

마우스 및 랫트의 정상조직과 종양성 병변에서의 Nucleolar Organizer Regions (NORs)

김성호, 김태환, 장자준*

원자력 병원 방사선의학연구실 *원자력 병원 해부병리과

(1990. 8. 3 접수)

Silver-binding nucleolar organizer regions (Ag-NORs) 염색법을 이용하여 *in vivo* 및 *in vitro*에서 발암과정과 관련된 세포증식능을 검토하였다. A/J마우스에 benzo(a)pyrene을 투여하여 유발된 폐선종, 폐선암 및 Sprague-Dawley 랫트에 dimethylbenz(a)anthracene 투여에 의해 발생된 유선의 선암세포에서 Ag-NORs의 염색상태를 정상조직과 비교하고 또한 정상마우스 섬유모세포인 NIH3T3에서의 Ag-NORs의 수 및 DNA 증식 억제물질인 caffeine에 의한 변화를 관찰하였다. 은친화성 NOR 관련 단백질은 핵내 흑색의 반점으로 나타났으며 정상 폐조직의 세포당 Ag-NORs 수치는 0.87 ± 0.01 였으며 양성종양인 폐선종세포 및 악성종양인 폐선암세포에서는 각각 2.33 ± 0.02 , 2.56 ± 0.45 정상 유선조직의 세포당 Ag-NORs 수치는 1.21 ± 0.16 였으며 악성종양인 선암세포는 3.91 ± 0.11 로써 종양성 병변에서 유의한 증가를 보였다 ($P < 0.005$). 세포배양된 NIH3T3세포의 Ag-NORs 수치는 배양 24시간에 6.81 ± 1.38 , 48시간에 7.13 ± 1.56 , 72시간에 8.50 ± 2.04 였으며 caffeine 처리에 따라 각각의 대조군에 비하여 급격히 감소하였으며 ($P < 0.005$) [^3H]thymidine incorporation에 의한 radioactivity의 변화와 비슷한 경향을 나타냈다. 이와 같이 정상세포와 암세포, 정상세포와 DNA 증식 억제물질 투여세포에서 Ag-NOR의 유의한 차이가 나타났으며 따라서 본 방법은 정상 세포 및 암세포 또는 증식세포를 이용한 각종 발암실험에서 형태학적 정량분석의 한 방법으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

서 론

Nucleolar organizer region-associated protein (NORs) 반응은 오랫동안 세포유전학 분야 연구에 사용되어 왔으나 조직병리학분야에 적용된 것은 최근의 일이며 점차적으로 방법이 개선되어 one-step 방법으로 간편해졌다 (Crocker and Paramjit, 1987; Howell and Black, 1980; Fallowfield *et al.*, 1988; Derenzini *et al.*, 1988). NORs는 세포내 핵소체에 존재하고 ribosomal RNA gene을 가지는 DNA의 고리이며 이것은 RNA polymerase I에 의하여 전사되고 단백질 산생의 표시가 된다 (Crocker and Paramjit, 1987). 따라서 NORs의 수 및 모양은 일반적으로 세포의 활성도를 나타내며 (Crocker and Paramjit, 1987; Ploton *et al.*, 1986) NORs의 수는 상대적인 휴지세포에 비하여 증식세포에서 많이 나타나고 (Bolognari and Contini, 1981) 또한 종양세포, 특히 악성종양 세포에서 다수 관찰된다 (Derenzini *et al.*, 1986). Ag-NOR 염색

법은 사실상 NOR-associated protein들이 염색되나 이들에 대해서는 완전히 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 Ag-NOR 염색법은 핵소체의 구조 및 활성도 변화의 지표로서 사용되고 있다 (Howell, 1982).

세포의 증식은 정상적인 세포에서도 일어날 수 있는 현상이므로 증식의 속도는 질병의 진단과 예후판정 등을 포함한 세포생리상태를 파악하는 지표가 될 수 있다. 지금까지 형태학적으로 세포의 증식성을 측정하는 데는 유사분열 세포의 수를 세거나 (Graem and Helweg-Larsen, 1979) 최근 autoradiograph (Bolognesi *et al.*, 1986), flow cytometry를 이용한 DNA의 측정 (Barlogie *et al.*, 1983), bromodeoxyuridine 흡수정도 측정 (Napalkov *et al.*, 1989) 또는 항체를 이용한 면역효소 염색 (Gerdes *et al.*, 1983) 등이 이용되나 이들의 적용은 시간적 경제적 손실이 많은 단점이 있다. 이에 비하여 Ag-NORs 염색법은 방법이 간단하고 통상적인 파라핀포매 조직에 적용할 수 있는 점 등에서 많은 이용가치가 있다.

지금까지 Ag-NORs 염색에 대한 연구는 대부분 인체암의 진단과 예후판정 가능성을 확인하는 경우에 한정되어 있을 뿐 실험적 방법에서의 적용은 극히 드물다. 따라서 본 연구에서는 실험적인 *in vivo* 및 *in vitro*에서의 Ag-NOR법의 적용 가능성을 검토하고자 발암물질 투여에 의해 유발된 양성종양인 폐선종, 악성종양인 폐선암 및 유선의 선암세포에서 Ag-NORs의 염색상태를 정상조직과 비교하고 또한 정상마우스 섬유모세포인 NIH3T3에서의 Ag-NORs의 수 및 DNA 증식 억제물질인 caffeine (Kagunaga, 1975; Trosko *et al.*, 1973)에 의한 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

암발생 및 표본제작 : 폐선종은 A/J 신생마우스에 발암물질인 benzo(a)pyrene (0.5mg/g B.W., Sigma Chem. Co.)을 1% gelatin액에 부유시켜 피하주사한 후 생후 9주에 재료를 채취하였고, 폐선암은 동종의 10주령마우스에 benzo(a)pyrene (0.5mg/head)을 charcoal powder에 부착시켜 1주에 1회씩 8회 기관내로 직접 점적주입한 후 실험 13주에 재료를 채취하였으며 유선의 선암은 발암물질로서 dimethylbenz(a)anthracene (50mg/ml olive oil, Sigma Chem. Co.)를 생후 6주 Sprague-Dawley 랫트에 0.05ml씩 복강내 주사한 후 2주간격으로 1ml씩 3회 연속 위내 투여하였으며 투여 후 50일째 종양발생개체로부터 재료를 채취하였으며 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매 절편하였다. NIH 3T3 마우스 섬유모세포주는 DMEM 배지 (GIBCO)에 10% fetal calf serum을 첨가하여 배양하였다. 조직배양용 petri dish에 cover slip (Wheaton)을 바닥에 놓은 후 배양세포를 5×10^4 cells/ml를 분주하였으며 caffeine은 200 μ g/ml 용량으로 첨가하여 각각 24, 48, 72시간 배양하였으며 배양 후 ethanol 및 acetic acid (3:1)로 고정하여 cover slip를 분리한 후 permount로 slide glass에 부착하고 염색을 실시하였다.

Scintillation count : NIH3T3세포를 24 well culture plate (Flow Lab)에 well당 5×10^4 개씩 분주한 후 동량의 caffeine을 가하고 [3 H]thymidine [3.0TBq/mmol (81.9 Ci/mmol) NEN]을 well당 20 μ Ci씩 첨가하여 각각 24, 48, 72시간 배양한 후 trypsin-EDTA (GIBCO)를 처리하여 세포를 부유시켰다. 세포 부유액에서 1ml씩을 취하여 10ml의 scintillation cocktail (Lumagel, Lumac, Netherland)을 혼합 후 radioactivity를 liquid scintillation counter (Packard Co.)로 측정하였다.

Ag-NORs 염색 : One-step silver colloid method for Ag-NOR staining (modified procedure)

1. Cut 3 μ m paraffin section
2. Deparaffinize in xylene and hydrate through graded ethanols.
3. Rinse in distilled water.

4. Place in staining solution* for 20 minutes at room temperature in the dark.

*Staining solution :

(A) 2% gelatin in 1% pure formic acid solution

(B) 50% silver nitrate solution

The working solution : mixing (A) & (B) in a proportion of 1 : 2 just before use.

5. Wash in running deionized water.

6. Dehydrate in ascending ethanol concentrations.

7. Clear in xylene and mount.

Ag-NORs수의 검경은 immersion오일을 사용하여 대물렌즈 100배 상태에서 관찰하였으며 각각의 조직표본에서 Ag-NORs의 검경세포수는 표 2, 4에서와 같고 모든 성적의 통계처리는 Student's t-test로 실시하였다.

결 과

모든 표본에서 Ag-NORs는 다양한 크기의 흑색점으로 나타났다.

폐선종 및 선암 (그림 2)에서는 각각 2.33 ± 0.02 , 2.56 ± 0.45 로써 정상폐조직 (그림 1)(0.87 ± 0.01)에 비하여 2배이상의 수를 나타냈다 (표 1, 2)($P < 0.005$). 유선의 선암조직 (그림 4)(3.91 ± 0.11)에서도 정상유선세포 (그림 3)(1.21 ± 0.16)에 비하여 높은 수치가 관찰되었다 (표 1, 2)($P < 0.005$).

NIH3T3세포 (그림 5)의 경우 배양시간의 경과에 따라 과립의 수는 다소 증가하였으며 caffeine 처리 (그림 6)에 따라 각각의 대조군에 비하여 급격한 감소를 나타냈고 ($P < 0.005$) [^3H]thymidene incorporation에 의한 radioactivity의 변화와 비슷한 경향을 나타냈다 (표 3, 4)($P < 0.01$).

전반적으로 Ag-NORs 양성 과립의 숫자와 크기의 관계는 세포내 수가 많을수록 크기는 작은 경향을 보였다.

Table 1. Mean number of Ag-NORs per nucleus

Tissue	Ag-NORs count*
Lung	
Normal	0.87 ± 0.01
Adenoma	$2.33 \pm 0.02^{**}$
Adenocarcinoma	$2.56 \pm 0.45^{**}$
Mammary gland	
Normal	1.21 ± 0.16
Adenocarcinoma	$3.91 \pm 0.11^{**}$

* Mean \pm SD.

** $P < 0.005$, compared with each normal tissue.

Table 2. Distribution of Ag-NORs

Type of cells	Number of Ag-NORs										Mean	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Lung												
Normal	(50)*	17	25	6	2							0.86
	(50)	16	25	8	1							0.88
	(50)	13	30	7								0.88
Adenoma	(50)		8	23	13	6						2.34
	(50)	1	8	21	15	5						2.30
	(50)	1	8	22	12	6	1					2.34
Adenocarcinoma	(50)	1	13	18	17	1						2.08
	(50)	1	7	16	19	4	2	1				2.62
	(50)	1	2	15	16	12	3	1				2.98
Mammary gland												
Normal	(30)	5	14	8	2	1						1.33
	(30)	9	13	6	2							1.03
	(30)	8	12	4	6							1.27
Adenocarcinoma	(50)	1	3	4	13	11	11	2	2	3		3.98
	(50)		2	7	10	18	9	2	2			3.78
	(50)		5	6	9	12	11	1	4	1	1	3.96

* Numbers of counted cells.

고 찰

본 연구에서는 *in vivo* 실험으로 발암물질 투여에 의해 유발된 양성종양인 폐선종, 악성종양인 폐선암 및 유선의 선암세포에서 Ag-NORs의 염색상태를 정상조직과 비교하였고, *in vitro* 실험으로 NIH3T3 마우스 섬유모세포에서의 Ag-NORs의 수 및 DNA 증식 억제물질인 caffeine에 의한 변화를 관찰하였다.

Table 3. Number of Ag-NORs per nucleus and disintegration per minute of [³H] thymidine incorporation in NIH3T3 after caffeine treatment

Incubation time (hrs)	Untreated control		Caffeine (200 µg/ml of medium)	
	Ag-NORs	DPM**	Ag-NORs	DPM
24	6.94 ± 0.35*	38178.4 ± 1143.3	3.26 ± 0.22***	28208.3 ± 789.3***
48	7.33 ± 0.18	83260.4 ± 1634.7	3.87 ± 0.23***	56665.4 ± 806.9***
72	8.26 ± 0.25	137185.8 ± 12606.0	4.42 ± 0.04***	79674.9 ± 8945.7***

* Mean ± SD.

** Mean ± SD of the disintegration per minute of [³H] thymidine incorporation.

*** P < 0.01, compared with each untreated control.

Table 4. Distribution of Ag-NORs in NIH3T3 cells

Experimental groups	Number of Ag-NORs														Mean
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Untreated Control															
24 hrs*	(15)**				1		7	3	6	3					6.8
	(15)				3	1	3	4	1	1	2				6.67
	(15)				1	2	1	4	2	4	1				7.33
48 hrs	(15)						4	5	6						7.13
	(15)				1	1	2	4	4	1	1	1			7.4
	(15)					1	2	6	2	3	1				7.47
72 hrs	(15)						3	3	1	2	4	1	1		8.53
	(15)					1		5	3	3	2			1	8.27
	(15)					1	2	4	2	4	1			1	8.0
Caffeine (200 µg/ml of medium)															
24 hrs	(15)		6	2	2	5									3.4
	(15)		3	6	3	3									3.4
	(15)	2	5	3	2	2	1								3.0
48 hrs	(15)	1	5	4	3	2									4.0
	(15)	3	4	4	4										3.6
	(15)	3	2	4	4	2									4.0
72 hrs	(15)	1	4	2	5	2	1								4.4
	(15)	2	3	3	2	3	2								4.47
	(15)	2	3	3	3	2	2								4.4

* Incubation time.

** Numbers of counted cells.

One-step Ag-NORs 염색법은 Howell과 Black (1980)에 의해서 발전된 이래 최근 조직병리학 분야에서 세포활성도 및 종양성의 판별척도로 사용되어왔다 (Crocker and Paramjit, 1987; Derenzini *et al.*, 1988; Leong and Gilham, 1989). 핵소체는 세포핵내 ribosomal genes이 위치한 곳으로 잘 알려져 있으며 interphase NORs의 수는 증식세포 또는 종양세포에서 상대적인 휴식세포 및 정상세포에 비하여 많이 나타난다 (Bolognari and Contini, 1981). 이러한 사실은 모반세포성 모반에서 분화된 악성흑색종에서도 interphase NORs의 수 및 크기에 관한 미세구조의 분석으로 밝혀졌다 (Derenzini *et al.*, 1986).

NORs내의 ribosomal DNA는 은에 의해서 선택적으로 염색되는 산성단백질의 일종과 관계가 있으며 (Hernandez-Verdun, 1986; Howell and Black, 1980) 이러한 단백질은 Ag-NOR 단백질이라고 정의되었다. NORs의 관찰은 이러한 Ag-NOR 단백질염색법에 의해 통상적인 파라핀 포매조직에서 시행되었으며 (Ploton *et al.*, 1986) 이후 은염색은 통상적인 조직병리학분야에 적용되었고 (Crocker and Paramjit, 1987; Kim *et al.*, 1989; Fallowfield *et al.*, 1988)은 염색방법을 통한 NORs수의 차이를 관찰하여 악성임파종의 악성도, 모반세포성모반과 악성흑색종 (Crocker and Paramjit, 1987; Crocker and Skilbech, 1987), 직장암종과 폴립간의 분화정도를 판별하였으며 (Derenzini *et al.*, 1988) 최근 면역조직화학염색과의 이중염색을 통한 검색법도 소개되고 있다 (Murry *et al.*, 1989).

지금까지 보고된 논문은 대부분 인체종양의 판별 및 종양세포주에 대한 Ag-NORs의 상태를 관찰하였으나, 본 연구에서는 실험적인 조건에서의 Ag-NOR법을 적용하고자 발암물질에 의해 유발된 양성, 악성종양 및 정상증식세포인 NIH3T3 세포를 대상으로 하였다. Ag-NORs의 수는 폐선종과 폐선암의 경우 선암에서 수가 다소 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 정상조직과 종양조직간에는 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.005$). 따라서 이러한 결과는 실험적인 발암연구에서도 Ag-NORs 염색법의 적용가능성을 제시하였다. 한편 정상증식세포인 NIH3T3의 Ag-NORs의 수가 DNA 증식억제 물질인 caffeine의 투여에 의해 유의성있게 감소하므로써 정상세포, 특히 정상증식세포인 NIH3T3 세포의 DNA활성도에 관한 실험 수행시 간편한 확인방법으로 사용가능할 것으로 사료된다.

이와 같이 Ag-NORs 염색법은 광학현미경적 관찰수준에서도 과립의 수, 크기 및 편심율 (eccentricity) 등을 고려한다면 분자수준의 실험에 대한 형태학적 분석이 가능하며 (1983; Derenzini *et al.*, 1983; Derenzini *et al.*, 1987) 또한 통상적으로 사용되는 파라핀 포매 조직에 적용할 수 있는 간편한 방법이라는 관점에서 이용 가치가 높다고 할 것이다.

REFERENCES

1. Barlogie, B., M.N. Raber, J. Schumann, T.S. Johnson, B. Drewinko, D.E. Swartzendruber, W. Cohde, M. Andreeff, and E.J. Freireich, (1983): Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res.* 43: 3982-3997.
2. Bolognari, A., and A. Contini, (1981): The role of the nucleolus in carcinogenesis. *Riv. Biol. Norm. Pathol.* 7: 43-68.
3. Bolognesi, C., M. Taningher, S. Parodi, and L. Santi, (1986): Quantitative predictivity of carcinogenicity of the autoradiographic repair test (primary hepatocyte cultures) for a group of 80 chemicals belonging to different chemical classes. *Environ. Health Perspect.* 70: 247-253.
4. Crocker, J., and N. Paramjit, (1987): Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 151: 111-118.
5. Crocker, J., and N. Skilbeck, (1987): Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J. Clin. Pathol.* 40: 885-889.
6. Derenzini, M., C.M. Betts, C. Ceccarelli, and V. Eusebi, (1986): Ultrastructural organization of nucleoli in benign and malignant melanomas. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 52: 343-352.
7. Derenzini, M., C.M. Betts, and V. Eusebi, (1987): Distribution of interphase nucleolar organizer regions and diagnosis of malignancy. *Lancet II.* 286.
8. Derenzini, M., D. Hernandez-Verdun, A. Pession, and F. Novello, (1983): Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J. Ultrastruc. Res.* 84: 161-172.
9. Derenzini, M., T. Romagnoli, P. Mingazzi, and V. Marinozzi, (1988): Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)* 54: 334-340.
10. Fallowfield, M.E., A.R. Dodson, and M.G. Cook, (1988): Nucleolar organizer regions in melanocytic dysplasia and melanoma. *Histopathology.* 13: 95-99.
11. Gerdes, J., J. Schwab, H. Lemke, and H. Stein, (1983): Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer.* 31: 13-20.
12. Graem, N., and K. Helweg-Larsen, (1979): Mitotic activity and delay in fixation of tumour tissue. The influence of delay in fixation on mitotic activity of a human osteogenic sarcoma grown in athymic nude mice. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [A].* 87: 375-378.
13. Hernandez-Verdun, D., (1986): Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Methods Archiv. Exp. Pathol.* 12: 26-62.
14. Howell, W.M., (1982): Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: The cell nucleus (H. Bush, and L.I. Rothblum, editors). Academic Press, Vol. 11: 89-142.

15. Howell, W.M., and D.A. Black, (1980): Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia*. 36: 1014.
16. Kagunaga, T. (1975): Caffeine inhibits cell transformation by 4-nitro-quinoline-1-oxide. *Nature (Lond.)*. 258: 248-250.
17. Kim, J.M., I.S. Kim, and S.Y. Paik, (1989): Nucleolar organizer regions in normal tissue and hyperplastic and neoplastic lesions. *Kor. J. Path.* 23: 208-222.
18. Leong, A.S.Y., and P. Gilham, (1989): Silber staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum. Pathol.* 20: 257-262.
19. Murray, P.G., D.A.R. Boldy, J. Crocker, and J.G. Ayres, (1989): Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin section. *J. Pathol.* 159: 169-172.
20. Napalkov, N.P., V.N. Anisinov, and A.J. Likhachev, (1989): 5-bromodeoxy uridine-induced carcinogenesis and its modification by persistent estrus syndrome, unilateral nephrectomy, and x-irradiated in rats. *Cancer Res.* 49: 318-323.
21. Ploton, D., M. Menager, P. Jeannesson, G. Himber, F. Pigeon, and J.J. Adnet, (1986): Improvement in the staining and in the visualization of the agyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* 18: 5-14.
22. Trosko, J.E., P. Frank, E.H. Chu, and J.E. Becker, (1973): Caffeine inhibition of postreplication repair of N-acetoxy-2-acetylaminofluorene-damaged DNA in Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 33: 2444-2449.

Nucleolar Organizer Regions (NORs) in Normal Tissue and Neoplastic Lesions of Mouse and Rat

Sung Ho Kim, Tae Hwan Kim and Ja June Jang*

Laboratory of Radiation Medicine,

**Department of Anatomical Pathology,*

Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-240, Korea

Using a modified one-step silver staining technique, nucleolar organizer region-associated proteins (Ag-NORs) have been studied in cultured NIH3T3 cells with or without caffeine and paraffin-embedded sections from benzo(a)pyrene-induced lung adenoma, adenocarcinoma of A/J mice and dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary adenocarcinoma of Sprague-Dawley rat. The technique shows argyrophilic NOR associated proteins, which are seen in nuclei as black dots. The nuclei of normal lung cells contained 0.87 ± 0.01 Ag-NORs, while in adenoma and adenocarcinoma cells, the number of Ag-NORs were 2.33 ± 0.02 and 2.56 ± 0.45 ($P < 0.005$). In mammary adenocarcinomas, 3.91 ± 0.11 Ag-NORs per nucleus was found. The Ag-NORs were more numerous in the cells of mammary adenocarcinomas than normal tissue of mammary gland (1.21 ± 0.16) ($P < 0.005$). The Ag-NORs numbers of NIH3T3 cells were 6.94 ± 0.35 at 24 hrs, 7.33 ± 0.18 at 48 hrs, 8.26 ± 0.25 at 72 hrs after incubation and significantly decreased in caffeine treated group ($P < 0.01$). The counts of [^3H]thymidine incorporation were similar with the result of using Ag-NORs staining technique. A significant difference of Ag-NORs number was found between the nuclei of tumor cells, the cells treated with antiproliferative agent and normal cells. The result suggested that the Ag-NOR method could be used quantitatively or semiquantitatively to assist histopathological evaluation of experimental carcinogenesis.

Figure Legends

- Fig. 1. Each nuclei of normal mouse lung possesses only one Ag-NOR. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.
- Fig. 2. The cells of pulmonary adenocarcinoma contain multiple black nuclear dots. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.
- Fig. 3. Each nuclei of normal rat mammary gland possesses only one or two dots. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.
- Fig. 4. The darkly stained dots in nuclei of mammary adenocarcinoma are smaller and more numerous than those of Fig. 3. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.
- Fig. 5. Cultured NIH3T3 mouse fibroblast cell for 72 hours. The darkly stained dots are very numerous and scattered. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.
- Fig. 6. Cultured NIH3T3 mouse fibroblast cells for 72 hours with 200 μ g/ml of caffeine. The cells contain significantly less and larger Ag-NORs than those of Fig. 5. Silver staining of Ag-NOR proteins. x 500.

