흰쥐의 갑상인두근과 윤상인두근에서 Myosin Heavy Chain mRNA 아형의 정량적 분석

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 이비인후과학교실,[1] 고려대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실[2]
박영실[1] · 정학현[2] · 남순열[1]

Quantitative Analysis of Myosin Heavy Chain (MHC) mRNA Expression in Thyropharyngeus Muscle and Cricopharyngeus Muscle in Rats

Young Sil Park, MD[1], Hak Hyun Jung, MD[2] and Soon Yhul Nam, MD[1]
1Department of Otolaryngology, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul,
2Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : The inferior pharyngeal constrictor muscle (IPC), which consists of the thyropharyngeus (TP) and cricopharyngeus (CP) muscles, plays an important role during deglutition, but their function is different when analysed by radiographic, manometric and electromyographic studies. **Materials** : The purpose of this study is to quantify the expression levels of MHC mRNA isoforms (2B, 2X, 2A, 2L, b-cardiac, neonatal and embryonic) in thyropharyngeus and cricopharyngeus muscles of rats using the competitive PCR. **Results** : The thyropharyngeus muscle was mainly consisted of three fast-twitching MHC isoforms, mostly 2X isoform (85.2%). On the other hand, the cricopharyngeus muscle contained two-third of fast-twitching isoforms (65.1%) and one-third of neonatal MHC (34.9%). **Conclusions** : The thyropharyngeus muscle could be characterized as a fast-twitching muscle and the cricopharyngeus muscle is probably considered as a sarcomeric regenerating muscle that is caused by frequent mechanical damage during deglutition. **(Korean J Otolaryngol 2000;43:300-5)**

KEY WORDS : Competitive PCR · Gene expression · Thyropharyngeus muscle · Cricopharyngeus muscle · Rat.

서 론

미오신(myosin)은 골격근(skeletal muscle)에서 가장 많이 존재하는 단백으로 근육의 수축에 관여한다. 미오신은 미오신 중쇄(myosin heavy chain, 이하 MHC)와 미오신 경쇄(myosin light chain, 이하 MLC)로 구성되어 있으며, MHC는 근육 수축 성상을 결정하는 중요한 요인이고, MLC는 MHC를 조율하는 기능을 가진다.[1)2)]

MHC는 전령 RNA(messenger RNA, 이하 mRNA)단위에서 현재까지 8가지의 아형, 즉, 2A MHC, 2B MHC, 2X MHC, 2L MHC, α-cardiac MHC, β-cardiac MHC, neonatal MHC, embryonic MHC 등이 보고되고 있다.[3-9)] 2A MHC, 2B MHC, 2X MHC 등의 아형은 주로 빠른 근수축 속도에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 2B MHC는 가장 빠른 근수축에 관여하나 피로현상이 심하고, 2A MHC는 2B MHC에 비하여 근수축 속도는 느리나 피로현상이 적으며, 2X MHC는 2B MHC과 2A MHC의 중간 정도로 알려져 있다.[4)] 최근 후두내근(intrinsic laryngeal muscle)과 안근(extraocular muscles)에 발현되는 2L MHC가 보고되었는데, 아직 그 기능은 밝혀져 있지 않으나 후두내근이나 안근은 인체의 근육 중에서 가장 빠른 근수축 성상을 보이기 때문에 아마도 매우 빠른 근수축 속도와 관련이 있을 수 있다.[9)10)] α-cardiac MHC와 β-cardiac MHC는 주로 심장 근육에서 발현되며, 특히 α-cardiac MHC는 골격근에서 발현되지 않으나 β-cardiac MHC는 근수축 속도가 느린 근육에서 주로 발현되므로 느리고 지속적인 근수축과 관련이 있는 것으로 알려져 있

논문접수일 : 1999년 9월 22일 / 심사완료일 : 1999년 12월 30일
교신저자 : 남순열, 138-736 서울 송파구 풍납동 388-1
울산대학교 의과대학 서울중앙병원 이비인후과학교실
전화 : 02) 2224-3966 · 전송 : 02) 489-2773
E-mail : synam@www.amc.seoul.kr

다.[1)8)] Neonatal MHC와 embryonic MHC는 태생기 근육에서 주로 발현되고 때로는 근육 손상 후 재생 과정에서 발현되는 것으로 알려져 있다.[11)12)]

하인두 수축근(inferior pharyngeal constrictor)은 연하운동에서 중요한 역할을 하며, 해부학적으로 인두-식도 접합부에 위치하고, 상부의 갑상인두근(thyropharyngeus muscle)과 하부의 윤상인두근(cricopharyngeus muscle)으로 구분된다. 윤상인두근은 휴식기에 지속적으로 강직성 수축상태를 유지하여 인두-식도 접합부의 괄약근으로 작용하다가 연하시 이완되면서 음식물이 지나갈 수 있도록 한다. 반면 갑상인두근은 휴식기에는 이완된 상태로 있다가 연하시 수축하여 음식물을 식도쪽으로 밀어낸다. 근육의 수축 속도면에서는 갑상인두근이 윤상인두근보다 빠른 것으로 알려져 있으며, ATPase 염색에서 갑상인두근은 주로 type II 근섬유로 구성되고, 윤상 인두근은 type I 근섬유로 구성되어 있다고 보고되고 있다.[13-16)]

근육의 특성을 구분하는 데는 여러 가지 방법들이 있으며, 생화학적 검사인 ATPase 활성도 검사, 면역조직화학적 검사, SDS-전기영동(SDS- electrophoresis) 등이 시행되고 있다.[17-19)] 그러나 ATPase 활성도에 의한 검사는 기능학적인 면에서 근 수축 활동의 정도를 이해하는 데는 도움이 되나 MHC 아형의 구분은 어려우며, 면역조직화학적 염색은 항체의 교차반응으로 특이성이 적고, SDS-전기영동은 단백을 검사하는 데 아주 유용하나 일부 MHC의 아형, 즉, 2L MHC, neonatal MHC, embryonic MHC 등을 구분하는데 어렵다. 최근 mRNA 단위에서 MHC mRNA 아형을 구분하려는 노력이 시도되고 있으나, MHC mRNA 아형은 염기서열의 유사성(homology)이 높아서 노던 블럿팅(Northern blotting), 인싸이투 보합결합(in situ hybridization), 또는 RNase 보호 분석법(RNase protection assay) 등으로는 분리 및 정량하는 데 제한이 있어 각 근육에서 MHC mRNA 아형의 구성비의 차이를 정확히 알 수 없다. 그러나 경합적 중합효소 연쇄반응법(competitive polymerase chain reaction, 이하 경합적 PCR)은 상기 방법보다 훨씬 더 적은 양을 검출할 수 있고, attomol(10^{-18} mol) 단위까지도 정량할 수 있으며, MHC mRNA 아형을 분리하고 정량하는데 적합한 방법으로 알려지고 있다.[9)10)]

본 연구는 경합적-PCR을 이용하여 갑상인두근과 윤상인두근에서 MHC mRNA 아형을 분리 정량함으로써 갑상인두근과 윤상인두근의 MHC mRNA 아형의 구성 차이에 따른 기능적 특성을 구분하는 데 목적이 있다.

재료와 방법

실험 재료

200 300 g 사이의 정상 Sprague-Dawley형 흰쥐를 실험동물로 사용하였다. 흰쥐를 Ketamine hydrochloride (50 mg/kg)로 마취하고 수술 현미경하에서 갑상 인두근과 윤상 인두근을 적출하였다. 한 마리로부터 얻을 수 있는 근육의 양이 적어 1회의 실험을 위해 3마리에서 얻은 검체를 모아서 사용하였다. 얻어진 검체는 즉각 액체 질소로 -70℃까지 온도를 낮춘 isopentane에서 급속 냉동하여 실험을 할 때까지 -70℃에서 보관하였다.

PCR 시발체의 제작

PCR 시발체(primer)로는 흰쥐 MHC 유전자의 3′말단으로부터 620 660 염기 서열 부위에 상보적인 염기 배열을 가지는 감각 시발체(sense primer)를 사용하였으며, 이는 MHC 아형간에 공통되는 염기서열을 가진 변성 시발체(degenerated oligonucleotide)로 제작하였다. 반면 항감각 시발체(antisense primer)는 이미 알려진 각각의 흰쥐 MHC mRNA 아형에 대해 특이적인 염기 배열을 가진 3′말단에 상보적인 염기배열을 가지는 각기 다른 시발체를 사용하였다(Table 1).[9)10)] 대조 유전자로는 흰쥐의 β-actin에 대한 한 쌍의 시발체를 사용하여 전사 효과 및 증폭 효율을 비교하였다(Table 1).

PCR 경합체(PCR competitor)의 제작

MHC mRNA 아형에 대한 경합체(competitor)는 1개의 감각시발체와 7개의 항감각시발체(2A MHC, 2B MHC, 2X MHC, 2L MHC, α-cardiac MHC, β-cardiac MHC, neonatal MHC, embryonic MHC)를 40 80 bp 크기로 제작한 후, PCR을 이용하여 흰쥐의 2A MHC(Genebank accession No. L13606) 유전자의 400 bp DNA 단편에 연결하여 제작하였다.[9)10)] 경합체 제작에 사용된 상방시발체는 AGAAGGCCAA**G**AA**A**GCCAT의 염기 서열을 가지도록 하였다. β-actin에 대한 경합체는 178 bp 크기의 DNA 단편에 β-actin에 대한 한 쌍의 시발체를 양 끝에 연결하여 제작한 것을 사용하였다.[10)] 경합체는 pGEM-T vecor(Promega, Madison, WI, USA)에 연결하여 ABI 373 A automated DNA sequencing system(ABI)을 이용하여 염기서열을 관찰하였다. 경합체의 PCR 산물의 크기는 각 MHC mRNA 아형의 PCR 산물의 크기(613 683 bp)와 119 168 bp의 차이로 구분되었다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotide sequences and the expected length of PCR products of MHC transcripts and competitor

Primers	Oligonucleotide sequences	Expected length of PCR products MHC transcripts (competitor)
Sense primers	5AGAAGGCCAARAARGCCAT3	
consensus	5GAGAAGAGCTATGAGCTGCC3	
β-actin		
Antisense primers		
β-actin	5CCAATCCACACAGAGTACTTG3	295 bp (219 bp)
2A	5TTACAATAGGATTAAATAGAA3	644 bp (519 bp)
2B	5TTGATATACAGGACAGTGACA3	624 bp (458 bp)
2X	5TTTTTTATCTCCCAAAGTCG3	645 bp (478 bp)
2L	5CCCAGTCTCCCTCTGCTCT3	605 bp (437 bp)
neonatal	5AGTCAGCAGTGGGAGAAAAG3	658 bp (539 bp)
embryonic	5ATGTGGAAAGGGGTTACGT3	683 bp (558 bp)
β-cardiac	5TTTCTGCCTGAAGGTGCTGT3	613 bp (498 bp)

경합적 PCR

냉동 보관된 갑상인두근과 윤상인두근에서 TRIZOL 용액(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 총 RNA(total RNA)를 추출하였고, 총 RNA 0.5 μg을 Superscript Preamplification System(Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 역전사시켜 cDNA를 만들었다. 이를 4배로 희석하여 80 μl의 cDNA를 만든 후 MHC mRNA 아형들이 존재하는지 확인하기 위해 1 μl을 이용하였으며, 감각시발체와 7개의 항감각시발체를 이용하여 각각 PCR을 시행하여 2% 아가로스 겔에서 전기영동법으로 이동시켜 PCR 산물의 크기를 확인하였고 이를 pGEM-T vector(Promega, Madison, WI, USA)에 연결하여 ABI 373A automated DNA sequencing system(ABI)을 이용하여 염기서열을 관찰하였다. cDNA에서 MHC mRNA 아형의 존재가 확인되면 cDNA 1 μl와 3배씩 연속적으로 희석한 경합체 1 μl를 함께 섞어 각각의 MHC mRNA 아형에 대해 경합적 PCR을 시행하였다. 희석된 경합체의 농도는 1 fmol(10^{-15} mol), 0.333 fmol, 0.111 fmol, 0.037 fmol, 0.0123 fmol, 0.00412 fmol, 0.00137 fmol, 0.000457 fmol, 0.000152 fmol, 0.000051 fmol(0.051 amol)이었다.

PCR은 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 90초간 진행하였고, 이를 38회 반복하였다. 경합체 없이 cDNA만 넣어 시행한 PCR 산물과 경합체와 cDNA를 모두 넣지 않고 시행한 PCR 산물을 각각 양성 대조군과 음성 대조군으로 사용하였다. 각 MHC mRNA 아형에 대해 경합적 PCR을 3회씩 시행하였다.

PCR 산물의 정량

PCR 산물은 에티디움 브로마이드(Ethidium bromide)로 염색하여 2% 아가로스 겔에서 전기 영동법으로 분리하였다. 이를 폴라로이드(300 dots/in)로 사진을 찍어 HP deskscan II(Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)와 National Institute of Health Image software(version 1.60)를 이용하는 화상 분석을 통하여 분리된 PCR 산물을 광학적 밀도 측정치(Optical density)로 변환하였다. 광학적 밀도 측정값을 선형 회귀 분석(linear regression analysis)을 이용하여 각 MHC 아형과 이미 농도를 알고 있는 경합체의 광학적 밀도 측정값이 동일한 지점을 회귀분석으로 구하여 MHC 아형의 농도를 측정하였다. 각 분석 단계에서 발생할 수 있는 오류를 보정하기 위해 분리된 PCR 산물의 광학적 밀도 측정치(Optical density)로 변환하는 과정을 3회 반복 시행하였다. Table에 기술된 MHC 아형의 농도는 '평균값±SE'로 표기하였다.

결 과

RT-PCR에서 2A MHC, 2B MHC, 2X MHC, neonatal MHC 등은 갑상인두근과 윤상인두근 모두에서 관찰되었으나, β-cardiac MHC는 윤상인두근에서만 관찰되었고, embryonic MHC와 2L MHC는 모두에서 관찰되지 않았다(Fig. 1).

경합적 PCR에 의하여 측정된 MHC mRNA 아형에 대한 농도는 갑상인두근에서 2X MHC, 2B MHC, 2A MHC 순으로 각각 18.9±1.9 amoles, 1.7±0.2 amoles, 1.6±0.3 amoles 이었고, neonatal MHC는 0.01 amoles 미만

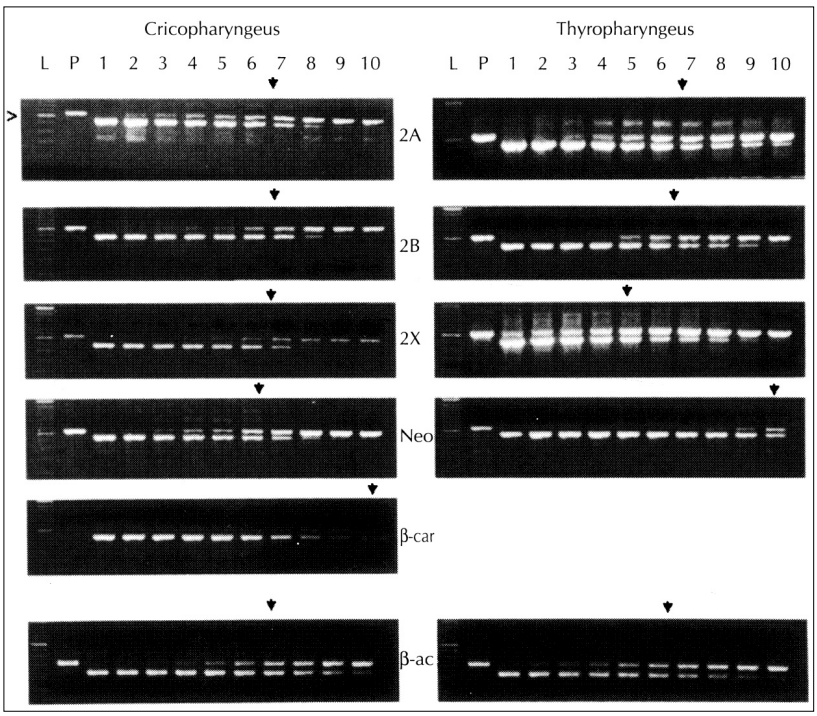

Fig. 1. MHC mRNA isoforms and β-actin on a 2% agarose gel by competitive PCR of cDNA from the thyropharyngeus muscle and cricopharyngeus muscle. L is 100 bp ladder with the bright bands (arrowheads) representing 600 bp. Symbol (+) means a RT-PCR band of MHC mRNA transcripts without competitor. For competitive PCR, the initial concentration of the competitor was 1 fmol (lane 1) and 3-fold serial dilutions, such as 333 amoles (2), 111 amoles (3), 37 amoles (4), 12.3 amoles (5), 4.12 amoles (6), 1.37 amoles (7), 0.46 amoles (8), 0.15 amoles (9), and 0.05 amoles (10) were used. Upper bands of the PCR products are targets and lower bands are competitors. Arrows point to approximate concentration at which target and competitor are at the same concentration. The thyropharyngeus muscle expressed predominant 2X MHC with lesser percentage of 2A MHC and 2B MHC. The cricopharyngeus muscle expressed predominant neonatal MHC. Approximately equal percentage of 2X MHC, 2A MHC, and 2B MHC were expressed. Neo ; neonatal MHC, Emb ; embryonic MHC, β-car ; β-cardiac MHC.

Table 2. Myosin heavy chain (MHC) mRNA composition of Thyropharyngeus and Cricopharyngeus muscle in rats

MHC isoforms	Composition, %	
	Thyropharyngeus muscle	Cricopharyngeus muscle
2A	7.0±1.5%	27.9±6.8%
	(1.6±0.3)	(2.4±0.6)
2B	7.5±0.9%	19.8±1.4%
	(1.7±0.2)	(1.7±0.1)
2X	85.1±8.6%	17.4±2.5%
	(18.9±1.9)	(1.5±0.2)
2L	ND	ND
Neonatal	<0.1%	34.9±4.2%
	(<0.01)	(3.0±0.4)
Embryonic	ND	ND
β-cardiac	ND	<0.1% (<0.01)
β-actin	(5.4±0.6)	(3.1±0.5)

Values are mean±SE. Three competitive PCRs were performed on cDNA of each muscle and gels were scanned once and the peaks were selected 3 times. Abbreviations : ND, not detected

이었다. 비율로 구분하면 2X MHC가 85.1%±8.6으로 가장 높았고, 2B MHC는 7.6%±0.9, 2A MHC는 7.2%±1.5 이었으며 neonatal MHC는 0.1% 미만이었다. 2L MHC, β-cardiac MHC, embryonic MHC 등은 발현되지 않았다. 윤상인두근은 neonatal MHC, 2A MHC, 2B MHC, 2X MHC 순으로 발현되었으며, 그 농도는 3.0±0.1 amoles, 2.4±0.6 amoles, 1.7±0.2 amoles, 1.5±0.1 amoles 이었고, β-cardiac MHC는 0.01 amoles 미만이었다. 비율로 구분하면 neonatal MHC가 34.9%±4.2로 가장 많았으며, 2A MHC, 2B MHC, 2X MHC는 27.9%±6.8, 19.8%±1.4, 17.4%±2.5이었고, β-cardiac MHC는 0.1% 미만으로 발현량이 적었다. 윤상인두근에서 2L MHC와 embryonic MHC는 발현되지 않았다(Table 2, Fig. 1).

β-actin은 모두 검출되었고, 농도는 윤상 인두근과 갑상인두근 검체 각각에서 3.1±0.1 amol, 5.4±0.3 amol로 측정되었다.

고 찰

이 연구에서 시행한 경합적 PCR법은 MHC와 같이 아형간에 서로 유사성이 높아서 mRNA 단위에서 노던 블럿팅이나 RNase 보호분석(RNase protection assay)으로 발현량을 정량화하는데 어려움이 있는 경우에 특히 도움이 된다. 이 연구에서 최저 측정 농도는 0.01 amol까지 가능하였으나 이는 cDNA 단위에서의 측정 농도이기 때문에 mRNA 단위에서와 다소 차이는 있을 수 있다. Ferr 등(1994)[20]에 의하면 노던 블럿팅은 10^5 10^7 분자(target molecules), RNase 보호분석(RNase protection assay)은 5×10^5 10^6 분자(target molecules)를 측정할 수 있으나 PCR법은 세포당 10 100 분자까지 측정가능하기 때문에 더욱 소량의 발현량까지 측정할 수 있다고 하겠다.

이 연구에서 관찰한 결과로 갑상인두근은 빠른 근수축에 관여하는 2A, 2B, 2X의 비율이 거의 100%이고, 윤상인두근은 65.1%이었다. 이는 갑상인두근과 윤상인두근의 ATPase 염색 결과에서 갑상인두근에 제2형 근섬유가 많이 존재하고 윤상인두근에 제1형 근섬유가 많이 존재함으로써 갑상인두근은 빠른 근수축에 관여하고 윤상인두근은 느린 근수축에 관여할 것이라는 보고와 일치한다.[16] 또한, 이 연구에서 갑상인두근은 제2형 근섬유중에서 2X MHC의 구성비가 85.1%로 높으므로 갑상인두근은 빠르고 지속적인 운동을 하는 근육으로 특정지어 질 수 있다. 대표적으로 2X MHC의 발현이 많은 근육으로 성대근(vocalis muscles), 횡경막(diaphragmatic muscles), 교근(masseter muscles) 등을 들 수 있으며, 이들은 전체 MHC중에서 2X MHC가 각각 80.6%, 63.9%, 43.5%의 발현비율을 차지하고 있다.[9][10] 따라서 갑상인두근은 성대근과 같이 지속적으로 빠른 근수축에 관여하는 근육으로 생각되며, 피로현상이 적은 근육으로 특정지어 질 수 있다. 그러나 이 연구에서는 제1형 근섬유에 해당하는 β-cardiac MHC의 발현이 갑상인두근에서는 관찰되지 않았고, 윤상인두근에서는 0.1 % 이하로 매우 낮았다. 이는 갑상인두근과 윤상인두근 모두가 매우 느리고 지속적인 근수축에는 관여하지 않는 것을 의미하며, 연하운동, 구토, 트림과 같은 상부 식도 괄약근(upper esophageal sphincter)의 운동에 느린 근수축이 관여하고 있지 않음을 의미한다.

Brooke와 Kaiser[21]에 의한 근섬유의 분류에서 제2C형의 근섬유가 보고되었는데 이는 미성숙 근섬유로, 골격근의 분화나 재생 과정 중에 나타난다고 하였다. 그리고 제2C형의 근섬유의 발현비율이 갑상인두근은 1.3%, 윤상인두근은 3.6%로 보고되었으나[16] 이 연구의 결과에서는 윤상인두근에서 neonatal MHC의 발현이 34.9%로 매우 높았다. 주산기에 발현되는 MHC인 neonatal MHC의 발현은 흰쥐가 성숙하면서 그 발현량이 감소되는 것으로 알려져 있으며, 일반적인 사지의 근육에서는 그 발현비율이 1% 미만이지만 후두내근이나 안근과 같이 작은 부피의 복잡한 운동을 수행하는 근육에서는 성숙한 뒤에도 발현된다.[9][10] 이러한 neonatal MHC가 오랫동안 성숙한 흰쥐의 윤상인두근에 남아있고 또한 그 발현율이 인체의 어떤 근육보다도 높은 이유에 대하여는 아직 밝혀지지 않았으나 세열(branchial cleft)에서 기원하는 근육의 특징으로 생각할 수 있고, 또한 이러한 neonatal MHC의 지속적 발현이 근육의 복잡한 기능에 맞추어서 아형변화(isotyping switching)에 지속적으로 관여할 수 있을 수도 있기 때문에 이에 대한 연구는 향후 생체외(in vitro) 근육세포 배양에 의한 아형변화의 연구에서 밝혀질 것으로 생각된다. 인체 윤상인두근의 근섬유를 관찰한 병리검사에서도 윤상인두근 내에 근내막결체조직(emdomysial connective tissue)이 증가하는데,[22] 이러한 증가는 외부 손상에 자주 노출됨으로써 발생할 수 있으며, 이러한 손상이 neonatal MHC의 발현량을 증가시키는 원인일 수 있다.

결 론

흰쥐의 갑상인두근과 윤상인두근에서 경합적 PCR을 이용하여 MHC mRNA의 아형의 구성을 관찰한 결과, 갑상인두근은 2X MHC가 주로 발현되는 근조직으로 근속도가 빠르고 지속적인 운동을 하는 근육으로 특정지을 수 있으며, 윤상인두근은 빠른 근수축에 관여하는 MHC의 비율이 65%로 낮으므로 비교적 느린 근수축에 관여할 것으로 생각되며, neonatal MHC가 주로 발현됨으로써 지속적 근손상과 관련이 있을 것으로 생각된다.

중심단어 : 경합적 PCR · 갑상 인두근 · 윤상 인두근 · 흰쥐.

REFERENCES

1) Emerson CP. *Molecular genetics of myosin. Am Rev Biochem 1987; 56:695-726.*
2) Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C. *Forcevelocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibers from rat skeletal muscle. J Physiol 1991;437:655-72.*
3) Lieber RL, Bodine SC, Burkholder TJ, Pierotti DJ, Ryan AF. *Cl-oning and in situ hybridization of type 2A and 2B rat skeletal muscle myosin tail region implications for filament assembly. Biochem Biophys Res Comm 1993;197:1312-8.*
4) DeNardi C, Ausoni S, Moretti P, *et al. Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. J Cell Biol 1993;123:823-35.*
5) Merati AL, Bodine SC, Bennett T, Jung HH, Furata H, Ryan AF. *Identification of a novel myosin heavy chain gene expressed in the rat larynx. Biochim Biophys Acta 1996;1306:153-9.*
6) Periasamy M, Wydro RM, Strehler-Page MA, Strehler EE, Nada-Ginard B. *Characterization of cDNA and genomic sequences corresponding to an embryonic myosin heavy chain. J Biol Chem 1985;260:15856-62.*
7) Periasamy M, Wieczorek DF, Nadal-Ginard B. *Characterization of a developmentally regulated perinatal myosin heavy-chain gene expressed in skeletal muscle. J Biol Chem 1984;259:13573-8.*
8) McNally EM, Kraft R, Bravo-Sehnder M, Taylor DA, Leinwand LA. *Fulllength rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences: Comparisons suggest a molecular basis for functional differences. J Mol Biol 1989;210:665-71.*
9) Jung HH, Han SH, Choi JO. *Expression Levels of Myosin Heavy Chain mRNA in Rat Laryngeal Muscles. Acta Otolaryngol (Stockh) 1999;119:396-402.*
10) Jung HH, Lieber RL, Ryan AF. *Quantification of myosin heavy chain mRNA levels in somatic and branchial arch skeletal muscles using competitive PCR. Am J Physiol 1998;275:C68-74.*
11) Gorza L, Sartore S, Triban C, Schiaffino S. *Embryonic-like-myosin heavy chains in regenerating chick muscle. Exp Cell Res 1983;*

143:395-403.
12) Schiaffino S, Gorza L, Pitton G, Saggin L, Ausoni S, Sartore S, *et al. Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralyzed rat skeletal muscle. Dev Biol 1988;127:1-11.*
13) Mendelsohn MS, McConnel FM. *Function in the pharyngoesophageal segment. Laryngoscope 1987;97:483-9.*
14) Kelly JH, Kuncl RW. *Myology of the pharyngoesophageal segment: Gross anatomic and histologic characteristics. Laryngoscope 1996;106:713-20.*
15) Medda BK, Lang IM, Dodds WJ, Christl M, Kern M, Hogan WJ, *et al. Correlation of electrical and contractile activities of the cricopharyngeus muscle in the cat. Am J Physiol 1997;273:G470-9.*
16) Hyodo M, Aibara R, Kawakita S, Yumoto E. *Histopathological study of the canine inferior pharyngeal constrictor muscle: Implications for its function. Acta Otolaryngol (Stickh) 1998;118: 272-9.*
17) Shindo ML, Herzon GD, Hanson DG, Cain DJ, Sahgal CV. *Effects of denervation of laryngeal muscles; A canine model. Laryngoscope 1992;102:663-9.*
18) Classen H, Werner JA. *Fiber differentiation of the human laryngeal muscles using the inhibition reactivation myofibrillar ATPase technique. Anat Embryol 1992;186:341-6.*
19) DelGaudio JM, Sciote JJ, Carroll WR, Esclamado RM. *Atypical myosin heavy chain in rat laryngeal muscle. Ann Otol Rhinol Laryngol 1995;104:237-45.*
20) Ferre F, Marchese A, Pezzoli P, Griffin S, Buxton E, Boyer V. *Quantative PCR. In: Mullis KB, Ferre F, Gibbs RA editors the Polymerase chain reaction. Boston: Birkhauser;1994. p.67-88.*
21) Brooke MH, Kaiser KK. *Muscle fibre types: How many and what kind? Archives of Neurology 1970;23:369-79.*
22) Bonington A, Mahon M, Whitmore I. *A histological and histochemical study of the cricopharyngeus muscle in man. J Anat 1988; 156:27-37.*