

전기자극이 흰쥐 골격근의 핵소체형성부위 활성화에 미치는 영향

원광보건전문대학 물리치료과, 임상병리과*, 원광의료원 물리치료실**
이재형, 제갈승주*, 양연옥**

Abstract

Effect of Electrical Stimulation on the Nucleolus Organizer Region Activity

Rhee, Jae Hyoung · Jekal, Seong Joo* · Yang, Yun Ok**

Dept. of Physical Therapy, Clinical Pathology, Wonkwang Public Health Junior College*

*Dept. of Physical Therapy, Wonkwang University Medical Center***

This study was investigated to the nucleolar organizer regions (NOR)-associated protein by means of argyrophilic technique (Ag-NOR) in the healthy rat gastrocnemius muscle with low-frequency electrical stimulation. Ag-NOR technique is a direct measure of the ongoing transcriptional activity of the rRNA genes or their activity. The numbers of Ag-NORs sites within nucleus may reflect protein synthetic activity and hence, proliferation.

Ten Sprague-Dawley adult male rats were divided into control group and electrical stimulated group. The gastrocnemius muscles of the right leg were submaximally electrical stimulated with 30 Hz, 200 μ sec. After 4 weeks, the rats were sacrificed, and the muscle were removed, fixed by immersion, and processed for light microscopy.

The mean numbers of nucleolar organizer regions per nucleus were 0.9940 (± 0.0594) in the muscles of control group and 1.5160 (± 0.1141) in the muscles of electrical stimulated group ($p < .001$). There was a very good linear correlation between the mean numbers of Ag-NOR sites per nucleus and the numbers of nucleus per square micromillimeter ($r = .9234$).

The results suggest that the electrical stimulation increased protein synthesis in the rat gastrocnemius muscles.

ABSTRACT

- I. 서 론
- II. 연구대상 및 방법
 - 1. 실험재료
 - 2. 실험방법
 - 3. Ag-NOR 검사
 - 4. 자료분석
- III. 결 과
- IV. 고 찰
- V. 결 론
- 참고문헌

I. 서 론

수술 및 외상 등으로 장기간 고정을 하면 근위축이 초래되며,¹¹ 이러한 근위축을 개선하기 위해 지속적인 전기자극이 널리 이용되고 있다.^{2~8)} Salmons와 Henriksson,⁹⁾ Pette,¹⁰⁾ Lieber,¹¹⁾ Reddanna 등¹²⁾은 전기자극에 의해 골격근의 생리학, 생화학, 조직학적 특성이 변화하게 된다고 보고하였다. Joplin 등¹³⁾은 저주파 전기자극이 가토 골격근의 유전자 전사 및 번역활동을 증가시켜 핵산(nucleic acid) 및 단백질합성이 증가한다고 보고하였고, Starnes 등¹⁴⁾도 흰쥐 비복근에 전기자극을 가하여 단백질합성이 증가하였음을 보고하였으며, 이는 근수축에 따른 전기반응에 기인한다고 하였다.

근위축의 기전을 규명하기 위해 근단백 turnover 변화에 대한 연구가 이루어져 왔으며,^{15~17)} 장기적인 근소모(muscle wasting)시에 근육 단백질합성이 저하된다 하였다.¹⁸⁾ 전기자극에 의해 Ca 수송 및 결합에 대한 단백질의 역할변화에 따라 근섬유형이 명백하게 변화되며¹⁹⁾ 이와같은 근섬유의 단백질변화는 유전자 수준(gene level)에서의 조절(regulation)결과라 하였다.^{10,20,21)} McGurk,²²⁾ Pette¹⁰⁾ 등은 전기자극으로 근육에서 RNA 농도와 단백질합성이 변화하였다고 보고하였으며 이러한 변화는 특히 근핵의 변화와 관계가 있다 하였고, McGurk²²⁾는 전기자극에 따라 핵의 DNA level 함량이 2~3배 증가하였다고 보고하였다.

조직절편에서 단백질합성을 분석하는 방법으로는 Thymidine 표지법,²³⁾ 유식세포분리분석법·flow cytometry,²³⁾ Bromodeoxyuridine BrdU 흡수도 측정,²⁴⁾ Ki 67항체를 이용한 면역조직화학방법²⁵⁾ 등이 이용되지만 방법이 복잡하고 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

최근에 핵소체 형성부위(nucleolar organizer region)를 은 콜로이드로 염색하여 단백질합성을 간접적으로 확인하는 간편한 방법이 소개되었다.²⁶⁾ Hara²⁷⁾ 등은 평균 NOR 수와 Ki-67 양성세포의 핵분율과의 상관관계가 매우 높았으며($r = .91$), Crocker 등²⁸⁾은 유식세포분리분석법과 Ag-NOR 방법을 비교한 결과 핵당 평균 NOR 수와 합성기세포(S phase cell)의 핵분율과의 상관관계가 매우 높다고 보고하였고, Courvalin 등²⁹⁾도 면역반응단백(immunoreactive protein) 함량과 핵내 NOR 수 간에 상관관계가 좋다고 보고하여 Ag-NOR법으로 단백질합성을 쉽게 평가할 수 있음을 시사하였다.

그러나 Ag-NOR 염색방법은 국내외에서 몇몇 장기질환이나 종양세포에서의 Ag-NOR 수를 산정하여 세포증식에 대한 지표로 응용하는데 한정되어 연구되어 왔을 뿐^{30~35)} 골격근에서의 Ag-NOR 수의 변화에 대한 연구가 거의 시도되지 않았다.

따라서 본 실험에서는 전기자극이 골격근의 단백질합성에 어떠한 영향을 미치는지를 규명할 목적으로 건강한 흰쥐를 대상으로 비복근에 30 Hz, 200 μ sec의 조건으로 4주간 전기자극을 가한 다음 근핵내 평균 Ag-NOR의 수, 근핵내 Ag-NOR의 분포, 단위 면적당 근핵수의 변화를 관찰하였다.

II. 연구대상 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 동물은 체중 278.95(± 16.77) g인 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐 10마리를 무작위로 추출하여 1군에 5마리씩 2군으로 나누어 bioclean cage에서 고형사료(신촌 실험동물사료, 신촌 사료 주식회사, 서울)와 물을 먹이로 사육하였으며 명암주기는 자연광으로 하였다.

2. 실험방법

대조군은 어떠한 처치도 하지 않았으며, 실험군은 우측 하퇴부 후면과 우측 요부의 털을 깎아낸 후, 전극풀을 바르고 활성전극은 우측 하퇴부 후면에, 비활성전극은 우측요부에 부착한 다음 주파수 30 Hz, 자극폭 200 μ m의 조건으로 10초 수축, 50초 휴식하는 방법으로 1회 처치시 10번씩 최대하 근수축을 유발시켰으며 주당 6회, 4주동안 전기자극을 가하였다. 전기자극시 안정이 필요할 때마다 sodium pentobarbital(중외제약주식회사, 서울) 20 mg/Kg을 복강내 주사하였다.

전기자극기는 Agar Stimulator 8000^a을 사용하였고 YEW Oscilloscope^b를 이용하여 자극조건을 확인하였다.

전극은 Single Patient Self-Adhering Electrode 9300^c을 사용하였으며 활성전극의 크기는 5×5 mm로, 비활성전극의 크기는 15×15 mm로 하였다.

전극풀은 Signa cream^d을 사용하였다.

3. Ag-NOR 검사

최종처치 후 실험동물에 sodium pentobarbital 치사량을 복강내 주사한 다음, 비복근을 완전 적출, 근복부를 절제하여 10% formalin 용액으로 고정한 후 alcohol 계열 탈수, xylene 투명과정을 거쳐 paraffin으로 포매한다음 Rotary Microtome 820^e을 사용하여 5 μ m 두께로 박절하여 절편을 만들었다. 이 절편을 유리 슬라이드에 정위치로 부착한 다음 xylene으로 탈과라핀하고 계열 alcohol 및 증류수에서 함수시킨 후 1% formic acid 용액에 gelatin을 2%가 되도록 녹인 용액과 50% silver nitrate 수용액의 비율이 1:2가 되도록 섞어 만든 silver colloid 용액에 넣어 실온 암소에서

30분간 반응시킨 후 증류수로 수세하고 탈수시켜 Canada balsam으로 봉입하였다. 이 표본을 광학현미경 유침렌즈하에서 근섬유에 나타난 세포핵 중 100개를 임의로 선정하여 개개의 세포핵 내에서 진하게 갈색으로 염색된 Ag-NOR의 수를 세어 평균가중치를 다음과 같은 공식으로 구하였고, 단위면적(1 μ m) 당 평균 근핵수를 구하였다.

평균 Ag-NOR 수

$$= \frac{\sum(\text{세포핵당 Ag-NOR 수} \times \text{세포핵수})}{100}$$

4. 자료분석

근핵내 Ag-NOR의 분포를 구하고, 근핵내 평균 Ag-NOR 수 및 단위면적당 근핵수를 대조군과 실험군간의 비교를 위해 각각 일원 분산분석(one-way ANOVA) 및 Student *t*-test를 시행하였으며, 근핵내 Ag-NOR 수와 단위면적당 근핵수간의 상관관계를 구하였다. 통계분석은 SPSS/PC⁺로 하였다.

III. 결 과

핵은 연한 갈색으로 염색되었고 NOR은 핵내에서 진한 갈색으로 염색되면서 경계가 분명한 적은 점으로 나타났는데, 핵당 평균 Ag-NOR 수와 핵내 Ag-NOR의 분포는 표 1, 2와 같으며 일원 분산분석 결과는 표 3과 같았다.

핵내 평균 Ag-NOR 수는 대조군과 실험군이 각각 0.9940 ± 0.0594 , 1.5160 ± 0.1141 로 실험군이 대조군보다 유의하게 증가하였다($p < .001$) (그림 1).

a : Ginosar Electronics & Metal Products, Germany

b : Yokogawa Hokushin Electric, 9-32, Nakacho 2-chome, Musashino-shi, Tokyo, Japan

c : Medtronic Andover Medical, Lowell, Mass 01852, U.S.A.

d : Parker Laboratories, Inc., Orange, New Jersey 07050, U.S.A.

e : American Optical Corporation, Scientific Instrument Div., Buffalo, New York, 14215, U.S.A.

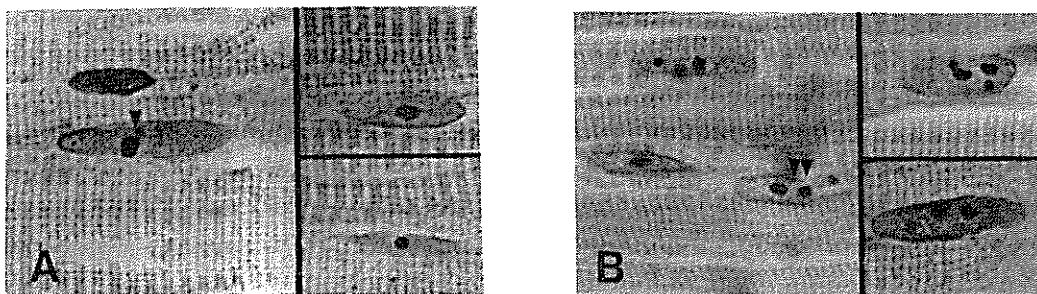


그림 1. Longitudinal sections of gastrocnemius muscles of the rats. Muscles are stained with silver colloid for demonstration of nucleolar organizer region. In muscles of control rats(A) showing zero or one NOR within muscle nucleus (arrowhead), but 4-week electrical stimulated muscles(B) showing numerous NORs within muscle nucleus (double arrowhead). All at x1,000.

큰 핵당 Ag-NOR의 분포는 대조군에서 Ag-NOR이 없는 경우가 $37.74 \pm 3.92\%$, 하나만 있는 경우가 34.50 ± 5.02 , 두개 있는 경우가 $23.11 \pm 1.82\%$, 세개 있는 경우가 4.45 ± 0.50 , 네개 있는 경우가 $0.20 \pm 0.43\%$ 로 핵내 Ag-NOR이 없거나 하나만 출현하는 비율이 72.24% , 두개 이상 출현한 비율이 27.86% 였음에 비해, 실험군에서 Ag-NOR이 없는 경우가 $14.20 \pm 3.11\%$, 하나만

있는 경우가 $42.42 \pm 8.10\%$, 두개 있는 경우가 $26.45 \pm 3.50\%$, 세개 있는 경우가 $12.11 \pm 3.77\%$, 네개 있는 경우가 $4.2 \pm 1.45\%$, 다섯개 있는 경우가 $0.62 \pm 0.46\%$ 로 핵안에 Ag-NOR이 없거나 하나만 출현한 비율이 56.62% , 두개 이상 출현한 비율이 43.38% 로 실험군에서는 핵 당 Ag-NOR 분포가 많았다.

표 1. Mean numbers and standard deviation of Ag-NORs per nucleus in gastrocnemius muscles of the rats

Group	Mean	SD	DE	95% CI
Control	0.9940	0.0594	0.0266	0.9202-1.0678
Experimental	1.5160*	0.1141	0.0510	1.3743-1.6577

* : $p < .001$

표 2. Distribution of Ag-NORs per nucleus in gastrocnemius muscles of the rats

Group	No. of Ag-NOR					
	0	1	2	3	4	5
Control(%)	37.74	34.50	23.11	4.45	0.20	0
Experimental(%)	14.20	42.42	26.45	12.11	4.10	0.73

표 3. Analysis of variance for mean numbers of Ag-NORs per nucleus in gastrocnemius muscles of the rats

Source	DF	SS	MS	F	P
Control	1	0.6812	0.6812	8.2 2717	0.0000
Experimental	8	0.0662	0.0083		
Total	9	0.7474			

단위면적당 근 핵의 수는 표 4에서 보는 바와 같고 이의 일원 분산분석 결과는 표 5와 같다. 정상군은 근섬유 1 μm^2 당 0.6500 \pm 0.1084였고, 실험군은 1.6140 \pm 0.1141로 실험군에서 근핵의 수가

유의하게 증가했다($p < .001$). 또한 근 핵당 Ag-NOR 수와 단위면적당 근핵수와의 상관관계는 매우 높았다($r = .9234$).

표 4. Mean and standard deviation of numbers of nucleus per square micrometer in gastrocnemius muscles of the rats

Group	No. of Nucleus/ μm^2			
	X	SD	DE	95% CI
Control	0.6500	0.1084	0.0485	0.5154-0.7846
Experimental	1.6140*	0.1141	0.0510	1.4723-1.7557

* $p < .001$

표 5. Analysis of variance for numbers of nucleus per square micrometer in gastrocnemius muscles of the rats

Source	D.F.	S.S.	M.S.	F	P
Between Groups	1	2.3232	2.3232	187.5093	0.0000
Within Groups	1	0.0991	0.0124		

IV. 고 찰

핵소체 형성 부위(nucleolar organizer region, NOR)는 13, 14, 15, 21, 22번 등 다섯개의 선두 부착 염색체의 short arm의 이차수축(secondary constriction, sc)에 존재하는 DNA 고리로 RNA polymerase I, C 23 단백질(110 KD), B 23 단백질(100 KD), 최근에 알려진 분자량 80 KD의 단백질 등으로 구성되어 있으며, 단백질합성에 필수적인 ribosomal RNA의 유전자가 위치하는 부위로 핵

소체의 형성에 관여하고 있다.²⁶⁾ 핵소체 형성 부위는 rRNA의 전사활동 증가시 은 콜로이드에 염색되므로 핵소체 형성 부위와 이와 관련된 단백질들의 존재를 확인할 수 있으며 이를 Ag-NOR법이라 한다. Ag-NOR법으로 핵소체 형성 부위를 염색하여 rRNA의 전사활동을 직접 측정³⁶⁾함으로써 간접적으로 단백질합성능을 확인할 수 있는 방법이다.^{32,33,37)}

골격근의 단백질합성은 RNA의 번역활동 수준에 의해 조절되는데³⁸⁾ 근 핵내의 Ag-NOR 수의 증가

는 DNA의 rRNA 전사 활성도 증가에 따른 리보솜에서 단백질합성의 증가를 시사하고 있다.¹³⁾

본 실험에서 근 핵당 평균 Ag-NOR의 수는 대조군이 0.9940 ± 0.0594 개로 정상골격근 세포의 Ag-NOR 수가 0.94개라는 Kim 등³⁵⁾의 보고와 일치하였고, 실험군이 1.5160 ± 0.1141 로 대조군보다 유의하게 많았다($p < 0.001$). 근 핵당 Ag-NOR의 분포도 대조군에서는 Ag-NOR이 없거나 하나만 있는 경우가 72.24%, 두개 이상 나타난 경우가 27.86%였으나 실험군에서는 Ag-NOR이 없거나 하나만 있는 경우가 56.62%, 두개 이상 나타난 경우가 43.38%로 실험군이 대조군보다 높게 나타났다. 단위면적당 근핵의 수도 대조군이 $0.65 \pm 0.11/\mu\text{m}^2$ ·실험군이 $1.61 \pm 0.11/\mu\text{m}^2$ 로 실험군이 대조군에 비해 유의하게 많이 나타나($p < .001$), McGurk,²²⁾ Pette,¹⁰⁾ Salmons³⁹⁾ 등이 시사한 바와 같이 단백질합성의 변화를 보였다. 또한 Crocker와 Egan⁴⁰⁾은 Ag-NOR 수와 크기가 역상관관계를 가진다고 보고하였으나 본 실험에서는 수와 크기의 관계를 검증하지 않았고, 근핵당 평균 Ag-NOR 수와 단위면적당 근핵 수와의 상관관계가 높아($r = .9234$) 근핵의 수가 증가될수록 핵내 Ag-NOR 수와 Ag-NOR이 증가됨을 보여주고 있었다.

이와같은 결과는 흰쥐의 비복근에서 정상군의 근 핵당 평균 Ag-NOR의 수가 0.99 ± 0.02 , 좌골신경을 손상시킨 후 4주간 전기자극을 가한 실험군에서 1.84 ± 0.09 로 실험군이 정상군보다 유의하게 증가했다는 Lee와 Lee⁴¹⁾의 이전 보고와 일치하였고, 근 핵당 Ag-NOR의 분포도 정상군에서 Ag-NOR이 없거나 하나만 있는 경우가 78.8%, 두개 이상 나타난 경우가 21.2%, 좌골신경을 손상시킨 후 4주간 전기자극을 준 실험군에서 각각 41.0%, 59%로 실험군이 정상군보다 유의하게 많이 나타났다는 Lee와 Lee⁴¹⁾의 보고와 일치하였다.

Crocker와 McGovern³⁰⁾은 정상 간세포는 핵당 Ag-NOR 수가 1.88개에 비해 간경변 세포에서는 3.21개, 간암세포에서는 7.88개를 보고하였으며, Crocker와 Nar²⁶⁾은 악성도가 낮은 림프종은 세포당 Ag-NOR 수가 1.5개인데 비해 악성도가 높은 림프종에서는 4.4~6.8개가 나타났음을 보고하였고 Egan 등³¹⁾은 섬유증식성 질환의 경우 평균

Ag-NOR 수가 3.7개인데 비해 악성도가 낮은 섬유육종(low grade fibrosarcoma)의 경우 11:5개가 나타났음을 보고하는 등, 증식이 활발한 세포, 즉 단백질합성이 활발한 세포에서 Ag-NOR 수가 증가됨을 보고하였다. Starnes 등¹⁴⁾은 흰쥐 비복근에 전기자극을 가하여 근수축을 유발시킴에 따라 적응반응으로 단백질합성이 증가한다 하였으며, McGurk,²²⁾ Pette와 Vrbova⁴²⁾ 등은 흰쥐의 골격근에 3주간 전기자극을 가한 결과 총 RNA량이 2배 증가하였고, McGurk,²²⁾ Salmons⁴³⁾는 단백질합성능이 3~5배 증가하였다 보고하였다. 또한 Gibson 등⁴⁴⁾은 이러한 변화는 특히 근핵의 변화와 관계가 있다 하였다.¹³⁾ Cheek 등⁴⁵⁾은 근핵의 밀도가 단백질합성의 요구에 따라서 결정된다고 제시한 바 있는데 Earl 등,⁴⁶⁾ goldburg⁴⁷⁾은 근핵의 밀도가 높을수록 전사능력이 향상되어 rRNA 및 ribosomal protein량이 증가되어 단백질합성이 증가된다 하였다.

McGurk²²⁾는 전기자극에 따라 DNA 수준에서 근핵이 2~3배 증가하였다고 보고한 바 있고, 이들의 견해는 autoradiography를 사용한 May⁴⁸⁾의 연구에서 확인되었으며 따라서 본 실험에서 핵내 평균 Ag-NOR 수가 증가되었음은 전기자극으로 골격근에서 근 단백질합성이 증가되었음을 시사해주고 있다.

V. 결 론

전기자극이 골격근의 단백질합성에 미치는 영향을 검증할 목적으로 간접적인 방법인 핵소체 형성 부위의 활성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley 계에 양성 흰쥐 10마리를 대조군과 실험군으로 나누어 실험군의 비복근에 30 Hz, 200 μsec 의 조건으로 전기자극을 가하여 인공적으로 근수축을 유발시켰다. 4주 후 비복근을 완전 적출하여 표본을 제작, 은 콜로이드 염색을 하여 유침하에서 광학 현미경으로 근핵내의 Ag-NOR을 관찰한 결과 평균 Ag-NOR의 수가 실험군이 대조군보다 유의하게 증가하였고($p < .001$), 핵소체 형성 부위의 수와 단위면적당 핵의 수는 좋은 상관관계를 나타냈으며 이는 전기자극이 흰쥐 골격근의 단백질합성을 촉진시키는 효과가 있었음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Witzmann FA : Soleus muscle atrophy in rats induced by cast immobilization : Lack of effect by anabolic steroids. *Arch Phys Med Rehabil* 69 : 81~85, 1988.
2. Currier DP, and Mann R : Muscular strength development by electrical stimulation in healthy individuals. *Phys Ther* 63 : 915~921, 1983.
3. Currier DP, Lehman J, and Lightfoot P : Electrical stimulation in exercise of quadriceps femoris muscle. *Phys Ther* 59 : 1508~1512, 1979.
4. Delitto A, Rose SJ, McKowen JM, et al : Electrical stimulation versus voluntary exercise in strengthening thigh musculature after anterior cruciate ligament surgery. *Phys Ther* 68 : 660~663, 1988.
5. Goonan MR, Guerriero GP, Godfrey D, et al : The effects of electrical stimulation of normal abductor digiti quinti on strength. *J Orthop Sports Phys Ther* 6 : 343~346, 1985.
6. Greathouse DG, Nitz AJ, Matulionis DH, et al : Effects of short-term electrical stimulation on the ultrastructure of rat skeletal muscle. *Phys Ther* 66 : 946~953, 1986.
7. Kramer JF : Effect of electrical stimulation current frequencies on isometric knee extension torque. *Phys Ther* 67 : 31~38, 1987.
8. Milner-Brown HS, and Miller Rg : Muscle strengthening through electric stimulation combined with low-resistance weights in patients with neuromuscular disorders. *Arch Phys Med Rehabil* 69 : 20~24, 1988.
9. Salmons S, and Henriksson J : The adaptive response of skeletal muscle to increased use. *Muscle Nerve* 4 : 94~105, 1981.
10. Pette D : Activity induced fast to slow transitions in mammalian muscle. *Med Sci Sports Exer* 16 : 517~528, 1984.
11. Lieber RL : Comparison between animal and human studies of skeletal muscle adaptation to chronic stimulation. *Clin Orthop* 233 : 19~24, 1988.
12. Reddanna P, Moorthy CV, and Govindappa S : Pattern of skeletal muscle chemical composition during in vivo electrical stimulations. *Indian J Physiol Pharmacol* 25 : 33~40, 1981.
13. Joplin RE, Franchi LL, and Salmons S : Changes in the size and synthetic activity of nuclear populations in chronically stimulated rabbit skeletal muscle. *J Anat* 155 : 39~50, 1987.
14. Starnes JW, Beyer RE, Farrar RP, and Edington DW : Protein synthesis in skeletal muscle from normal and diabetic rats following increased contractile activity in situ. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 58 : 339~353, 1987.
15. Gibson JNA, Halliday D, Morrison WL, et al. : Decrease in human quadriceps muscle protein turnover consequent upon leg immobilisation. *Clin Sci* 62 : 503~509, 1987.
16. Halliday D, Griggs RC, Edwards RHT, et al. : In vivo estimation of muscle protein synthesis in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 17 : 65~79, 1985.
17. Rennie MJ, Edwards RHT, Millward DJ, et al. : Effects of Duchenne muscular dystrophy on muscle protein synthesis. *Nature* 296 : 165~167, 1982.
18. Rennie MJ : Muscle protein turnover and the wasting due to injury and disease. *Med Bull* 41 : 257~264, 1985.
19. Leberer E, Seedorf U, and Pette D : Neural control of gene expression in skeletal muscle. Calcium-sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles. *Biochem J* 239 : 295~300, 1986.
20. Brown WE, Salmons S, Pullen L, et al : Gene re-expression in stimulated fast skeletal muscle. *J Muscle Cell Motil* 8 : 81, 1986.
21. Williams RS, Garcia-Moll M, Mellor M, et

- al : Adaptation of skeletal muscle to increased contractile activity. Expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. *J Biol Chem* 262 : 2767, 1987.
22. McGurk B : Effects of long term electrical stimulation on protein synthesis in mammalian skeletal muscle. B Sc Thesis, University of Birmingham, 1982.
 23. Brandt L, Olsson H, and Monti M : Uptake of thymidine in lymphoma cells obtained through fine-needle aspiration biopsy. Relation to prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer* 17 : 1229~1233, 1981.
 24. Quirke P, and Dyson JED : Flow cytometry : methodology and applications in pathology. *J Pathol* 149 : 79~87, 1986.
 25. Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218 : 474~475, 1982.
 26. Gerdes J, Lemke H, Baish H, et al. : Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol* 133 : 1710~1716, 1984.
 27. Crocker J, and Nar P : Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J Pathol* 151 : 111~118, 1987.
 28. Hara A, Hirayama H, Sakai N, Yamada H, Tanaka T, and Mori H : Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surg Neurol* 33 : 320~324, 1990.
 29. Crocker J, Macartney JC, and Smith PJ : Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 154 : 151~156, 1988.
 30. Courvalin JC, Hernandez-Verdun D, Gosti-Testu F, Marty MC, Maunoury R, and Bornens M : A protein of Mr 80,000 is associated with the nucleolar organizer of human cell lines. *Chromosoma* 94 : 353~361, 1986.
 31. Crocker J, and McGovern J : Nucleolar organizer regions in normal, cirrhotic, and carcinomatous livers. *J Clin Pathol* 41 : 1044~1048, 1988.
 32. Egan MJ, and Crocker J : Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. *J Pathol* 154 : 247~253, 1988.
 33. Egan M, Freeth M, and Crocker J : Intraepithelial neoplasia, human papilloma virus infection and argyrophilic nucleoprotein in cervical epithelium. *Histopathol* 13 : 561~567, 1988.
 34. Egan MJ, Raafat F, Crocker J, et al : Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. *J Clin Pathol* 41 : 31~33, 1988.
 35. Howat AJ, Giri DD, Wright AL, et al : Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 156 : 227~232, 1988.
 36. Kim JM, Kim IS, and Paik SY : Nucleolar organizer regions in normal tissue and hyperplastic and neoplastic lesions. *Kor J Pathol* 23 : 208~222, 1989, 111~118, 1987.
 37. Haaf T, Reimer G, and Schmid M : Immunocytogenetics : localization of transcriptionally active rRNA genes in nucleoli and nucleolus organizer regions by use of human autoantibodies to RNA polymerase I. *Cytogenet Cell Genet* 48 : 35~42, 1988.
 38. Smith R, and Crocker J : Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in breast malignancy. *Histopathol* 12 : 113~124, 1988.
 39. Vanderburg CR, and Nathanson MA : Posttranscriptional control of embryonic skeletal muscle protein synthesis. control at the level of translation by endogenous RNA. *J*

- Cell Biol 107 : 1085~1098, 1988.
40. Salmons S, Gale DR, and Sreter FA : Ultrastructural aspects of the transformation of muscles fibre type by long-term stimulation. *J Anat* 127 : 17~31, 1978.
 41. Crocker J, and Egan MJ : Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 156 : 233~239, 1988.
 42. Lee JH and Lee KR : Effect of electrical stimulation on the denervated muscle of the albino rat, Sprague-Dawley. *K J Phys Ther* 2 : 47~63, 1990.
 43. Pette D, and Vrbova G : Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibres. *Muscle Nerve* 8 : 676~689, 1985.
 44. Salmons S : Functional adaptation in skeletal muscle. *Trends NeuroSci* 3 : 134~137, 1980.
 45. Gibson JNA, Smith K, and Rennie MJ : Prevention of disuse muscle atrophy by means of electrical stimulation : Maintenance of protein synthesis. *Lancet* ii : 767~769, 1988.
 46. Cheek DB, Holt AB, Hill DE, et al : Skeletal muscle cell mass and growth : the concept of the DNA unit. *Pediat Res* 5 : 312~328, 1971.
 47. Earl CA, Laurent GJ, Everett AW, et al : Turnover rates of muscle protein in cardiac and skeletal muscles of dog, fowl, rat and mouse : turnover rate related to muscle function. *Aust J Exp Biol Med Sci* 56 : 265~277, 1978.
 48. Goldberg AL : Protein synthesis in tonic and phasic skeletal muscle. *Nature* 216 : 1219~1220, 1967.
 49. May H : Sites of DNA synthesis in chronically stimulated muscle. B Sc Thesis, University of Birmingham, 1984.