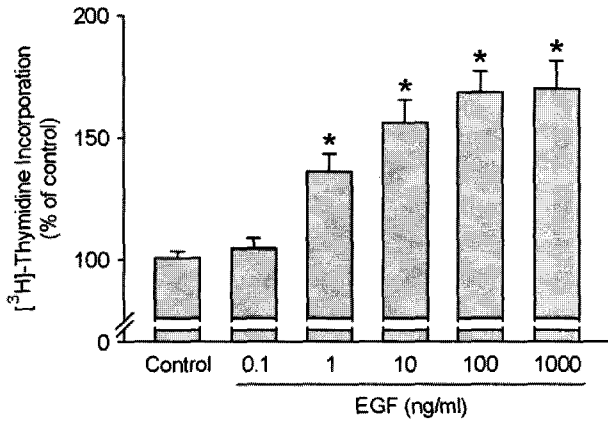


Fig. 1. Dose response curve of EGF on cell proliferation. Pig hepatocytes were incubated with different dosage of EGF (0 to 10^{-6} g/ml). Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control.

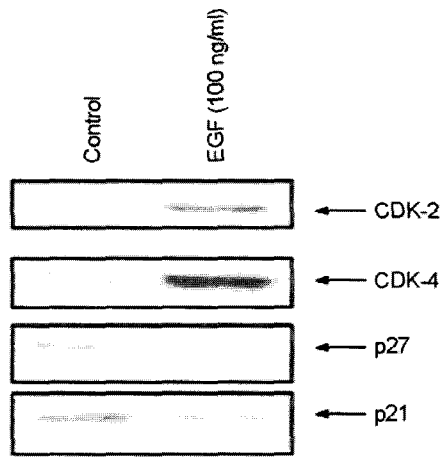


Fig. 2. Effects of EGF on CDK-2, CDK-4, p27 kip1, and p21 WAF1/Cip1. Pig hepatocytes were incubated with EGF (100 ng/ml) for 8 hr. CDK-2, CDK-4, p27, and p21 were detected as described in "Materials and Methods".

보이듯이 100 ng/ml의 EGF를 처리한 결과 CDK-2 및 CDK-4의 발현은 증가 시켰으나, p27 Kip1 및 p21WAF1/Cip1의 발현은 감소 시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

2. EGF에 의한 세포성장에 있어서 PKC 및 MAPK 활성과의 관련성

EGF에 의한 세포성장 효과가 수용체 특이적인지를 알아보기 위하여 EGF 수용체 길항제인 AG1478 (10^{-6} M)을 EGF 처리 30분 전에 처리하였다. 실험결과 EGF에 의한 세포성장 효과는 선택적으로 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 아울러, 어떠한 신호전달경로를 통하여 작용하는지를 알아보기 위하여 tyrosine kinase 억제제인 genistein (10^{-6} M) 및 herbimycin A (10^{-6} M)를 EGF 처리 30분 전에 처리하였다. Figure

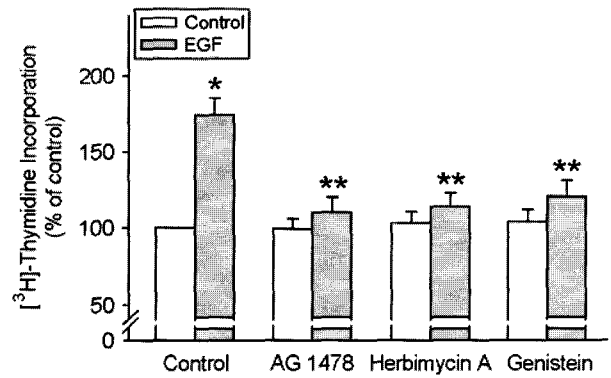


Fig. 3. Effect of AG1478, herbimycin A and genistein on EGF-induced cell proliferation. Pig hepatocytes were incubated with AG1478 (10^{-6} M), herbimycin (10^{-6} M) and genistein (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of EGF (100ng/ml) for 8 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. EGF alone.

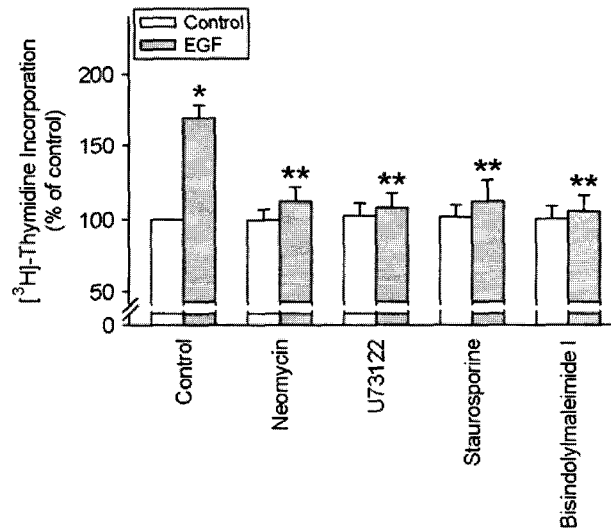


Fig. 4. Effects of PLC and PKC inhibitors on EGF-induced cell proliferation. Pig hepatocytes were incubated with neomycin (10^{-5} M), U73122 (10^{-6} M, PLC inhibitors), staurosporine (10^{-7} M), and bisindolylmaleimide I (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of EGF (100 ng/ml) for 8 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. EGF alone.

3에서 보이듯이 genistein 및 herbimycin A는 EGF에 의한 세포성장 효과를 선택적으로 차단하였다 (Fig. 3). EGF에 의한 세포성장이 PLC/PKC 경로와 관련하는지를 알아보기 위하여 PLC 억제제들인 neomycin 및 U73122 및 PKC 억제제들인 staurosporine 및 bisindolylmaleimide I을 처리하여 실험한 결과 EGF에 의한 세포성장 효과는 선택적으로 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 실제로 EGF 처리 시 세포질에서 세포막으로의 PKC의 이동을 볼 수 있었다 (Fig. 5). MAPK와의 관련성을 알아보았다. EGF에 의한 세포성장 촉진 작용은 PD

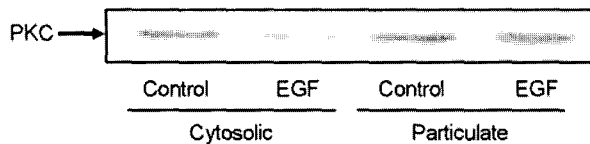


Fig. 5. Effect of EGF on PKC activation. Pig hepatocytes were treated with EGF (100 ng/ml) for 8 hr. Then, cytosolic and particulate fraction was separated as described in "Materials and Methods".

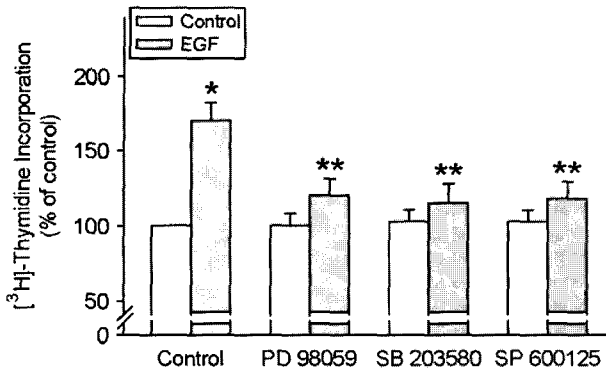


Fig. 6. Effects of MAPKs inhibitors on EGF-induced cell proliferation. Pig hepatocytes were preincubated with SB 203580, PD 98059, and SP 600125 (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of EGF (100 ng/ml) for 8 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. EGF alone.

98059 (p44/42 MAPK 억제제), SB 203580 (p38 MAPK 억제제) 및 SP 600125 (JNK/SAPK 억제제) 처리 시 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 6). 실제로 MAPKs의 활성을 측정하여 본 결과 EGF 처리 시 p44/42 MAPK, p38 MAPK 및 JNK 활성 모두 5분에서 증가하는 것으로 나타났으며 이후 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

고찰

최근 여러 연구자들에 의해서 이중 장기이식에 있어서 간의 중요성을 인식하고 돼지 간세포의 생리학적 기능을 알아보고자 돼지의 간세포 배양법 연구를 시도하고 있다 (Jasmund et al., 2002; Chen et al., 2002). EGF는 세포 손상 등에 의한 간세포의 재생에 있어 중요한 역할을 한다 (Yamamoto, et al., 2005; Oosthuizen & Lambrechts, 2004). 본 연구결과에서는 EGF 처리 시 돼지 간세포에서 CDK-2 및 CDK-4의 발현이 증가하였으며 p21 및 p27의 경우는 감소하는 것으로 나타났다. 이는 세포주기 중 G1기의 단축을 통해 EGF가 세포성장을 증가시킨다는 것을 의미하고 있다. 이러한 결과는 Thevananther 등 (2004)의 결과에서 EGF 처리 시 cyclin D1이 증가한다는 보고에 근거하여 볼 때 cyclin D는 CDK-4 및 CDK-6와 복합체를 형성하여 세포내의 세포주기에 관여

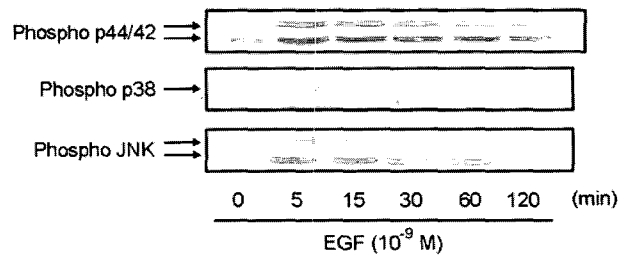


Fig. 7. Effects of EGF on MAPKs activation. Pig hepatocytes were treated with EGF (100 ng/ml) for different time (0 to 120 min). Then, phosphorylated p38, JNK, p44/42 MAPKs were detected as described in "Materials and Methods".

하기 때문에 본 연구결과에서는 cyclin D1은 측정은 하지 않았지만 일맥상통하는 것으로 판단된다. 최근 Barone 등 (2006)은 간세포에서 세포성장 촉진 작용에는 cyclin D1, p21 및 p27 등의 단백질들의 변화를 통한 G1기를 단축시켜 작용한다고 하여 본 연구결과를 뒷받침해 주고 있다.

EGF는 세포막의 EGF 수용체에 결합을 하여 작용을 나타낸다. 이들 수용체는 tyrosine 잔기를 가지고 있으며 이들의 기능이 중요한 역할을 하는 것으로 일반적으로 알려져 있다 (Hsieh & Conti, 2005; Jorissen et al., 2003). 본 실험에서도 역시 EGF에 의한 세포성장 시에 tyrosine 잔기의 활성이 필수적인 것으로 나타났다. Tyrosine kinase 수용체를 함유하고 있는 EGF는 간세포의 성장을 위하여 PLC- γ 의 직접적인 활성화로 인하여 phosphatidyl inositol (1,4,5) triphosphate 및 PKC 활성제인 diacylglycerol 같은 2차 전달 물질을 생산하는 것으로 보고되었다 (Berridge, 1993). 이러한 보고와도 일치하게 본 실험에서도 PLC 억제제 및 PKC 억제제에 의해서 간세포의 세포성장 효과는 유의성 있게 차단되어 PLC 및 PKC의 활성이 EGF에 의한 세포성장 촉진 작용에 관여한다는 것을 볼 수 있었다. 본 실험에서는 EGF 처리 시 세포질에서 세포막으로의 PKC 활성이 유도된다는 사실을 증명하였고 나아가 이러한 PKC의 활성이 세포성장에 영향을 미친다는 것까지 증명하였다. 비록 본 실험에서는 PKC의 isoforms들에 대해서는 살펴보지 않았다. 이에 대한 연구는 향후 연구에서 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

MAPKs는 몇몇 세포의 자극에 의해서 활성화 되며 다양한 세포내 신호전달경로에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (MacCorkle & Tan, 2005). Gao 등 (2004)은 초대 배양한 랫트의 간 위성세포에서 p44/42 MAPK 활성이 세포성장인자에 의한 세포성장 효과에 관여하는 것을 보고하여 간세포에서도 이러한 p44/42 MAPK 활성이 세포성장 촉진 효과에 미칠 수 있다는 가능성을 보여 주었다. 본 실험에서는 EGF에 의한 세포성장은 p44/42 MAPK 억제제인 PD 98059에 의해서 차단되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 세포는 다르지만 최근 Heo 등 (2006)에 의한 마우스 배아세포에서

p44/42 MAPK의 활성이 EGF에 의한 세포성장 효과에 관여한다는 결과와 일치하였다. Choi 등 (2004)은 ERK1/2 이외에도 JNK/SAPK 활성이 세포 성장에 함께 관여할 수 있다고 하였으며, 간세포에도 세포 성장의 효과에 JNK 및 p38 MAPK 활성이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Thevananther et al., 2004; Awad et al., 2000). 본 실험에서는 흥미롭게도 p44/42 MAPK 이외에도 JNK/SAPK 및 p38 MAPK 활성 모두가 EGF에 의한 세포 성장 촉진 효과에 주요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 간세포의 EGF에 세포 성장 효과 규명뿐만 아니라 향후 이종 장기 영역에서 돼지에 대한 생리학적 자료가 매우 부족한 관계로 인하여 돼지 간세포의 기능성 연구에 기초자료로 활용될 것으로 사료된다. 결론적으로 돼지의 간세포에서 EGF는 PKC 및 MAPK 활성을 통해 세포 성장을 유도하는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림부 바이오장기 생산 연구사업의 연구비 (번호 200503010302) 및 BK21 바이오치료 산업인력 양성사업팀의 지원을 받아 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

- Awad MM, Enslin H, Boylan JM, Davis RJ, Gruppuso PA. Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. *J Biol Chem*. 2000. 275: 38716-38721.
- Barone M, Ladisa R, Di Leo A, Spano D, Francioso D, Aglio V, Amoroso A, Francavilla A, Iolascon A. Estrogen-induced proliferation in cultured hepatocytes involves cyclin D1, p21(Cip1) and p27(Kip1). *Dig Dis Sci*. 2006. 51: 580-586.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993. 361: 315-325.
- Bogatcheva NV, Dudek SM, Garcia JG, Verin AD. Mitogen-activated protein kinases in endothelial pathophysiology. *J Investig Med*. 2003. 51: 341-352.
- Brett CM, Washington CB, Ott RJ. Interaction of nucleoside analogues with the sodium-nucleoside transport system in brush border membrane vesicles from human kidney. *Pharmacol Res*. 1993. 10: 423-426.
- Chen Z, Ding Y, Zhang H. Morphology, viability and functions of suckling pig hepatocytes cultured in serum-free medium at high density. *Dig Surg*. 2002. 19: 184-191.
- Choi J, Park SY, Joo CK. Hepatocyte growth factor induces proliferation of lens epithelial cells through activation of ERK1/2 and JNK/SAPK. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004. 45: 2696-2704.
- Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005. 12: 181-189.
- Gao R, Ball DK, Perbal B, Brigstock DR. Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2004. 40: 431-438.
- Groth CG. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1995. 345: 735.
- Heo JS, Lee YJ, Han HJ. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺ influx and p44/42 MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006. 290: C123-C133.
- Hsieh M, Conti M. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. *Trends Endocrinol Met*. 2005. 6: 320-326.
- Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A. Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog*. 2002. 18: 839-846.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 2003. 284: 31-53.
- Kimura M, Ogihara M. Effects of insulin-like growth factor I and II on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*. 1998. 354: 271-281.
- Kimura M, Ogihara M. Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997. 282: 1146-1154.
- Kong M, Mounier C, Wu J, Posner BI. Epidermal growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation and DNA synthesis. Identification of Grb2-associated binder 2 as the major mediator in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 2000. 275: 36035-36042.
- Li J, Li LJ, Chao HC, Yang Q, Liu XL, Sheng JF, Yu HY, Huang JR. Isolation and short term cultivation of swine hepatocytes for bioartificial liver support system. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2005. 4: 249-253.
- MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys*. 2005. 43: 451-461.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J*. 1990. 4: 176-187.
- Miller ER, Ullrey DE. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1987. 7: 361-382.
- Musashi M, Ota S, Shiroshita N. The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol*.

2000. 72: 12-19.
- Oosthuizen MM, Lambrechts H. The prevalence and purification of hepatoproliferin: a liver regeneration factor from rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1674: 111-121.
- Saif LJ, Ward LA, Yuan L, Rosen BI, To TL. The gnotobiotic piglet as a model for studies of disease pathogenesis and immunity to human rotaviruses. *Arch Virol*. 1996. 12: 153-161.
- Tector AJ, Berho M, Fridell JA, DiCarlo A, Liu S, Soderland C, Barkun JS, Metrakos P, Tchervenkov JI. Rejection of pig liver xenografts in patients with liver failure: implications for xenotransplantation. *Liver Transplant* 2001. 7: 82-89.
- Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, Karpen SJ. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* 2004. 39: 393-402.
- Tsai JC, Liu L, Zhang J, Spokes KC, Topper JN, Aird WC. Epidermal growth factor induces Egr-1 promoter activity in hepatocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001. 281: G1271-G1278.
- Yamamoto T, Kojima T, Murata M, Takano K, Go M, Hatakeyama N, Chiba H, Sawada N. p38 MAP-kinase regulates function of gap and tight junctions during regeneration of rat hepatocytes. *J Hepatol*. 2005. 42: 707-718.
- Yarden Y, Schlessinger J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 1987. 26: 1434-1442.
-