

Expression of Neurotrophic Factors and Their Receptors in Rat Posterior Taste Bud Cells

Dong-II Park¹, Ki-Myung Chung^{1,2}, Young-Kyung Cho^{1,2}, and Kyung-Nyun Kim^{1,2*}

¹Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea.

²Research Institute for Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea.

(received April 09, 2014; revised Jun 03, 2014; accepted Jun 03, 2014)

Taste is an important sense in survival and growth of animals. The growth and maintenance of taste buds, the receptor organs of taste sense, are under the regulation of various neurotrophic factors. But the distribution aspect of neurotrophic factors and their receptors in distinct taste cell types are not clearly known. The present research was designed to characterize mRNA expression pattern of neurotrophic factors and their receptors in distinct type of taste cells. In male 45-60 day-old Sprague-Dawley rats, epithelial tissues with and without circumvallate and foliate papillae were dissected and homogenized, and mRNA expressions for neurotrophic factors and their receptors were determined by RT-PCR. The mRNA expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT3), receptor tyrosine kinase B (TrkB), exclusion of nerve growth factor (NGF), neurotrophin-4/5 (NT4/5), receptor tyrosine kinase A (TrkA), receptor tyrosine kinase C (TrkC), and p75NGFR were observed in some population of taste cell. In support of this result and to characterize which types of taste cells express NT3, BDNF, or TrkB, we examined mRNA expressions of

NT3, BDNF, or TrkB in the PLC β 2 (a marker of Type II cell)-and/or SNAP25 (a marker of Type III cell)-positive taste cells by a single taste cell RT-PCR and found that the ratio of positively stained cell numbers were 17.4, 6.5, 84.1, 70.3, and 1.4 % for PLC β 2, SNAP25, NT3, BDNF, and TrkB, respectively. In addition, all of PLC β 2- and SNAP25-positive taste cells expressed NT3 mRNA, except for one taste bud cell. The ratios of NT3 mRNA expressions were 100% and 91.7% in the SNAP25- and PLC β 2-positive taste cells, respectively. However, two TrkB-positive taste cells co-expressed neither PLC β 2 nor SNAP 25. The results suggest that the most of type II or type III cells express BDNF and NT3 mRNA, but the expression is shown to be less in type I taste cells.

Key words: taste bud, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophins, receptor tyrosine kinase

*Correspondence to: Kyung-Nyun Kim, Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea.
Tel: +82-33-640-2450, Fax: +82-33-642-6410
E-mail: knkim@gwnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

모든 생물은 환경의 변화를 감지하는 감각기관을 갖고 있으며, 특히 화학 성분의 변화를 감지하는 미각 및 후각 기관이 존재한다. 미각 및 후각은 섭취하는 음식물의 탐색, 짝짓기 상대 및 위험의 탐지와 같은 생존에 필수적인 요소를 감지하는 기능을 수행하고 있다[1]. 포유류의 미각기관은 구강, 인두 및 후두에 존재하며 미각기관에서 인지된 미각은 연수, 뇌교 및 시상하부의 미각 중계핵으로 전달된다. 포유류의 혀의 유두와 구강 내에는 구강 내 화학조성의 변화를 감지하는 수많은 미각세포들

이 존재하고 있으며 미각신경세포와 혀의 상피세포의 상호 유도작용에 의하여 맛봉오리가 발생한다. 맛봉오리는 대개 혀의 등 쪽 표면에 형성되며 일부가 구개, 구개 혀궁, 후두덮개의 뒷면, 입인두의 뒤쪽에 존재한다[1].

혀에는 실유두, 버섯유두, 성곽유두 및 잎새유두의 4가지의 유두가 존재하며, 이 중 실유두를 제외한 혀의 앞쪽에 존재하는 버섯유두, 혀의 양쪽 가장자리 하악 어금니 옆에 위치한 잎새유두 및 혀의 뒤쪽 가장자리에 V자 모양으로 배열되어 있는 성곽유두에 맛봉오리가 분포하고 있다. 사람의 버섯유두는 주로 혀의 앞쪽에 밀집하여 분포하며 각각의 유두의 크기는 혀의 뒤쪽으로 갈수록 커지는 경향이 있으며 하나의 유두에 약 3.5개의 맛봉오리를 가지며 다른 포유류와는 달리 사람에서는 맛봉오리가 없는 버섯유두도 자주 발견된다. 사람에서 성곽유두는 성곽유두의 경계를 따라 고랑을 형성하고 있으며 모든 맛봉오리는 유두의 기저부를 따라 고랑을 향해 미공을 내고 있으며 각 유두에는 250개 내외의 맛봉오리를 갖고 있는 것으로 알려져 있으며 잎새유두의 맛봉오리의 수는 버섯유두에서 발견되는 맛봉오리 수보다 많으며 같은 고랑에 위치한 맛봉오리는 같은 미각 자극에 반응하는 기능적인 단위로 기능을 수행하는 것으로 생각된다. 혀의 미각의 신경전도로는 혀의 앞쪽 2/3부위는 얼굴신경(제7뇌신경)을 통하여 슬신경절을 거쳐 미각 중계핵으로 연결되며 혀 뒤쪽 1/3과 인두 부의 미각은 설인신경(제9뇌신경) 및 추체신경절을 거쳐 중추의 미각 중계핵으로 투사된다(Fig. 1) [1].

맛봉오리를 전자현미경으로 관찰하면 주변의 상피기저 세포에서 발생한 미분화된 세포들인 type IV 세포와 차별되는 방추형의 type I, II, III 세포들로 구성되어 있으며, type I 세포는 전자밀도가 높은 세포질을 가지고 있어 암세포("dark" cell)이라고도 불리며 다양한 길이의 미세융모를 구강을 향해 내밀고 있다. 이 세포들의 핵은 함입되어 있으며 nuclear lamellae에 붙어 있는 뭉친 염색질(heterochromatin)을 함유하며 미공측 세포질에 전자밀도가 높은 100-400nm 크기의 과립이 많이 발견되어 맛봉오리의 다른 세포들과 구별할 수 있다. type II 세포는 좀더 전자밀도가 낮고 방추형이거나 서양배 모양의 세포로 type I세포에서 발견되는 핵의 함입이나 뭉친 염색질이 없는 크고 둥근 핵을 가지고 있으며 명세포("light cell")라고 불리기도 한다. Type II 세포의 미공에 가까운 세포질에는 전자밀도가 낮고 부푼 모양의 많은 소포와 활면 세포질 세망이 발견되며 짧지만 같은 길이인 3개의 융모를 미공 쪽으로 내고 있다. Type III 세포는 가늘고 방추형의 형태이며 전자밀도가 낮은 세포질을 보여준다. 이 세포들은 두드러지게 함입되고 가늘게

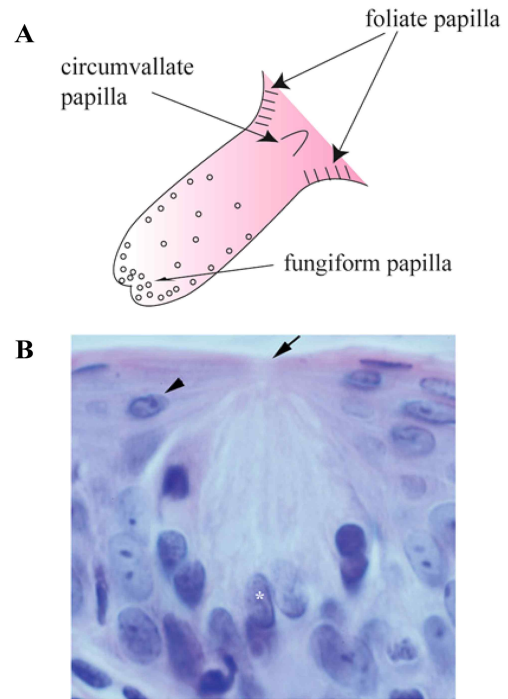


Fig. 1. Schematic diagram showing distribution of tongue papilla including taste buds (A) and representative light micrograph showing a taste bud in foliate papilla of rat (B). Non sensory epithelial keratocytes (arrowhead) and cells in taste bud (*) were easily differentiated by their shape. Subsets of cells in taste bud open their apical end to oral cavity through taste pore (arrow).

늘어진 핵과 핵주위의 존재하는 세포질에서 발견되는 크고 진한 과립으로 type II 세포와 구별할 수 있다. Type III세포의 또 다른 두드러진 특징은 하나의 크고 무딘 미세융모를 미공 쪽으로 내고 있는 점이다. 쥐의 type III 세포에서 신경섬유와 일반적인 구심성 시냅스를 형성하고 있는 것이 관찰된다[2, 3]. Type IV 세포는 맛봉오리의 기저부의 둥근 모양의 세포로 맛봉오리의 전구세포로 생각되며 미각의 전달과정에 참여하지 않는 것으로 생각되어진다.

쥐의 Type I 맛봉오리 세포는 blood group H antigen [4], type II 맛봉오리 세포는 phospholipase C β_2 (PLC β)와 G α -gustducin [5], type III 맛봉오리 세포는 presynaptic plasma membrane protein인 SNAP25와 serotonin (5-HT), ubiquitin carboxyl terminase, protein gene-regulated product 9.5 (PGP9.5), neural cell adhesion molecule (NCAM) [6-8] 등을 면역조직화학검사법에서 면역표지자로 사용한다.

맛봉오리의 세포들은 상피세포와 신경세포의 특징을 같이 가지고 있기 때문에 신경상피세포로 간주된다. 맛봉오리의 세포는 상피전구세포에서 기원하고 약 10일 내외의 짧은 수명을 가지고 있다. 그러므로 맛봉오리는 상피

세포의 주기 동안 계속해서 생성과 소멸을 반복한다. 맛봉오리 세포의 일부는 신경섬유와 시냅스를 형성하며 신경세포에서 공통적으로 발견되는 많은 물질들, 즉 NCAM, neuron-specific enolase (NSE), ubiquitin carboxyl terminal hydrolase, PGP9.5, SNAP-25, serotonin 등을 함유하고 있다[4-8]. 맛봉오리의 맛세포는 미각신경과 시냅스를 하고 짧은 수명을 가지고 있기 때문에 성장이 끝난 뒤에도 평생 동안 시냅스 형성과정을 유지하여야 한다.

포유류의 4개의 신경성장인자, 즉 nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT3), neurotrophin-4 (NT4)는 신경세포의 축삭돌기들이 목표로 하는 조직에 도달하게 하는 중요한 인자로 여겨지며 이렇게 조직에 분포하고 있는 감각신경이 감각세포 및 감각기관의 발달과 분화에 영향을 주는 단백질을 분비하여 이차 감각세포의 발달과 분화에 중요한 영향을 주고 있다[9-11]. 이 축삭돌기들의 말단부에는 신경성장인자들의 수용체인 tyrosine kinase (TrkA, TrkB, 혹은 TrkC)가 존재하여 표적조직에서 분비하는 상응하는 신경성장인자와 결합한다. 특정한 빈도로 NT3은 TrkC와 결합하는 반면에, BDNF와 NT4는 주로 TrkB와 결합하고, 드물게 NT3가 TrkB와 결합한다. 또한 이들 4개의 신경성장인자들은 p75 neuroreceptor (p75NTR)에 모두 결합가능하다[9]. 미각기관에서도 BDNF, NT3, NT4, NGF 그리고 이들의 수용체인 TrkB와 TrkC는 미각기관의 정상적인 발달이나 신경손상에 의한 피해에서 회복하는 것에 중요한 역할을 한다[10, 11]. 그러나 3종류의 방추형 맛봉오리 세포는 서로 다른

기능을 수행하고, 맛봉오리 세포의 종류에 따른 신경성장인자와 수용체에 대한 분포에 대하여는 잘 알려져 있지 않으므로 이를 확인하여 맛봉오리의 유지 중 신경성장인자의 역할에 대한 단서를 구하고자 하였다.

본 연구에서는 조직 역전사-연쇄중합반응(reverse transcription-oligomerase chain reaction; RT-PCR) 실험을 시행하여 맛봉오리에서 신경성장인자와 수용체가 발현하는지 확인하였고, 단일세포 RT-PCR로 맛봉오리 세포 종류에 따른 각 신경성장인자와 수용체의 분포 양상을 확인하여 그 기능을 밝히는 단서를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 맛봉오리의 성장이 일차적으로 완성된[12] 생후 45-60일의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 강릉원주대학교 동물실에서 실험동물용 고품사료와 물을 자유롭게 공급하며 일정기간 사육한 뒤 실험에 사용하였으며, 여성호르몬에 따른 변화를 최소화하기 위하여 수컷만을 사용하였다. 본 연구의 실험계획은 강릉원주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 얻은 후, 위원회의 감독을 받으며 수행 되었다.

조직 RT-PCR 실험

실험동물을 이산화탄소를 이용하여 희생시킨 후 즉시

Table 1. Primers and expected sizes for detecting the mRNA expression of neurotrophic factors and their receptors in the taste buds by RT-PCR

Neurotrophic factor gene (Genebank Accession No.)		Sequence	expected product size (bp)
NGF (AK144588)	forward	CAG GCA GAA CCG TAC ACA GA	357
	reverse	CAC TGA GAA CTC CCC CAT GT	
NT-3 (BC065785)	forward	GGG GGA TTG ATG ACA AAC AC	374
	reverse	AGC CCA ATC ACA AAA CAA GG	
NT-4/5 (BC052191)	forward	CAC TGG CTC TCA GAA TGC AA	363
	reverse	TCC TCC GGG AGA ACT CCT AT	
BDNF (AY057908)	forward	TGG CTG ACA CTT TTG AGC AC	357
	reverse	TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC	
Trk A (AK081588)	forward	CTG GCC ATG TCC CTA CAC TT	357
	reverse	GGT GCA GAC TCC AAA GAA GC	
Trk B (BC052014)	forward	CTG GCT GCT CCT AAC CTC AC	320
	reverse	ACA GTG AAT GGA ATG CAC CA	
Trk C (AK164887)	forward	GGA TTG ATG CAT CTG CCT TT	387
	reverse	TTG GGA TGA GGT GGA GAG AC	
p75NGFR (AK037248)	forward	CTG CAC CCA GAA AAC AGT GA	345
	reverse	AAA TAC CAC CGA GCA CAA GG	

Table 2. DNA sequences of specific primers, annealing temperatures and expected product size for RT-PCR of specific markers for cell type in taste buds and positive control

name		sequence	annealing temperature (°C)	expected product size (bp)
PLC β 2	forward	CTG GAG GCT GAA GTA AAG GAG	40	623
	reverse	GCC CCT GCA TGT ATG TTA GG		
NCAM	forward	TTG TGG GCA TCC TCA TTG TC	52	643
	reverse	TGT CAG TGG TGT GGT CTC GT		
SNAP25	forward	GGC AAT AAT CAG GAT GGA GTA G	58	310
	reverse	AGA TTT AAC CAC TTC CCA GCA		
GAPDH	forward	TGG GGT GAT GCT GGT GCT GA	60	398
	reverse	CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT		

혀를 절제한 다음 차게 보관하였다가 혀의 상피아래에 1 mg/ml의 trypsin inhibitor가 포함된 collagenase (0.5 mg/ml, Sigma, USA)-dispase (type II, 5 mg/ml, Roche, Germany) 복합효소액을 주사하여 36°C에서 배양하였다. 수술현미경으로 관찰하면서 맛봉오리가 포함된 상피표본을 피하조직과 분리하였다. 얻어진 조직을 분쇄기 (Wheaton, 미국)와 초음파 파쇄기 (Vibra Cell, Sonics & Material Inc., USA)로 잘게 부쇄 Corezol total RNA preparation kit (코아바이오시스템, 대한민국)로 RNA를 추출하였다. 성곽유두와 잎새유두를 포함하는 미각상피뿐 아니라 대조군으로 미각상피가 아닌 상피와 해마에서 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 1 μ g와 각각의 primer를 역전사와 PCR을 동시에 수행하는 Accupower RT/PCR Premix (바이오니아, 대한민국)와 함께 넣었다. GeneAmp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, USA)을 사용하여 50°C에서 90분간 역전사 반응을 한 후, 35회의 PCR을 수행하였다. 각 증합반응 주기에는 45초간의 증합반응을 하였다. BDNF, NGF, NT3, NT4와 각각의 수용체인 TrkA, TrkB, TrkC, 그리고 p75NGFR 모두 8가지 단백질의 mRNA에 대한 primer를 제작하였다 (Table 1). 모든 실험에서 역전사가 잘 이루어졌는지를 확인하기 위하여 glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 RT-PCR을 동시에 시행하였다. 음성대조군으로는 역전사과정을 생략한 실험을 사용하였다. 1% agarose gel을 만든 후에 RT-PCR이 끝난 시료들과 DNA marker를 20 μ l씩 loading하고 1X TAE 전개용 완충용액에서 100 V로 일정하게 전개하였다. 전기영동이 끝난 gel은 CCD camera가 부착된 gel documentation system (iMax2000, 코아바이오시스템)을 이용하여 사진을 얻어 컴퓨터에 저장하여 차후 분석하였다.

단일세포 RT-PCR

실험동물을 전신마취 하에서 희생시킨 후 즉시 혀를

절제하고 차게 보관하였다. 절제한 혀의 상피아래에 1 mg/ml의 tyrosine inhibitor가 포함된 collagenase (0.5 mg/ml, Sigma)-dispase (type-II, 5 mg/ml, Roche) 복합효소액을 주사하고 36°C에서 30분간 배양하였다. 잎새유두 또는 성곽유두의 상피조직만을 절제한 다음 Ca²⁺-free Tyrode 용액에서 30분간 배양한 뒤, 기계적으로 가볍게 흔들여 단일 맛봉오리 세포를 얻었다. 역조명 위상차 현미경으로 관찰하면서 입구의 직경이 50 μ m 내외인 미세 pipette을 이용하여 단일 맛봉오리 세포를 얻었다. 얻어진 세포를 lysis 완충용액에 녹인 후 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 사용하여 90분간 역전사를 시행하여 cDNA를 얻고, NT3, BDNF, TrkB, PLC β 2, SNAP25에 대한 PCR을 Smart Taq pre-mix (솔젠트, 대한민국)를 사용하여 수행하였다. 60회의 PCR을 하였는데 처음의 3회는 5분간의 증합반응을 거쳤고 나머지 57회는 30초간의 증합반응을 거쳤다. 실험에 사용한 primer의 염기서열은 table 2에 나타내었다. 마찬가지로 모든 실험에서 역전사가 잘 이루어졌는지를 확인하기 위하여 GAPDH의 RT-PCR을 동시에 시행하였으며, 역전사과정을 생략한 표본을 음성대조군으로 하여 전기영동 및 gel documentation은 조직 RT-PCR과 동일하게 처리하였다.

결과

조직 RT-PCR 실험

본 연구에서 실험군으로 맛봉오리를 포함하고 있는 성곽유두 및 잎새유두를 포함하는 조직, 양성대조군으로 뇌의 해마, 음성대조군으로 맛봉오리를 포함하고 있지 않은 상피를 각각 사용하였다. 주로 진핵세포의 glycolysis에 관여하며 RT-PCR과 western-blot의 대조유전자로 많이 사용되는 GAPDH가 잘 나타나는 것으로 보아 RT-PCR 과정은 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 8가지 특이 primer를

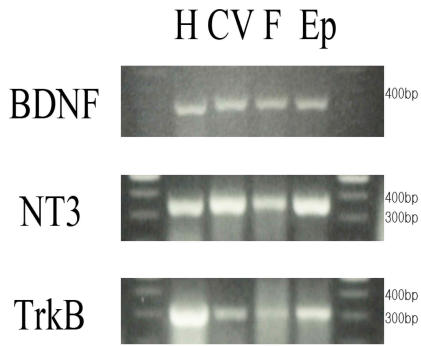


Fig. 2. Results of tissue RT-PCR for mRNA obtained from tongue epithelium and hippocampus. H: hippocampus as positive control, CV: epithelium including circumvallate papilla, F: epithelium including foliate papilla, Ep: non-taste epithelium. The results reveal that taste epithelium as well as non-taste epithelium express neurotrophins and their receptors.

이용하여 RT-PCR을 시행한 결과 374 bp인 NT3, 357 bp인 BDNF, 및 320 bp인 TrkB의 발현이 일부 성곽유두와 잎새 유두를 포함하고 있는 조직에서 확인되었으며 맛봉오리를 포함하지 않는 혀 상피세포에서도 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 그러나 역전사과정을 생략한 경우 PCR 결과물을 확인할 수 없었다(data not shown).

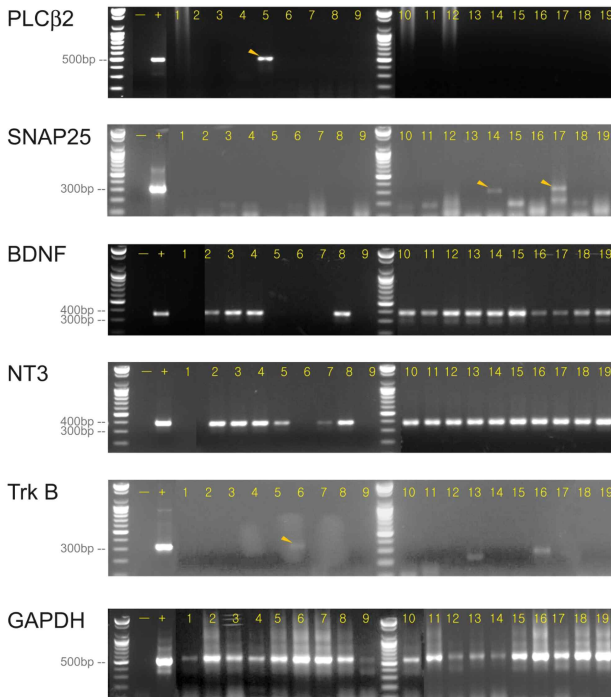


Fig. 3. Representative single cell RT-PCR result. 19 cells obtained from single rat. One cell(lane 5) expressed PLCβ₂, other 2 cells(lane 14, 17) express SNAP 25, lots of cells express BDNF, and NT3, and one cell (lane 6) did TrkB. However, GAPDH was expressed all lanes except negative control.

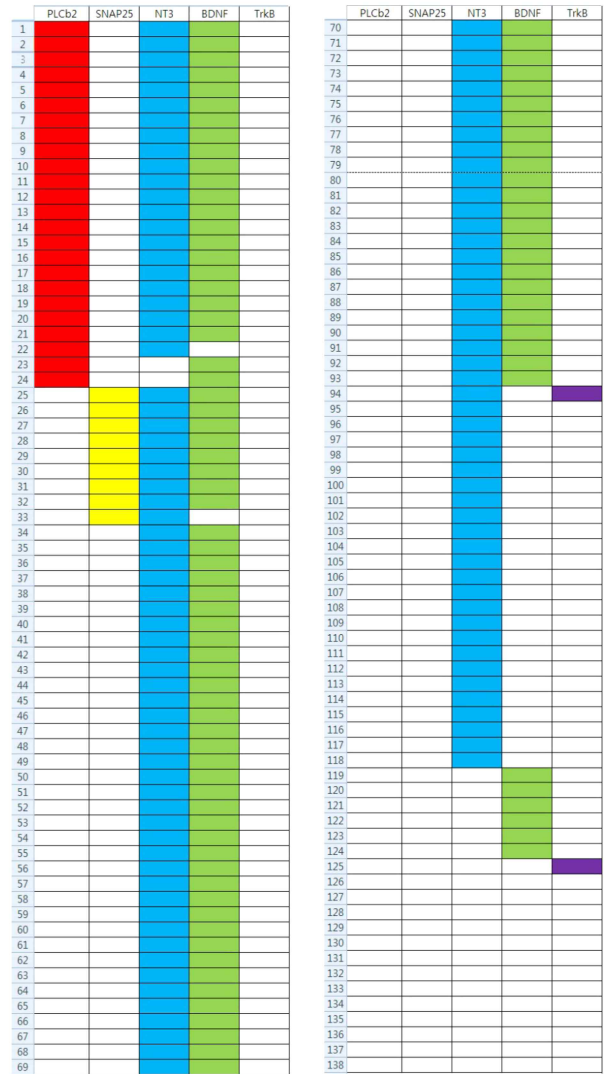


Fig. 4. Summary of results obtained from single cell RT-PCR of 138 taste bud cells from 11 rats. Every rows represents single taste bud cells. red: PLCβ₂, yellow: SNAP25, blue: NT3, green: BDNF, purple: TrkB.

맛봉오리 세포의 종류에 따른 단일세포 RT-PCR

11마리의 흰쥐에서 138개의 세포를 얻어 GAPDH, type II 세포의 표지자인 PLCβ₂, type III 세포의 표지자인 SNAP25 및 조직 RT-PCR에서 확인된 NT3, BDNF, TrkB에 대한 단일세포 RT-PCR을 시행하였다. 단일 세포 RT-PCR 결과 PLCβ₂는 17.4%(25개), SNAP25는 6.5%(9개), BDNF는 70.3%(99개), NT3는 84.1%(108개)의 세포에서 발현하였고 수용체인 TrkB는 1.4%(2개) 세포에서 발현하였다. 각각 1개의 세포를 제외한 모든 PLCβ₂와 SNAP 25 발현세포는 BDNF를 발현하고 있었으며 NT3는 모든 SNAP25 양성세포에서 발현되었으나 PLCβ₂ 양성세포에서는 2개의 세포를 제외한 91.7%가 발현되었

고 2개의 TrkB 발현세포는 모두 PLC β 2나 SNAP 25를 발현하지 않았으며, 2개의 세포 중 하나의 세포는 NT3와 함께 발현되었다(Figs. 3 & 4).

고찰

신경성장인자는 신경계를 생성하는 과정을 조절하고 촉진하는 화합물로서 BDNF와 NT3는 중요한 신경조절 인자들 중의 하나이다. 신경성장인자들은 중추신경계 뿐만 아니라 운동신경과 미각신경 같은 이차감각기관에 존재하며 이미 존재하는 신경세포의 생존과 새로운 신경세포의 분화와 성장 그리고 시냅스 생성을 촉진한다 [12-14].

본 연구에서 4개의 신경성장인자, 즉 BDNF, NGF, NT3, NT4와 수용체인 TrkA, TrkB, TrkC와 p75NGFR에 대한 조직 RT-PCR, 단일세포 RT-PCR을 이용하여 맛봉오리 세포 종류에 따른 신경성장인자와 그들 수용체에 대한 mRNA의 발현양상을 확인하였다. 상피세포를 포함한 조직 RT-PCR실험에서 BDNF, NT3, 그리고 TrkB의 발현이 확인되었으며, 맛봉오리 단일세포 RT-PCR실험에서 NT3, BDNF, 그리고 TrkB의 발현 양상을 관찰하였다.

신경성장인자의 발현

BDNF는 세포질 세막에서 만들어져 dense core vesicle에서 분비되며 주로 세포 표면의 TrkB 수용체에 작용하여 세포 안의 특정 tyrosine에 phosphate분자를 첨가시켜 세포내 신호전달을 촉진시킨다. 성인의 신경계에서 BDNF는 신경조절기능 뿐만 아니라 세포간 시냅스 전달에도 도움을 준다[12]. Ganchrow 등[15]은 2형과 3형을 포함하는 PGP9.5발현 햄스터 맛봉오리 세포에서 BDNF와 NT3의 발현을 확인하였으며, 생쥐의 맛봉오리 세포에서도 비슷한 결과가 보고되어[16] BDNF가 맛봉오리 세포와 미각신경 사이의 시냅스 형성에 관여할 가능성을 제시하고 있다.

본 실험의 단일세포 RT-PCR에서 BDNF가 신경세포와 시냅스를 형성하고 있는 type III 세포 뿐만 아니라 다른 세포에서 비교적 광범위(70.3%)하게 발현되는 것으로 보아 BDNF는 신경세포의 생존과 신생 신경세포의 분화와 성장, 시냅스 뿐만 아니라 맛봉오리 세포들 상호 간의 신호전달에도 관여하는 것으로 추정할 수 있다.

NT3는 본 실험의 단일세포 RT-PCR에서 84.1%의 미각세포에서 발현하였다. 마우스의 맛봉오리에서 type I 세포와 type II세포는 56%의 NT3의 단백질을 발현하는 것이 알려져 있으며[13] type IV세포에서도 NT3가 소량

발현되었다고 보고하였는데[13], type IV세포에서 NT3가 소수이지만 발현된다는 점은 상피세포가 미각세포로 분화하는 과정에서 신경성장인자들이 관여할 가능성이 있다는 것을 시사한다. 그러나 Nostrat 등[18]은 NT3와 BDNF는 서로 다른 맛봉오리 세포에서 발현하며 BDNF는 미각신경의 유지, NT3는 체성감각신경의 유지에 관여한다고 주장하여 본 실험의 결과와 차이를 보이고 있다. 그러나 같은 맛봉오리 세포가 BDNF와 NT3 모두 발현하고[16], 맛봉오리 세포와 미각 신경사이의 시냅스 뿐만 아니라 다양한 신경전달물질을 사용하는 맛봉오리 세포사이의 신경전달이 미각신호의 처리과정에 중요한 역할을 담당한다는 보고[19-21]로 보아 신경성장인자가 미각신경과 시냅스를 형성하지 않는 1형과 2형의 세포에 발현할 가능성을 시사하고 있다.

본 연구에서 기존 연구와는 달리 BDNF와 NT3만 발현하고 NT4/5와 NGF는 발현되지 않았는데 생쥐와 흰쥐의 종간의 차이이거나 단백질을 검출한 앞서의 연구에 비하여 mRNA의 발현을 연구한 본 연구 간의 연구방법의 차이에 기인하는 것으로 추정되지만 차후 명확한 규명이 필요하다.

신경성장인자 수용체의 발현

BDNF의 수용체인 TrkB는 조직 RT-PCR에서 상당한 mRNA 발현을 관찰할 수 있었다. 그러나 미각세포 종류에 따른 mRNA 발현을 조사한 단일세포 RT-PCR 실험에서 TrkB는 type II 세포의 표지자인 PCL β 2와 type III 세포의 표지자인 SNAP25가 발현되는 세포에서는 발현되지 않았다. 이 차이를 규명하기 위해서는 추가적인 실험이 필요하다. 맛봉오리의 최초 생성은 BDNF와 NT3의 관여가 없이도 가능하지만[22], 두 신경인자의 유전자를 제거하면 혀 유두가 변형되는 것이 보고되어[23] 신경인자가 맛봉오리의 발생과 유지에 중요한 것이 알려져 있지만 본 실험에 사용한 실험동물은 맛봉오리의 일차적 성숙이 끝난 시기이므로[12] 맛봉오리에서 신경성장인자의 수용체 발현이 현저히 줄어들었을 가능성이 있다. 또한 NT3의 수용체로만 작용하는 TrkC가 본 연구에서 조직 RT-PCR과 단일세포 RT-PCR에서 발현되지 않은 점은 NT3가 미각세포와 신경세포와의 신호전달에만 관여한다고 추정하거나 혹은 Nostrat[18]의 주장과 같이 체성감각신경의 유지에 더 중요한 기능을 수행할 가능성을 시사한다.

맛봉오리에서의 신경성장인자와 수용체

맛봉오리의 세포들은 상피세포와 신경세포의 특징을 같이 가지고 있기 때문에 신경상피세포로 간주된다. 맛

봉오리의 세포는 상피전구세포에서 기원하고 약 10일 내외의 짧은 수명을 가지고 있다. 그러므로 맛봉오리는 상피세포의 주기 동안 계속해서 생성과 소멸을 반복한다[1].

맛봉오리를 전자현미경으로 관찰하면 주변의 상피기저 세포에서 발생한 미분화된 세포들인 type IV 세포와 차별되는 방추형의 type I,II,III 세포들로 구성되어 있으며, type I 세포가 대부분을 차지하고 10% 내외의 type III 세포와 20% 내외의 type II 세포를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다[24-26]. 또한 II 형의 맛봉오리 세포는 GABA의 수용체를 발현하고[21], III 형의 세포는 미각신경과 시냅스를 하고 미각자극에 의하여 serotonin, GABA 등을 분비하여 감수기를 통한 미각전환에 관여하는 II형 미각세포의 기능을 조절하는 것이 알려져 있다[20].

단일 세포 RT-PCR 실험 결과 type II 세포가 17.4%, type III 세포가 6.4%인 것으로 확인되었다. 그러나 type I 세포보다 다른 종류의 세포들이 맛봉오리의 가장자리에 위치해 더 많은 type II나 type III 세포를 얻었을 가능성도 배제할 수 없다.

본 연구에서 type I, II, III모두에서 BDNF와 NT3가 발현되는 것이 확인되었지만 type II와 type III는 거의 모든 세포에서 발현되었던 반면, type I 세포에서는 상대적으로 그 비율이 낮았다. BDNF 유전자 제거로 중추신경계 관련 신경의 시냅스 기능 억제되는 것이 알려져 있어[27], 맛봉오리에 발현하는 신경성장인자가 맛봉오리의 발생과 유지 뿐만 아니라 미각신경로 시냅스의 기능에 영향을 미칠 가능성도 있다. 이런 사실은 미각 자극이 신경성장인자의 발현을 자극할 가능성 또는 미각 세포 간의 상호 신경전달에도 다른 방식으로 관여할 가능성을 시사하며 이 점은 미각세포와 시냅스를 이룬 신경세포가 포함된 지속적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

흰쥐의 맛봉오리 조직과 단일세포에서 RT-PCR방법을 사용하여 신경성장인자와 수용체의 발현에 대하여 다소의 지견을 얻었으나 생리학적 기능을 보다 명확하게 규명하기 위해서는 유전자 조작 동물 등을 활용한 지속적인 연구가 필요하다.

결론

맛봉오리 세포에서 느끼는 미각 전달은 중요한 생리현상으로 신경세포와 시냅스를 이룬 미각세포는 type III 세포 뿐이지만 미각세포간의 신호전달도 미각의 전달에

매우 중요하다. 또한 맛봉오리 세포들의 수명은 평균 10일의 비교적 짧지만 신생의 미각세포와 신경세포간의 시냅스형성에 관여하는 신경성장인자들과 그들 수용체들의 역할과 발현 양상의 규명은 미각전달의 이해에 필수적이다. 본 연구는 흰쥐의 맛봉오리가 포함된 상피세포의 조직 RT-PCR과 맛봉오리의 미각세포의 단일세포 RT-PCR 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

맛봉오리를 포함한 상피세포 조직 RT-PCR실험에서 포유류의 신경성장인자의 일종인 NT3, BDNF, 그리고 주로 BDNF의 수용체로 작용하는 TrkB의 발현을 확인하였으며, 맛봉오리 세포의 단일세포 RT-PCR에서 BDNF는 70.3%(99개), NT3는 84.1%(108개), 그리고 TrkB는 1.4%(2개)의 세포에서 발현하였다.

이상의 결과들을 종합해 보면 흰쥐의 맛봉오리 세포에서 신경성장물질들과 그들의 수용체들이 맛봉오리 세포의 성장과 분화, 그리고 신경세포와의 시냅스에 관여하며 맛봉오리 세포 상호간의 미각전달에도 관여할 가능성이 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임 (no. 2010-0007135)t.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicting interest.

References

1. Kim KN, Chun SW. Special Senses. in Physiology in Dentistry 2nd ed. edited by Kim JS et al. pp 497-509, DaehanNarae Publishing Co. Seoul, 2009
2. Murray RG, Murray A, Fujimoto S. Fine structure of gustatory cells in rabbit taste buds. J Ultrastr Res. 1969;27:444-461.
3. Fujimoto S, Murray RG. Fine structure of degeneration and regeneration in denervated rabbit vallate taste buds. Anat Rec. 1970;168:393-414.
4. Pumplun DW, Getschman E, Boughter JD Jr, Yu C, Smith DV. Differential expression of carbohydrate blood-group antigens on rat taste bud cells:relation to the functional marker alpha-gustducin. J Comp Neurol. 1999;415: 230-239.
5. Clapp TR, Stone LM, Margolskee RF, Kinnamon SC.

- Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci.* 2001;2:6.
6. Kim DJ, Roper SD. Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol.* 1995;353:364-370.
 7. Yee CL, Yang R, Finger TE, Kinnamon JC. "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5 and serotonin. *J Comp Neurol.* 2001;440:97-108.
 8. Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Nagai Y. Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J Electron Microsc.* 1992;41:375-380.
 9. Oakley B, Witt M. Building sensory receptors on the tongue. *J Neurol.* 2005;33:631-646
 10. Fritsch B, Sarai PA, Barbacid M, Silos-Santiago I. Mice with a targeted disruption of the neurotrophin receptor *trkB* lose their gustatory ganglion cells early but do develop taste buds. *Int J Dev Neurosci* 1997;15:563-576
 11. Cooper D, Oakley B. Functional redundancy and gustatory development in BDNF null mutant mice. *Dev Brain Res.* 1998;105:79-84.
 12. Kim KN, Caicedo A, and Roper SD. Glutamate-induced cobalt uptake reveals non-NMDA receptors in developing rat taste buds. *NeuroReport* 2001;12:1715-1718.
 13. Patterson SL, Schwartzkroin PA, Bothwell M. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm including LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 1992;9:1081-1088
 14. Masako T, Yuko S, Nobuko O, Hiroaki T. Immunohistochemical detection of neurotrophin-3 and -4 and their receptors in mouse taste bud cells. *Arch Histol Cytol.* 2005;68:393-403
 15. Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Ucida N, Kawakoshi K. Expression of GDNF and GFR α 1 in mouse taste bud cells. *J Comp Neurol.* 2004;479:94-102.
 16. Ganchrow D, Ganchrow JR, Verdin-Alcazar M, Whitehead MC. Brain-derived neurotrophic factor-, neurotrophin-3-, and tyrosine kinase receptor-like immunoreactivity in lingual taste bud fields of mature hamster. *J Comp Neurol.* 2003;455:11-24.
 17. Yee CL, Jones KR, Finger TE. Brain-derived neurotrophic factor is present in adult mouse taste cells with synapses. *J Comp Neurol.* 2003;459:15-24.
 18. Nostrat CA, Ebendal T, Olson L. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNA in lingual papillae and taste buds indicates roles in gustatory and somatosensory innervation. *J Comp Neurol.* 1996;376:587-602.
 19. Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 2005;10:1495-1499.
 20. Huang YA, Pereira E, Roper SD. Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS ONE* 2011;6:e25471
 21. Dvoryanchikov G, Huang YA, Barro-Soria R, Chaudhari N, Roper SD. GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds. *J Neurosci.* 2011; 31:5782-5791.
 22. Ito A, Nosrat IV, Nosrat CA. Taste cell formation does not require gustatory and somatosensory innervation. *Neurosci Lett.* 2010;471:189-194.
 23. Nosrat IV, Agerman K, Marinescu A, Ernfors P, Nosrat CA. Lingual deficits in neurotrophin double knockout mice. *J Neurocytol.* 2004;33:607-615
 24. Lindemann B. Taste reception. *Physiol Rev.* 1996;76:719-766.
 25. DeFazio RA, Dvoryanchikov G., Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, and Chaudhari N. Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci.* 2006;26:3971-3980.
 26. Lee SB, Lee CH, Cho YK, Chung KM, Kim KN. Expression of Kainate Glutamate Receptors in Type II Cells in Taste Buds of Rats. *Int J Oral Biol.* 2008;33:83-99.
 27. Laudes T, Meis S, Munsch T, Lessmann V. Impaired transmission at corticothalamic excitatory inputs and intrathalamic GABAergic synapses in the ventrobasal thalamus of heterozygous BDNF knockout mice. *Neuroscience* 2012;222:215-227