

방사선 조사 후 어린 흰쥐 혀의 버섯유두에서 NCAM에 대한 면역조직화학적 연구

정승일, 백기석, 허민석¹, 이혜진, 이승표*

서울대학교 치과대학 구강해부학교실, ¹구강악안면방사선학교실

〈 초 록 〉

얼굴 및 목 영역에서 이루어지는 방사선 치료는 단독으로 사용되거나 경우에 따라 수술요법과 함께 사용되어지기도 한다. 포유류에서 맛을 담당하는 기관인 맛봉오리는 혀, 물렁입천장, 인두, 후두 등에 분포하며, 대부분은 혀의 버섯유두, 성곽유두, 입새유두에 위치하고 있다. 그중 버섯유두는 혀의 앞쪽 2/3에 분포하고 있으며 설치류에서는 상피 부위에 대개 한 개의 맛봉오리를 갖고 있다. 최근 맛봉오리의 미각세포에 여러 가지 신경전달물질이 존재하고 있음이 밝혀져 이 분야에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있는데 이번 실험에 사용된 neural cell adhesion molecule (NCAM)은 신경조직에서 발견되는 막표면 당단백으로 부착이나 인식과 같은 세포간의 상호작용에 작용한다고 알려져 있으며 신경연접 생성과정에도 관여한다고 알려져 있다. 하지만 미각의 퇴화와 관련하여 NCAM을 연구한 예는 아직 없었고 특히 방사선 조사 후 맛봉오리에서 일어나는 NCAM의 변화를 관찰한 연구는 찾아볼 수 없었다. 따라서 본 연구는 방사선을 조사받은 흰쥐의 혀에서 일어나는 NCAM의 변화를 관찰하여 미각의 기전을 연구하는 데 기본 지식을 제공하고 구강암치료를 위해 방사선 요법을 사용하는 경우 발생하는 부작용을 최소화하는데 도움이 되고자 한다.

실험동물로는 생후 20일된 Sprague-Dawley계의 수컷 흰쥐 18마리를 사용하였으며, 방사선 조사는 17 Gy의 방사선을 1회 하였고, 조사 후 1, 7, 20일에 실험군 4마리와 대조군 2마리씩을 각각 희생하였다. 자유부유법 (free floating method)으로 면역조직화학적 염색을 시행하였는데 1차항체로는 rabbit anti-NCAM항체를 사용하였으며, DAB 용액으로 발색시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

방사선 조사를 하지 않은 대조군의 경우 대부분의 맛봉오리 내에서 중심부에 위치한 일부 세포와 신경섬유가 NCAM에 대한 강한 면역반응을 보였으며, 유두의 표면은 편평한 모습을 보였다. 면역반응을 보이는 맛봉오리주위신경섬유는 드물게 관찰되었으나 바닥신경섬유열기 (basal plexus fibers)는 강한 면역반응을 보였다. 방사선 조사 후 1일째 NCAM의 분포는 대조군과 비교하여 큰 차이를 찾을 수 없었으며 주위의 실유두들도 정상적인 형태를 갖고 있었다. 그러나 방사선 조사 후 7일째에는 NCAM에 면역반응을 보이는 맛봉오리 세포의 수가 1~2개로 줄거나 없는 경우도 있었으며 세포의 모양도 비정상적이었다. 바닥신경섬유열기와 맛봉오리밑신경열기의 면역강도 역시 대조군에 비하여 약간 낮았다. 유두의 표면은 변형되어 둥근 돛 모양을 나타내었으며 주위의 실유두들은 일부가 떨어져나가거나 찢어져 관찰되었다. 방사선 조사 후 20일째에는 대조군과 비슷한 모양으로 회복되었으나 NCAM에 면역반응을 보이는 세포가운데 일부는 변형된 모습을 보였고 부분적으로 실유두들도 손상되어 나타났다. 이상과 같은 결과에서 NCAM은 미각과 관련되는 세포에서 나타나 맛봉오리속신경섬유와의 연접에 관여하는 것으로 여겨지며 이를 통해 미각에 작용하는 것으로 사료된다. 또한 방사선 조사에 맛봉오리속세포에서 일시적으로 감소하였다가 다시 나타나 미각의 재생에 기능할 것으로 추측된다.

찾아보기 낱말 : 방사선 조사, 버섯유두, NCAM, 면역조직화학적 염색

서 론

얼굴 및 목 영역에서 이루어지는 방사선 치료는 단독으로

사용되거나 경우에 따라 수술요법과 함께 사용되어지기도 한다. 조직이 방사선 조사를 받게되면 암세포의 증식능력이 저하되는데 혀를 비롯한 입안의 상피조직은 세포의 교체속도 (turn-over rate)가 다른 조직에 비해 빠르기 때문에 암이 발생하는 경우 방사선 치료가 유용하게 쓰인다. 이외에도 머리 및 목 부위에 암이 발생하는 경우 방사선 치료법이 사용되며 불가피하게 입안조직도 방사선 조사를 받게되며, 이러

본 연구는 서울대학교 발전기금 및 간접연구경비에서 지원된 연구비에 의해 수행되었음

* 교신저자: 이승표

Tel: 02-740-8671, Fax: 02-762-6671; splee@plaza.snu.ac.kr

한 결과로 일어나는 부작용의 대표적인 예로 미각 손상, 구강건조증, 점막염(mucositis) 및 궤양 등을 들 수 있다(Conger와 Wells, 1969; Mossman, 1986; Morris, 1996; Maxymiw와 Wood, 1989).

Harrison 등(1997)의 조사에 의하면 혀바닥부의 편평상피암 치료를 위해 방사선 조사를 받은 사람들 가운데 구강건조증이 나타난 사람은 100%이고 그 증상에 대해 불편감을 호소한 사람은 89%이었다. 한편 미각의 변화를 느낀 사람은 34%이었고 불편감을 호소한 사람은 70%이었다. 이처럼 구강건조증 뿐만 아니라 미각 손상을 겪은 경우 불편감으로 인하여 음식물 섭취에 지장을 받게되고 이는 방사선 치료 후 환자의 회복에도 악영향을 미치며 음식의 맛을 제대로 느끼지 못하는 정신적인 스트레스로 인해 삶의 질도 떨어지게 된다(Schiffman, 1983; Linden, 1993).

포유류에서 맛을 담당하는 기관인 맛봉오리는 혀, 물렁입천장(soft palate), 인두, 후두 등에 분포하며, 대부분은 혀의 버섯유두(fungiform papilla), 성곽유두(vallate papilla), 잎새유두(foliate papilla)에 위치하고 있다. 그중 버섯유두(fungiform papilla)는 혀의 앞쪽 2/3에 분포하고 있는데 설치류에서는 윗부분과 옆부분이 편평상피로 둘러싸여 있으며, 밑으로 결합조직에 이어진다(Astback 등, 1997). 대개 위쪽에 한 개의 맛봉오리를 갖고 있으며(Kinnamon, 2000), 일반감각신경은 삼차신경의 가지인 아래턱신경이, 특수감각신경은 얼굴신경의 가지인 고삭근신경이 분포하고 있다(Montavon 등, 1996; Robert, 2000). 맛봉오리 바로 밑에는 일반감각신경과 특수감각신경이 열기를 이루어 맛봉오리밑신경얼기(subpapillary nerve bundle)를 형성하고 있으며 이 중 특수감각신경이 맛봉오리 안으로 들어와 미각세포와 연결(synapse)을 형성하고 있다(Kinnman과 Aldskogius, 1991). 최근 맛봉오리의 미각세포에 여러 가지 신경전달물질이 존재하고 있음이 밝혀져 이 분야에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있는데 이번 실험에 사용된 NCAM은 신경조직에서 발견되는 막표면 당단백으로 부착이나 인식과 같은 세포간의 상호작용에 작용한다고 알려져 있으며 신경연접 생성과정에도 관여한다고 알려져 있다(Nolte와 Martini, 1992; Scarisbrick과 Jones, 1993; Nelson과 Finger, 1993; Ganchrow, 2000). 그 예로 NCAM은 후각수용세포의 생성과 말초신경의 재생에서 축삭의 성장에 참여하는 것으로 추측되어지고 있으며(Daniloff 등, 1986) 또한 NCAM의 종류에 따라 분포나 강도에 변화가 있긴 하나 설치류의 버섯 및 성곽유두내에서 미각세포 및 신경섬유에서 발견되며(Nelson과 Finger, 1993; Smith 등, 1993; Smith 등, 1994; Ganchrow, 2000) 버섯유두의 경우 맛봉오리내 중심부에 세로로 긴 방추형의 미각세포에서 주로 나타나는 것으로 알려져 있다. 하지만 미각의 퇴화와 관련되어 NCAM을 연구한 예는 아직 없었고 특히 방사선 조사 후 일어나는 미각의 손상과 관련하여 맛봉오리에서 일어나는 NCAM의 변화를

관찰한 연구는 찾아볼 수 없었다. 따라서 본 연구는 방사선을 조사 받은 흰쥐의 혀에서 일어나는 NCAM의 변화를 관찰하여 미각의 기전을 연구하는 데 필요한 기본 지식을 제공하고 구강암치료를 위해 방사선 요법을 사용하는 경우 발생하는 부작용을 최소화하는데 도움이 되고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 준비 및 방사선 조사

실험동물로는 생후 20일된 Sprague-Dawley계의 수컷 흰쥐 18마리를 사용하였으며, 실험군에 12마리, 아무 처지도 하지 않은 대조군에 6마리를 사용하였다. 실험동물들은 12시간 간격으로 밤과 낮이 바뀌며 22~25°C의 온도가 유지되는 사육실에서 사육하였으며, 물과 먹이를 충분히 공급해 주었다. 실험군 동물의 머리부분에 선택적으로 방사선을 조사하기 위해서 아크릴로 만든 특수한 쥐틀을 만든 뒤 머리부분만 노출시켜 방사선 조사기 앞에 고정시킨 후 몸통부분은 남으로 차폐하여 방사선 조사를 하였다. 방사선 조사는 17 Gy의 방사선을 MK 1 방사선조사기(Shepherd & Associates, USA)를 사용하여 1회 조사하였다. 방사선 조사 후 1, 7, 20일에 실험군 4마리와 대조군 2마리씩을 각각 희생하였다.

2. 면역조직화학염색

Urethane (16.5% in saline)을 이용하여 전신마취를 시행한 후 흉강을 열어 심장을 노출시키고, 삼관을 좌심실에 넣어 대동맥에 들어간 것을 확인한 후 4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 관류고정하였다. 씹기근육들(masticatory muscles)을 절단하여 입을 벌린 뒤 혀를 적출하고 버섯유두가 존재하는 앞쪽 2/3부위를 얻었다. 동일고정액에서 약 2시간동안 다시 고정을 시행한 후 0.01 M phosphate buffered saline (PBS)으로 세척하고, 10%, 20%, 30% sucrose (0.1 M PBS)에 차례로 넣어두어 동결보존(cryoprotection)을 시행하였으며 농도를 바꿀 때마다 조직이 가라앉는 것을 확인하였다. 냉동절편기를 사용하여 30 μm 두께의 연속절편을 제작한 후 이 절편들을 multiwell plate에 넣어 0.01 M PBS로 수세하고, 0.3% H₂O₂를 함유한 methanol에서 30분간 반응시켰다. 비특이적 반응을 없애기 위해 2차항체의 숙주와 같은 종인 10% normal goat serum (0.1% triton-X 100 in 0.01 M PBS)에 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 1차항체로는 rabbit anti-NCAM항체(1:600 in 0.01 M PBS, Chemicon)를 사용하여 4°C에서 24시간동안 반응시킨 후 2차항체로는 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:100 in 0.01 M PBS, Vector lab.)를 사용하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 다음으로 avidin biotin-peroxidase complex (Vector lab.)를 1:50으로 희석하여 실온에서

1시간동안 반응시켜 발색도를 높이고, 0.05% 3, 3-diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB) 용액으로 발색시킨 후, tris buffer로 3회 세척하여 발색반응을 중단시킨 후 Glycylgel로 봉입하여 광학현미경 (Olympus BHS 313)으로 관찰하였다. 항체의 특이성을 검사하기 위한 대조 실험은 선택된 절편의 바로 다음 절편들에서 일차항체나 이차항체 처리과정만을 생략한 채 동일한 과정을 거쳐 시행하여 비교하였다.

결 과

대조군의 경우 방사선 조사 후 1일, 7일, 20일군에서 시기에 따른 차이는 발견할 수 없었다. 대부분의 맛봉오리에서 5개 내외의 맛봉오리속세포 (intragemmal cell)가 면역염색되었는데, NCAM은 세포의 바깥막부위에 표지되어 맛봉오리의 맛구멍 (taste pore)에서 바닥에 이르는 방추형으로 긴 맛봉오리속세포의 외곽선을 뚜렷이 관찰할 수 있었다. 염색되는 세포들은 맛봉오리의 중심부에 위치하고 있었으며 맛봉오리의 주변부나 바깥에 위치한 세포들은 염색되지 않았다. 때때로 일부 세포의 세포질이 점상으로 염색되는 것을 관찰할 수 있었으며 맛봉오리속신경섬유 (intragemmal fiber)의 염색도 확인할 수 있었다. 맛봉오리의 바닥 쪽에 위치한 바닥신경섬유열기 (basal fiber plexus)와 맛봉오리를 둘러싸고 있는 맛봉오리밑신경열기에서는 많은 수의 신경섬유들이 강한 염색도를 보였으나 맛봉오리 안으로 들어가는 수는 적었다. 저배율에서 관찰한 경우 결합조직아래의 근육조직과 혀샘 (lingual gland) 그리고 혈관 주위에서도 신경섬유들이 염색되었음을 알 수 있었다.

한편 맛봉오리의 표면은 편평한 모습이었으며, 주변의 실유두들은 명확한 각화양상을 보였다 (Fig. 1). 방사선 조사 후 1일군의 맛봉오리에서 NCAM의 분포는 대조군과 비교하여 큰 차이를 찾을 수 없었다. 맛봉오리의 중심부 주위의 세포들이 염색되었으며 맛봉오리밑신경열기에서도 강한 염색도를 보였다. 또한 맛봉오리 표면이나 주변의 실유두들도 정상적인 형태를 갖고 있었다 (Fig. 2). 그러나, 방사선 조사 후 7일군의 맛봉오리에서는 NCAM에 면역반응을 보이는 맛봉오리속세포의 수는 없어지거나 (Fig. 3), 1~2개로 감소하였으며 (Fig. 4) 세포의 모양도 비정상적인 경우가 많았다. 하지만 여전히 세포의 바깥막부위를 따라 염색이 나타났다. 염색되는 세포는 여전히 중심부에서 위치하고 있었으며, 맛봉오리의 주변부나 바깥에 위치한 세포들은 염색되지 않았다. 맛봉오리속신경섬유의 면역반응은 드물게 관찰되었으며 바닥신경섬유열기와 맛봉오리밑신경열기의 면역강도 역시 대조군에 비하여 약간 낮았다. 저배율에서 관찰한 경우 유두의 표면은 변형되어 둥근 돛 모양을 나타내었으며 주위의 실유두들은 일부가 떨어져 나가거나 찢어져 방사선 조사에 의한 영향을

관찰할 수 있었다. 방사선 조사 후 20일군의 맛봉오리는 대부분이 대조군과 비슷한 모양으로 회복되어 NCAM에 면역반응을 보이는 세포의 수도 증가하고 형태도 정상적이었으나 (Fig. 5) 일부 세포들은 여전히 변형된 모습을 보였고 (Fig. 6) 부분적으로 실유두들도 손상되어 나타났다. 그 외의 신경열기들도 대조군과 유사하게 회복된 모습을 보였다.

고 찰

혀를 비롯한 입안 부위에 방사선 조사 후 일어나는 미각의 손상은 구강건조증이나 전신 질환 등의 간접적 원인에 의한 부분도 있겠으나 가장 주된 원인으로는 구강 내 분포하는 미각 기관 즉 맛봉오리의 손상에 의해서 발생하게 된다. 맛봉오리 내에서 방사선 조사로 인하여 손상될 수 있는 구조물은 크게 맛봉오리속세포와 맛봉오리속신경섬유 두가지를 생각해볼 수 있다. 하지만 신경섬유는 더 이상 분화하지 않는 조직이어서 방사선 조사에 의한 영향이 미미하다는 점을 감안해 볼 때 증식이 활발한 맛봉오리속세포가 방사선 조사에 의해 손상을 받을 것이라 여겨진다 (Esses 등, 1988). 이 실험에서도 맛봉오리속신경섬유나 맛봉오리밑신경다발에 대한 방사선 조사의 영향은 비록 염색도가 좀 낮아지는 것으로 관찰되었으나 그 정도는 그다지 크지 않았다.

방사선 조사 후 일어나는 맛봉오리의 형태학적 변화에 관한 실험을 살펴보면 Goepf와 Fitch (1969)는 생쥐의 머리부분에 방사선 조사 후 혀의 상피부분을 광학현미경으로 관찰하여 조사 직후에는 큰 변화가 없으나 4일 후 바닥세포가 부풀고 핵이 해체되며 5일 후부터 세포층의 수가 감소한다고 발표하였다. 또한 혀의 뒷부분은 궤양이 나타났으나 앞부분의 각화부위는 약간 너덜너덜한 상태로 변화 등을 보인다고 발표하였다. Esses 등 (1988)은 생쥐에 방사선 조사 후 성곽유두부위를 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 맛봉오리 수가 급격한 감소하였다가 다시 빠르게 회복하며 맛봉오리 주위세포가 해체되고 밝은세포 (light cell)와 어두운세포 (dark cell)간의 차이가 줄어들음을 관찰하였다. 그리고 이에 대해 방사선 조사가 신경 절단과 마찬가지로 세포에 영양을 공급하는 신경전달을 차단하여 미각세포의 분화를 억제시킬 지 모른다는 가설을 주장하였다. 본 실험의 7일군에서도 비록 전자현미경적 결과를 비교할 수는 없었으나 대조염색 등을 통한 광학현미경적 관찰에서는 위와 같은 결과를 나타내었다. 한편 NCAM의 맛봉오리 내 발현에 대해서는 주로 중심부에 위치한 밝은세포에서 나타나고 중간세포 (intermediate cell)에서는 일부만이 나타나며 주변부에 위치하는 미성숙세포로 여겨지는 어두운세포에서는 거의 나타나지 않는다는 보고들 (Takeda 등, 1992; Nelson과 Finger, 1993; Smith 등, 1994; Whitehead 등, 1998)이 있어 이번 실험과 일치하는 결과를

보여주었다(Figs. 1, 2). 만일 밝은세포가 중심부 쪽에 위치하며 가장 오래된 세포이고 미각을 담당하는 신경섬유와 연결을 형성한다는 일반적인 가정(Smith 등, 1994; Smith 등, 1993; Delay 등, 1992)이 맞다면 이 세포에서 나타나는 NCAM은 계속 10일 전후의 생존주기(Conger와 Wells, 1969; Smith 등, 1993)로 계속 교체되는 미각세포와 신경섬유간의 연결에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 그렇다면 NCAM은 신경절단 등의 이유로 미각세포에서 퇴화가 일어나는 상황에서도 연결을 유지하기 위해 존재할 것이라는 가정을 할 수 있을 것이다. Smith 등(1993)에 따르면 맛봉오리 지배신경 절단 후 신경연접 소실이 일어나 결국은 NCAM의 발현이 사라지더라도 처음 며칠간은 NCAM의 발현이 일어난다고 하며 Whitehead 등(1998)에 의하면 햄스터의 경우 신경절단 후 때때로 맛봉오리 중심부 한 개의 방추형세포에서 NCAM의 발현이 며칠간 계속 나타난다고 하였다. 이번 실험에서도 방사선 조사 후 1일군에서는 NCAM의 발현이 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았으나, 7일이 지난 후 방사선 조사 당시 미분화 상태이던 세포들이 분화가 되며 중심부로 이동할 시기에 이르면 NCAM이 발현되지 않거나 1~2개의 소수 세포에서만 발현되었다(Figs. 3, 4). 그리고 다시 20일이 지나 방사선의 영향이 어느 정도 사라진 상태에서 다시 NCAM의 발현이 이루어졌다(Fig. 5). 이렇듯 미각세포의 생존주기를 고려해 볼 때 시기적으로 NCAM의 발현과 미각의 회복간의 연관성이 있으며 결과적으로 미각에 있어 NCAM이 역할을 할 것이라 생각된다. 회복 시에 나타나는 NCAM의 역할에 대해서 NCAM은 미각신경이 목표로 하는 미각세포로 자라도록 유도하고, 신경섬유와 성숙한 분화 미각세포를 연결하는데 역할을 할 것이라는 주장이 있다(Smith 등, 1993). 하지만 미각의 회복이 종(species)의 종류와 조사량에 따라 차이가 있겠지만 사람에서 20일에 시작되어 60일에서 120일 사이에 이루어진다는 통계자료(Conger와 Wells, 1969)나 이번 실험에서 관찰된 20일군 흰쥐의 음식물 섭취량이 매우 떨어져 있다는 점등을 고려해 볼 때 20일군에서 아직 미각의 완전한 회복은 이루어지지 않았을 것으로 추측된다. 다만 손상된 세포와 신경섬유간 연결의 재생을 위해 NCAM의 발현되는 세포가 나타나기 시작했으며 이 세포는 대조군과는 달리 Esses의 주장대로 밝은세포도 어두운세포도 아닌 변형된 세포로 제 기능을 하지 못하는 세포일 가능성이 있다고 여겨진다. 이번 실험에서도 7일군에서 뿐만 아니라 20일군의 경우에서도 변형된 세포를 관찰할 수 있어(Fig. 6) 위와 같은 가정을 뒷받침해 주었다.

이와 같은 미각과 관련된 NCAM의 역할에 대한 가정과 이번 실험의 결과 등을 종합하여 볼 때 NCAM이 발현되는 세포가 미각과 관련되며 NCAM이 이 세포의 연결에 역할을 하여 미각의 전달에 기능할 것으로 추정된다. 하지만 광학현미경하에서의 관찰만으로는 부족한 점이 많고 구체적인 분

석에 어려움이 있어 앞으로 면역전자현미경 등을 이용한 추가적인 실험이 필요할 것이다. 그리고 미각의 종류 중 짠맛과 쓴맛에 방사선 조사의 영향이 크다는 점과 연관하여 특정 맛과 관련된 연구의 필요성도 있다(Mossman 등, 1982). 또한 방사선조사는 조직의 재형성과정 연구에 유용한데 조사되는 양에 따라 분화되어 안정상태에 있는 상피세포와 아직 미분화된 세포들을 모두 죽일 수도 있고, 분화세포에는 영향을 주지 않으며 선택적으로 바닥세포(basal cell)들만 죽일 수도 있으며 바닥세포가 세포분열에 들어가는 것을 느리게 할 수도 있다(Esses 등, 1988; Morris, 1996). 따라서 이러한 특성을 지배신경 절단법과 함께 실험에 응용한다면 미각의 기전을 밝히는 데 앞으로 더욱 도움이 될 것으로 사료된다.

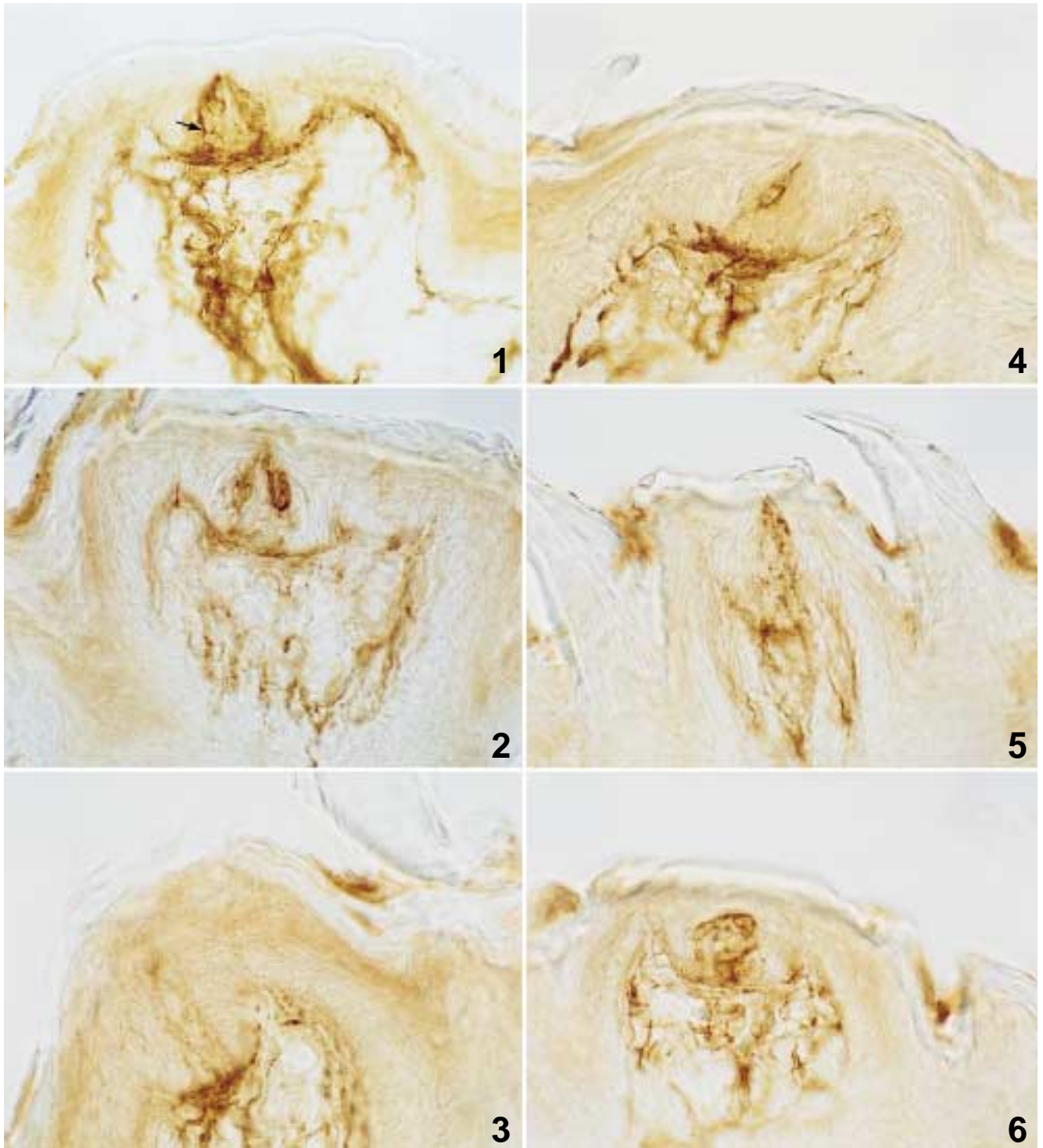
참 고 문 헌

- Astback J, Arvidson K, Johansson O : An immunohistochemical screening of neurochemical markers in fungiform papillae and taste buds of the anterior rat tongue, *Archs oral Biol* 42(2): 137-147, 1997.
- Conger AD, Wells MA : Radiation and aging effect on taste structure and function, *Red Res* 37: 31-49, 1969.
- Daniloff JK, Levi G, Grumet M, Reiger F, Edelman GM : Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair, *J Cell Biol* 103: 929-945, 1986.
- Delay RJ, Kinnamon JC, roper SD : Ultrastructure of mouse vallate taste buds: II. Cell types and cell lineage, *J Comp Neurol* 253: 242-252, 1986.
- Esses BA, Jafek BW, Hommel DJ, Eller PM : Histological and ultrastructural changes of the murine taste bud following ionizing irradiation, *Ear, Nose and Throat J* 67: 478-493, 1988.
- Ganchrow JR : Taste cell function: Structural and biochemical implications, *Physiol Behav* 69: 29-40, 2000.
- Goepf RA, Fitch FW : Radiation effects on oral epithelium in mice, *J Dent Res suppl* 48: 641-645, 1969.
- Harrison LB, Zelefsky MJ, Pfister DG, Carper E, Raben A, Kraus DH, Strong EW, Rao A, Thaler H, Polyak T, Portenoy R : Detailed quality of life assessment in patients treated with primary radiotherapy for squamous cell cancer of the base of the tongue, *Head & Neck* 19: 169-175, 1997.
- Kinnman E, Aldskogius H : The role of substance P and calcitonin gene-related peptide containing nerve fibers in maintaining fungiform taste buds in the rat after a chronic chorda tympani nerve injury, *Exp Neurol* 113: 85-91, 1991.
- Kinnamon SC : A plethora of taste receptors, *Neuron* 25: 507-510, 2000.
- Linden RWA : Taste, *Br Dent J* 175: 243-253, 1993.
- Maxymiw WG, Wood RE : The role of dentistry in head and neck radiation therapy, *J scientific* 55(3): 193-198, 1989.
- Miragall F, Kadmon G, Husmann M, Schachner M : Expression of cell adhesion molecules in the olfactory system of the adult

- mouse: presence of the embryonic form of N-CAM, *Devl Biol* 129: 516-531, 1988.
- Montavon P, Hellekant G, Farbman A : Immunohistochemical, electrophysiological, and electron microscopical study of rat fungiform taste buds after regeneration of chorda tympani through the non-gustatory lingual nerve, *J Comp Neurol* 367: 491-502, 1996.
- Morris GM : Effects of radiation on the cell proliferation kinetics epithelial tissue-therapeutic implications, *Br J Radiol* 69: 795-803, 1996.
- Mossman KL : Gustatory tissue injury in man: Radiation dose response relationships and mechanisms of taste loss, *Br J Cancer* 53(Suppl VII): 9-11, 1986.
- Mossman K, Shatzman A, Chencharick J : Long-term effects of radiotherapy on taste and salivary function in man, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8(6): 991-7, 1982.
- Nelson GM, Finger TE : Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds, *J Comp Neurol* 336: 507-516, 1993.
- Nolte C, Martini R : Immunocytochemical localization of the L1 and N-CAM cell adhesion molecules and their shared carbohydrate epitope L2/HNK-1 in the developing and differentiated gustatory papillae of the mouse tongue, *J Neurocytol* 21: 19-33, 1992.
- Robert AF : Neurobiology: Tepid tastes, *Nature* 403(6772): 837-839, 2000.
- Scarlsbrick IA, Jones EG : NCAM immunoreactivity during major developmental events in the rat maxillary nerve-whisker system, *Dev Brain Res* 71: 121-135, 1993.
- Schiffman SS : Taste and smell in disease, *N Engl J Med* 308(22): 1337-1343, 1983.
- Smith DV, Klevitsky R, Akesson RA: Expression of the neural cell adhesion Molecule (NCAM) and polysialic acid during taste bud degeneration and regeneration, *J Comp Neurol* 347: 189-196, 1994.
- Smith DV, Richard AA, Michael TS : NCAM expression by subsets of taste cells is dependent upon innervation, *J Comp Neurol* 336: 493-506, 1993.
- Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Nagai Y : Neural cell adhesion molecule of taste buds, *J Electr Microsc* 41: 375-380, 1992.
- Whitehead MC, Ganchrow JR, Ganchrow D, Yao B : Neural cell adhesion molecule, neuron-specific enolase and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in hamster taste buds after chorda tympani/lingual nerve denervation, *Neuroscience* 83(3): 843-56, 1998.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Photograph of a fungiform papilla of control rat. Centrally located NCAM-IR cells, and IR fiber (arrow) in the bud were seen. × 600
- Fig. 2.** Photograph of a fungiform papilla 1 day after radiation. Taste bud had no detectable changes compared to the control group. × 600
- Fig. 3.** Photograph of a fungiform papilla 7 days after radiation. NCAM-IR intragemmal cells were disappeared, and the surface of the papilla was transformed into dome shape. × 600
- Fig. 4.** Photograph of a fungiform papilla 7 days after radiation. Only one intragemmal cell was immunostained. × 600
- Fig. 5.** Photograph of a fungiform papilla 20 days after radiation. A restored, normal looking taste bud was seen. × 600
- Fig. 6.** Photograph of a fungiform papilla 20 days after radiation. The number of NCAM-IR intragemmal cells was restored, however the cell shape was deformed. × 600



— Abstract —

Immunohistochemical Study of the Expression of NCAM in the Fungiform Papilla of the Young Rat Tongue Following Single Dose Radiation

Seung-II Jung, Ki-Suk Paik, Min-Suk Heo¹,
Hye-Jin Lee Seung-Pyo Lee*

Department of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

¹Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

Radiotherapy in the treatment of head and neck cancers is often used either alone or in addition to surgery. Radiation disrupts the proliferative capacity of the cancer while doing as little damage as possible to the normal tissue. Nevertheless, conventional radiotherapy of advanced head and neck tumors is frequently associated with severe oropharyngeal mucositis. The fungiform papillae are found on the dorsal surface of the anterior 2/3 of the tongue and have one taste bud which always located on the superior side. In recent years, many study have demonstrated the location of neuropeptides in the intragemmal cells of the taste buds. We used neural cell adhesion molecule (NCAM) in this study. NCAM is a membrane surface glycoprotein found in neural tissue that functions in cell-cell interactions such as adhesion and recognition and may contribute to neuronal and receptoneural synaptogenesis. However, to the best of our knowledge, there is no study about NCAM in relation to dysgeusia, especially after radiotherapy. Therefore, we studied the change of the expression of NCAM in the fungiform papilla of the young rat tongue following single dose radiation.

Twenty days old 18 Sprague-Dawley rats were used. Twelve rats were irradiated with a single dose of 17 Gy gamma radiation. We sacrificed rats 1, 7, 20 days after radiation. The anterior part of tongues were removed and cut into at 30 μ m on a cryocut. Using the free floating method, we immunostained sections.

In control group, NCAM is expressed on some intragemmal cells which were located in the center of the bud and intragemmal nerve fibers. NCAM-immunoreactive (ir) perigemmal nerve fibers were rare, however basal plexus fibers and subpapillary nerve bundle showed strong immunoreactivity. One day after radiation, taste buds had no detectable changes of the expression of NCAM. However, seven days after radiation, the number of NCAM-ir intragemmal cells was reduced and the shape of ir cells was deformed. Immunoreactivity of basal plexus fibers and subpapillary nerve bundle was also decreased. The surface of the papilla was transformed into dome shape. Twenty days after radiation, overall forms of buds were recovered except a few deformed NCAM-ir intragemmal cells.

NCAM was expressed in the intragemmal cells which are thought to be related with taste sensation, and we speculate that NCAM participate synaptogenesis. However, more studies using immunoelectron microscopic method are required.

Key words : X-ray radiation, Fungiform papilla, NCAM, Immunohistochemistry