

Protein A-gold와 colloidal gold 입자에 대한 연두금파리 (*Lucilia illustris*) 혈구의 세포성 면역반응

노미전* · 김우갑

고려대학교 이과대학 생물학과

연두금파리 종령유충의 복강내에 이물질로서 protein-A gold 용액(20 nm 크기), colloidal gold 용액(15 nm 크기), 그리고 이들의 혼합액을 주입하여 혈구가 이들을 처리하는 양상을 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

Gold 입자에 대한 혈구의 세포성 면역작용 방식은 식세포작용이었고 이러한 식세포 작용은 연두금파리에서 확인한 prohemocyte, plasmatocyte, granulocyte type I, II, III, 그리고 oneocytoid 등의 6가지 혈구 중 type II granulocyte에 의해서 수행되었다. Gold 입자는 주로 판상의 원형질 돌기를 통하여 혈구 속으로 들어갔으며 coated-pit 로 보이는 구조에 의해서도 받아들이는 것으로 나타났다. 식세포 작용은 gold 용액 주입 후 10분 이내에 빠른 속도로 일어났으며 시간이 경과함에 따라 gold 입자를 함유한 phagosome은 리소소ーム과 융합하여 phagolysosome을 형성하면서 세포질내에 축적되어 있었다.

Gold 용액을 주입한 후 type II granulocyte에서는 세포질 돌기와 전자 밀도가 높은 과립, 그리고 세포 소기관이 소실되는 등의 변화가 일어났다.

protein A-gold 및 colloidal gold 용액에 대한 기본적인 식세포 과정은 별다른 차이 점이 없었으나, gold 입자 섭취 초기 과정과 양, 그리고 multivesicular body의 모습 등에서는 차이점을 보여 주었다.

KEY WORDS: Protein-A gold, Colloidal gold, Lucilia illustris, Cellular immune response, Phagocytosis

곤충도 척추동물과 마찬가지로 이물질의 침입에 대항하는 활발한 방어 체계를 갖고 있다. 외부 물질에 대한 곤충의 일차적 방어는 단단한 외골격과 소화관을 둘러 싸고 있는 영양위막(peritrophic membrane)등의 구조로 인한 장벽이다(Dunn, 1986). 이러한 장벽을 뚫고 혈강내로 들어온 이물질은 혈림프가 수행하는 2차적 면역 반응인 세포성 면역 반응과 체액성 면역 반응에 의해 처리되며(Gupta, 1986) 면역성을 획득지 못한 개체는 이물질 침입에 의해 죽게 된다. 이 중 세포성 면역반응은 온몸을 순환 하고

있는 혈구에 의해 수행되는 바 곤충의 혈구는 세균, 곰팡이, 선형 동물 등의 외부 물질을 식세포 작용, 피낭형성, 결절형성 등에 의해 효율적으로 처리하는 기작을 갖고 있다(Salt, 1970). 현재 까지 곤충에서는 주로 granulocyte와 plasmatocyte가 이러한 반응을 수행하며 그 중에서도 plasmatocyte가 더 중요한 역할을 한다고 알려 지고 있다. 이 두 종류의 혈구는 모두 식세포 작용을 수행하며, 피낭 형성시에는 plasmatocyte가 주로 관여한다. Granulocyte는 과립 속에 가지고 있던 물질을 이물질 표면에 분비함으로써 피낭형성과 결절형성의 초기 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다(Ratcliffe and Rowley, 1979). Lackie(1981)는 혈구가 이물

*본연구는 1992년도 교육부 기초과학 연구비 지원에 의해 이루어짐.

질을 인식할 때 비생물의 경우는 표면 전하등의 물리화학적 요인에 의해 인식하며, 생물의 경우는 세포막내 특정 수용체(receptor)에 의해 인식한다고 하였다.

한편, 체액성 면역 반응은 병원균이나 비병원균 등에 대하여 혈림프내에 이를 인식하는 물질이 생겨 자신을 보호할 수 있는 능력을 말한다(Stevens, 1963). 이는 혈림프 내에 혈구나(Zachary and Hoffmann, 1984) 지방체(De Verno *et al.*, 1984) 등에서 합성된 단백질이 존재하기 때문에 보고되고 있다. 1962년 Stevens가 antibacterial factor를 보고한 이래 현재까지 lysozyme을 비롯하여(Croizier and Croizier, 1978; Hultmark *et al.*, 1980), cecropin과 attacin(Boman *et al.*, 1978; Boman and Hultmark, 1981) 기타 여러 bactericidal protein이 체액성 면역반응에 관여하는 물질로서 발표되었다(Hultmark *et al.*, 1980). 세포성 면역 반응과 체액성 면역 반응의 두 면역 체계는 이물질 침입에 대처하는 공통의 기능을 수행하므로 서로 긴밀한 상호보완적 관계 속에서 이루어져야만 할 것이다. Dunn과 Drake(1983)는 *Manduca sexta*에 비병원성 세균인 *E. coli*와 병원성 세균인 *P. aeruginosa*를 주입하였을 경우 90% 이상이 0-2시간 내에 식세포 작용, 결절형성 등의 세포성 면역 반응에 의해 처리되었으며 나머지 세균은 30-48시간에 걸쳐 천천히 처리되었고 혈림프내에 antibacterial protein이 나타난 것은 세균 주입후 8시간이 지나서 였다고 보고 하였다. 이러한 실험 결과로 볼 때 혈구는 이물질을 인식하여 빠른 속도로 처리함으로써 면역의 초기 반응에 관여하며 antibacterial protein은 이물질이 침입한 후에 혈림프로 분비됨으로써 혈구와 함께 혹은 면역기능이 약해진 혈구를 대신하여 면역 기능을 수행한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 이물질로써 protein A-gold와 colloidal gold 용액, 그리고 이들의 혼합액을 연두금파리(*Lucilia illustris*) 종령유충의 혈구에 주입하여 혈구가 이를 처리하는 양상을 전자현미경을 이용하여 비교 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

연두금파리(*Lucilia illustris* Meigen)의 종령유충을 실험재료로 이용하여, 혈구가 gold 입자를 처리하는 과정을 전자현미경을 사용하여 관찰하였다.

실험 방법

Protein A-gold 용액은 sigma Co.로부터 구입한 제품(20 nm 크기)을 희석하지 않고 그대로 사용하였으며 colloidal gold 용액은 1% HAuCl₄ 용액, 1% C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, 1% tannic acid를 이용하여 Slot와 Geuze(1985)의 방법대로 제조하여 사용하였다(15 nm 크기). 혼합액은 protein A-gold와 colloidal gold 용액을 3:1로 혼합하여 두 gold 입자가 비슷한 농도임을 확인한 후 사용하였다. 연두금파리 종령유충 복강내에 상기의 gold 용액 각각을 개체당 4μl씩 microsyringe로 주입한 후, 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 20시간, 간격으로 혈림프를 채취하였다. 채취한 혈림프는 2.5% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde (phosphate buffer, pH7.3, 4 유지)가 들어 있는 Eppendorf tube에서 20분간 고정시킨 후 3000 r.p.m.으로 원심분리시켜 상층액은 버리고 혈구만을 응축시킨 후 1시간 30분간 전고정을 계속하였다. 고정된 혈구는 0.1 M phosphate buffer(pH7.3, 4°C 유지)로 15분씩 3번 세척한 후, 2% OsO₄ (0.1M phosphate buffer, 4°C 유지)로 2시간 후고정하였다. 동일한 완충액으로 같은 시간 세척한 후 acetone 농도상승 순으로 탈수하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매한 다음 60°C vacuum drying oven에서 36시간 중합반응 시켰다. 포매된 혈구를 Sorvall Porter-Blum MT-II ultramicrotome으로 1μm 두께로 잘라 1% toluidine blue로 염색하여 혈구를 확인한 다음은 섹션편을 만들었다. 이를 copper grid에 부착

시킨 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEM 100C(X)-II 전자현미경으로 80 KV 하에서 관찰하였다.

결과

이물질로서 protein A-gold 용액, colloidal gold 용액, 그리고 이들의 혼합액을 연두금파리 종령유충 체내에 주입한 결과 나타난 세포성 면역반응 방식은 식세포 작용이었으며, 이러한 식세포 작용은 정상적인 연두금파리의 혈구를 관찰한 결과 나타난 prohemocyte, granulocyte type I, II, III, plasmatocyte, 그리고 oenocytoid 등의 6 가지 혈구 중 granulocyte type II에서만 관찰할 수 있었다.

실험에 사용할 protein A-gold와 colloidal gold 용액, 그리고 이들의 혼합액을 현미경으로 관찰하여 각각 20-25 nm, 15 nm, 15-25 nm 크기의 비교적 균일한 gold 입자가 만들어진 것을 확인하였다(Figs. 1-3).

Gold(이하 gold라 함은 protein A-gold와 colloidal gold를 구분하지 않음)용액 주입후 10분이 경과한 혈구의 세포질 표면에 gold 입자가 부착되어 있는 모습을 관찰하였다. Gold 입자들은 혈구의 원형질막으로부터 뺏어나온 돌기에 흡착되어 있거나 돌기가 근접 원형질막에 결합하면서 형성된 것으로 보이는 소포 속에 함유되어 있었다(Figs. 4, 5). 한편, coated pit로 보이는 구조나 원형질막의 함입에 의해 gold 입자가 혈구내로 유입되는 양상도 관찰하였다(Figs. 6, 7).

이물질을 주입하지 않은 상태와 비교해 볼 때, gold 용액 주입후 type granulocyte에는 원형질 돌기와 전자밀도가 높은 과립, 그리고 세포소기관이 소실 되는 등의 변화가 일어났다. 세포질은 gold 용액 주입 후 전체적으로 느슨해졌다(Figs. 8).

Gold 용액 주입후 30분 정도가 경과한 혈구에서는 gold 입자를 함유한 phagosome들이 세포질 안쪽으로 이동되어 온 것을 볼 수 있었고, phagosome은 단독으로 혹은 근접한

phagosome끼리 융합한 후에 리소소움과 결합하여 phagolysosome(= 이차 리소소움)을 형성하여 gold를 입자를 처리하는 것으로 나타났다. 따라서 처음에 전자 밀도가 낮았던 phagosome들은 리소소움과 융합하면서 점차로 그 밀도가 커졌다(Figs. 9). 1시간, 3시간이 경과한 혈구에서는 gold 입자가 세포질 안쪽으로 더 많이 이동하였으며, 마치 골지 장치처럼 보이는 소포 속에 gold 입자가 함유되어 있는 모습도 볼 수 있었다(Fig. 10). Phagosome의 형태든 phagolysosome의 형태든 세포질 깊숙히 들어온 gold는 한동안(관찰 결과로는 20시간 정도까지도) 그대로 축적되어 있었다.

Protein A-gold와 colloidal gold 용액의 각 경우 식세포 작용의 기본 방식은 비슷하였고 gold 입자도 10분 이내에 받아들이는 등 처리 속도 면에서도 별다른 차이점이 관찰되지 않았다. 그러나 gold 입자 섭취 초기 과정과 양, 그리고 multivesicular body의 모양 등에서 차이점을 보였다.

첫째, colloidal gold의 경우 protein A-gold의 경우와 마찬가지로 원형질 돌기에의 흡착과 coated pit로 보이는 구조에 의해서 gold 입자를 받아들이지만, 혈구 밖에 있는 전자밀도가 높은 구조물에 gold 입자가 다량 흡착한 후 이를 그대로 받아 들이는 방법에 의해서도 gold 입자를 섭취하는 것으로 나타났다(Figs. 11, 12). 또한, 하나의 소포 내에서 protein A-gold의 경우는 1-40 여개의 gold를, colloidal gold의 경우는 5-6개에서 수십, 수백개까지의 gold를 관찰할 수 있었다(Figs. 13).

둘째, Protein A-gold와 colloidal gold의 각 경우 multivesicular body의 모습이 다르게 나타났다(Figs. 14, 15).

고찰

곤충의 세포성 면역 반응은 혈구에 의해 이루어지며 이는 혈구가 이물질을 인식한 후, 식세포 작용 또는 피낭 형성 등의 방식에 의해 처리한다

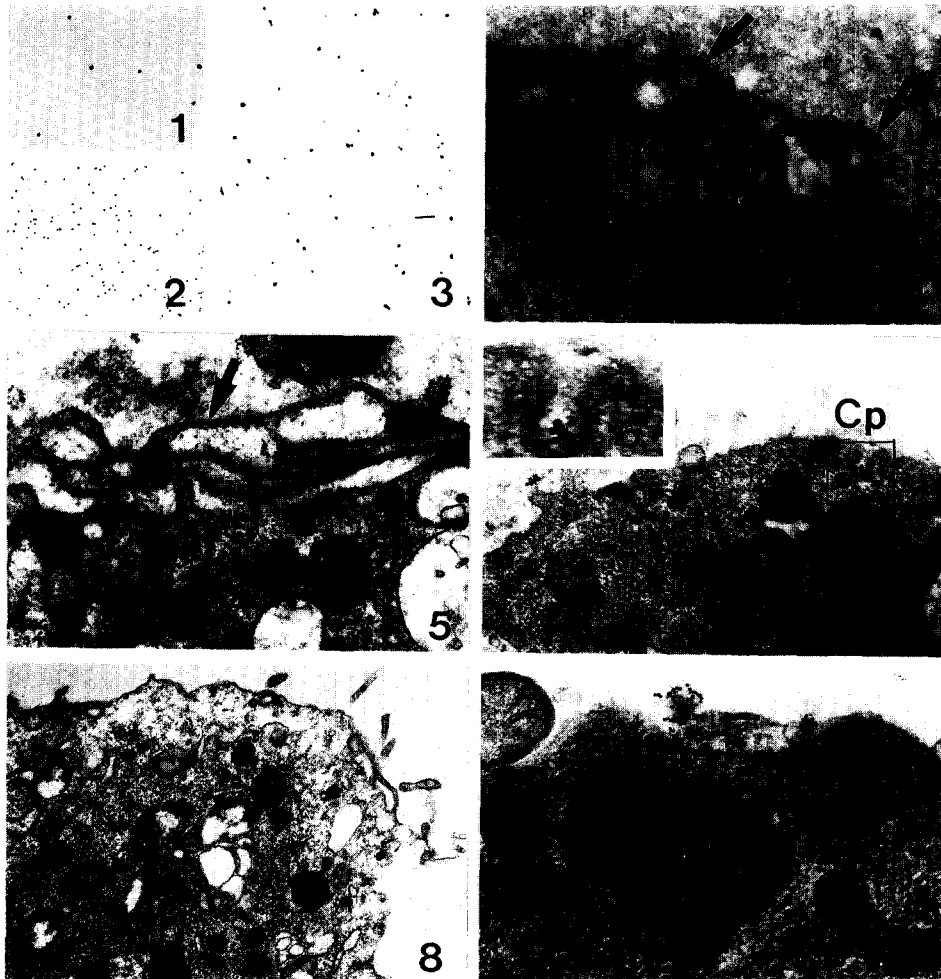


Fig. 1-3. Electron micrographs of protein-A gold (Fig. 1, 20 nm size), colloidal gold (Fig. 2, 15 nm size), and mixture of these (Fig. 3) ($\times 28,000$)

Fig. 4-7. Electron micrographs of peripheral cytoplasm of granulocyte 10 minutes after injection of gold solution. Gold particles adsorbed to plasma membrane projections and gold-containing vesicles formed by fusing with nearby plasma membrane (arrows) are seen. Coated-pit (Cp) and coated vesicle (Cv) containing gold particles are also seen. Inset shows a higher magnification of a coated pit containing gold particles in the square in Fig. 7. (Fig. 4. $\times 22,000$. Fig. 5. $\times 23,400$. Fig. 6. $\times 52,000$. Fig. 7. $\times 28,000$)

Fig. 8. Type II granulocyte after gold injection. Membrane projections, electron dense granules, and cellular organelles decreased. ($\times 13,300$)

Fig. 9. Type II granulocyte 30 minutes after injection of colloidal gold. Primary lysosome (PL) fused with phagosome and become secondary lysosome (SL). ($\times 38,000$)

(Lackie, 1979). 세포성 면역 반응은 혈강 내의 혈구 수가 변화하거나(Gagen and Ratcliffe, 1976; Ryan and Nicholas, 1972) 그 구성 비율이 달라지는 등의 변화가 일어나면서(Ryan and Nicholas, 1972) 빠른 시간내에 효율적으

로 일어나는 것으로 알려져 있다(Salt, 1970).

곤충 혈구에 의한 식세포 작용은 곤충 종이나 주입한 이물질의 종류, 양 등에 따라 이를 수행하는 혈구 종류가 다양하게 보고 되어 왔다. TMV(tobacco mosaic virus)입자를

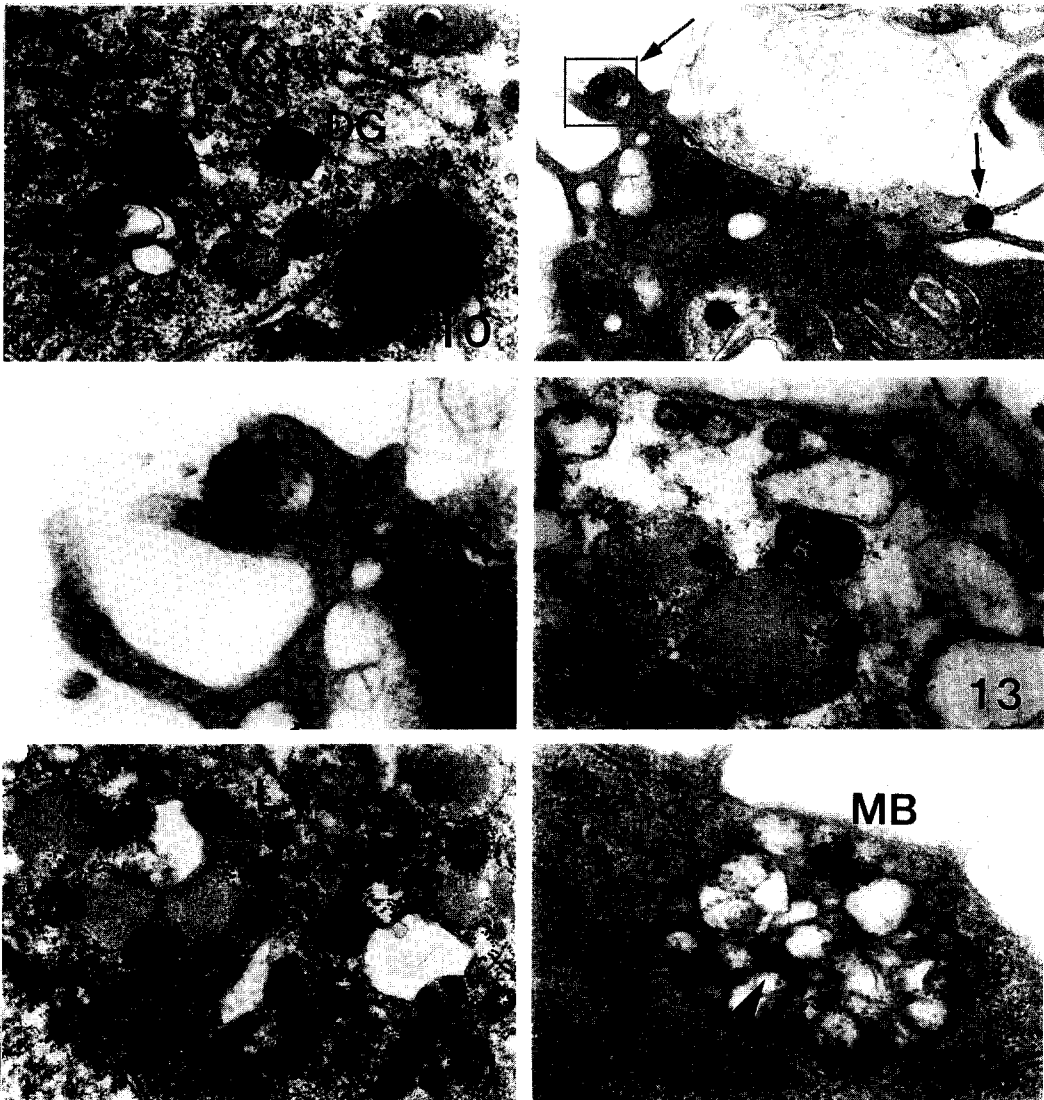


Fig. 10. Golds are present in the Golgi apparatus-like structure (arrow). Electron-dense granule (DG) are also visible. 1 hour after protein A-gold injection. ($\times 32,500$)

Fig. 11. Extracellular electron-dense structures (arrows) containing or adsorbing many gold particles are engulfed by granuloocyte projections. ($\times 25,600$)

Fig. 12. Enlarged picture of the square in Fig. 11. ($\times 64,000$)

Fig. 13. Diverse size of vesicles with one or many gold are seen. 3 h after gold injection. ($\times 39,200$)

Fig. 14. Vesicles gathered together, and lysosome (Ly) are seen. ($\times 22,400$)

Fig. 15. A number of vesicles fused to form multivesicular body (MB), within which electron-dense lysosome (arrow) are visible. ($\times 39,200$)

*Ceratoma trifurcata*에 주입한 실험 결과에서 는 주로 plasmatocyte와 granuloocyte에 의해 (Kim, 1981), *Crassostrea virginica*가 세균

을 처리할 때는 granuloocyte에 의해 (Moley and Cheng, 1975) 식세포 작용이 수행된다고 보고 되었다. 또한 gold 입자를 등검은메뚜기에

주입하였을 때는 plasmatocyte에 의해(Chang *et al.*, 1992), 솔나방에 주입하였을 때는 granulocyte에 의해(Jeon, 1989) 처리되었으며, 같은 불활성 물질인 iron saccharide를 풀무치에 주입하였을 때는 plasmatocyte가 가장 민감하게 반응하였다는 보고(Br helin and Hoffmann, 1980) 등으로 미루어 보아 같은 불활성 무기물이라도 곤충 종류와 이물질의 종류에 따라 다른 혈구들이 반응함을 알 수 있다. 연두금과리 유충에 gold 입자를 주입한 본 실험 결과 원형질 표면에 돌기를 많이 가지고 있던 type II granulocyte에 의해 식세포 작용이 이루어졌다.

Gold가 세포질내로 유입되는 초기 과정에 관하여 Wago(1984), Rizki와 Rizki(1984) 등은 세포질 돌기가 중요한 역할을 한다고 하였으며, Crossley(1975), Ratcliffe와 Rowley(1979) 등은 coated vesicle의 중요성을 강조하였고, Grimstone 등(1967)은 원형질막이 유입하려는 입자 주위로 퍼져나간다고 하였다. 이에 관하여 Lackie(1981)는 곤충 혈구가 이물질을 인식하는 것은 그 물질이 생물인가 비생물 인가에 따라 다르다는 two-tiered system을 제안하기도 하였다. 본 연구결과 평평한 원형질막 부위보다는 막으로부터 돌출한 돌기들에 gold 입자가 많이 부착되어 있었고, 또한 이 판상의 돌기가 원형질막에 결합하면서 형성된 소포속에 gold 입자가 함유되어 있는 모습이 많이 관찰되었으므로 식세포 작용 초기 반응시 가장 주된 역할은 세포질 돌기에 의해서인 것으로 생각된다. 즉 type II granulocyte의 판상 원형질 돌기에 gold 입자가 흡착한후 돌기가 근접 원형질 막에 붙어 소포를 형성함으로써 세포질 내로 gold 입자가 유입되는 것이 gold를 받아들이는 주된 방법이라고 생각된다. 또한 원형질막의 함입에 의해 gold 입자를 받아들이는 모습도 보였고 coated pit로 보이는 구조물에 의해서 gold 입자가 유입되는 양상도 관찰되었다. 이 경우 수용체(receptor)의 관련 여부가 문제가 되는데 본 실험 결과로서는 확인하기 어려웠다. Coated pit와 coated vesicle를 경유한 receptor mediated

endocytosis에 의해 세포가 받아들이는 물질은 주로 단백질, peptide 등이므로 protein-A와 결합한 gold와 colloidal gold 간에는 유입 방식에 있어서 차이가 날 것으로 예상하였으나 예상과는 달리 별다른 차이점을 발견하지 못하였다. 이는 protein-A에 비해 gold 입자의 크기가 훨씬 크므로 protein이 별다른 영향을 미치지 못하였기 때문으로 생각된다. Scott(1971)와 Anderson등(1973)은 바퀴벌레를 대상으로 이들의 혈구가 이물질을 인식할 때는 opsonin이 관여하지 않고 혈구 표면 자체가 이물질을 인식하는데 중요한 역할을 하고 있음을 시사하였다. Rizki와 Rizki(1984)는 *Drosophila melanogaster*의 혈구가 *E.coli*(strain J5)를 처리하는 생체 내, 외 실험을 통해 glucose가 있는 배지에서 자란 세균은 혈구에 흡착하여 세포질내로 유입되는 반면, glucose가 없는 배지에서 자란 세균은 혈구에 흡착하지 않는다고 보고하였다. 이때 세균과 혈구를 생체 외에서 혼합하기 전에 생리적 식염수로 닦아 혈림프 성분을 제거하였으므로 opsonin 매개하에 세균이 혈구 표면에 붙는 것은 아니었다.

한편, 아무런 처리도 하지 않은 정상적인 종령 유충의 granulocyte에는 세포질 돌기가 상당히 많았으나 gold 용액을 주입한 후에 관찰한 granulocyte에서는 세포질 돌기가 많이 소실된 것을 볼 수 있었다. Rizki와 Rizki(1984)는 *Drosophila melanogaster*의 세포성 면역 체계에 관해 보고하면서 비교적 평평한 표면을 갖는 plasmatocyte로부터 섬유성 돌기를 다수 갖는 podocyte로, 또 podocyte로부터 판상의 넓은 돌기를 갖는 lamellocyte로 혈구의 모양이 변해간다고 하였다. 이때 lamellocyte가 가지고 있는 판상의 capsule은 혈강내로 들어온 이물질을 쉽게 포획할 수 있도록 막표면을 변형 시킨 것이라고 하였다. 굴을 재료로 한 연구에서도 위심강(pericardial cavity)에서 모아진 혈구는 등글고 표면에 돌기가 별로 없는 반면 coverslip 표면과 접하게 된 혈구는 평평해지면서 많은 filopodia를 형성하였다(Hinsch and Hunte, 1990). 이렇게 볼때 발생 단계에 따라 혹은 물

질과의 접촉시 혈구 표면이 변화되는 것은 일반적인 현상이라고 여겨진다. 본 실험에서는 granulocyte의 많은 섬유성 돌기들이 gold 입자와 접한 후 세포질 안쪽으로의 유입을 위해 원형질 막에 결합하면서 혈구 표면에 있던 원형질 돌기가 점차 줄어들 것으로 생각된다. 또한 식세포 작용하는 type II granulocyte에서 과립의 수가 현저히 감소한 것이 관찰되었다. 이에 관해 Cheng(1975)은 식세포 작용시 일어나는 탈과립 현상(degranulation)이 lysozyme 효소의 방출과 관련 있다고 하였고, Leippe와 Renwranz(1988) 등은 혈구가 이물질과 접하게 되면 혈구로부터 물질의 방출이 일어나는 것이라고 하였다. 그러나 이러한 탈과립 현상이 식세포 작용이 일어나기 위해 반드시 필요한 조건인지에 대해서는 아직 확실하게 밝혀진 바 없다. 또한 본 실험에서 세포질 전체가 조밀하지 않고 느슨하며 세포 소기관들이 많이 소실된 것을 확인하였다. 이에 관해 Hinsch와 Hunte(1990)는 혈구가 포획한 이물질을 둘러싸는데 막이 필요한 것과 관련 하여 이들 세포 소기관이 소실되면서 세포질내에 남게 된 세포막이 주로 막합성의 전구 물질 즉, phagosome의 막성분으로 된다는 세포막 순환 기작을 제시하기도 하였다.

Cheng(1975)은 세균의 분해는 일차적으로 일차 phagosome에서 일어나고 이차 phagosome으로 옮겨진 후에 분해 과정이 더욱 진행된다고 하였다. Gupta(1985)는 혈구의 세포질 속으로 유입된 소포와 일차 리소소움이 융합되어 이차 리소소움을 형성함으로써 이물질의 분해가 이루어진다고 하였다. 본 연구 결과 gold 입자를 처리할 때도 phagosome이 리소소움과 결합하여 phagolysosome(= 이차 리소소움)을 형성하여 gold를 처리하는 것으로 나타났다. Colloidal gold의 식세포 작용시 관찰되는 multivesicular body는 gold 입자를 처리하고 있는 이차 리소소움의 일종으로 보여진다. 혈구 속으로 들어온 세균의 경우, 리소소움 효소에 의해 분해되어 유용물은 세포질 내에서 쓰이고 나머지는 버리지만 gold의 경우는 별 소용이 없으므로 마치 중금속처럼 세포질내에 장시간 그대로

축적되어 있을 것이라 여겨진다.

Protein-A gold와 Colloidal gold 용액을 각기 주입하였을 때 혈구 표면에 흡착 하는 gold의 양으로 보아 돌기에 붙는 gold의 양은 일정하지 않고 혈림프 내로 들어온 gold의 양과 혈구와 접하게 된 gold의 양에 따라 다르게 받아들이는 것으로 여겨진다. Colloidal gold의 경우 세포 밖에 있는 전자 밀도가 높은 구조물에 gold가 다량 결합한 후, 이를 그대로 세포 안으로 끌어들이는 모습을 볼 수 있었다. Protein A-gold의 경우에는 이러한 방식으로 gold를 받아들이는 모습을 볼 수 없었다. 두 경우 모두 원형질 돌기에 gold가 흡착한다던가, coated pit에 의해서도 물론 gold를 받아들이며 이때 그 양은 colloidal gold의 경우가 protein A-gold보다 많은 것으로 나타났다. 그림 1-3에서 보듯 protein A-gold 보다는 colloidal gold의 농도가 훨씬 컸으므로 받아들이는 양도 colloidal gold 쪽이 많게 나타난 것으로 보인다. 두 용액을 섞어 비슷한 농도로 하였을 때 colloidal gold를 더 많이 받아들이지는 않았다. 따라서 주입한 이물질의 양에 따라 gold 처리 양상은 조금씩 다른 것 같다. 즉, 많은 양의 gold가 한꺼번에 들어왔을 경우에는 같은 방식이라도 많은 양씩, 그리고 소량을 처리할 때 볼 수 없었던 방식까지 동원하여 이물질을 처리하는 것으로 여겨진다. Wittig(1966)는 주어진 조건에서 수행되는 식세포 작용의 최대량을 "phagocytic activity"라고 정의하면서 만약 어떤 물질이 이 값을 넘으면 나머지는 혈강내에 그대로 있다고 하였다. 그는 또 식세포 작용되는 정도는 물질의 크기, 모양 등의 성질과 양에 의해 결정되며 비활성 물질, 죽은 bacillus, 산 bacillus의 순으로 식세포 작용이 어렵게 수행된다고 보고하였다. 관찰결과 하나의 소포 내에 protein A-gold의 경우는 1-40여개 정도의 gold가, colloidal gold의 경우는 5-6개에서 수십, 수백개 정도까지의 gold가 함유되어 있는 것을 볼 수 있었다.

한편, 두 gold의 경우 gold 입자를 함유한 phagosome들의 크기, 모양 등이 서로 상이한

것을 관찰하였다. 굴이 latex bead를 포획할 때 phagosome들이 융합하여 커다란 phagosome이 형성되었다는 보고(Hinsch and Hunte, 1990)와 bean leaf beetle의 혈구가 TMV를 포식할 때도 상당수의 바이러스를 포함한 커다란 phagosome이 관찰 되었다는 보고(Kim, 1981) 등으로 미루어 볼 때 phagosome들이 융합하는 현상은 일반적인 현상인 것 같다. Colloidal gold의 식세포 작용시 많이 보이는 multivesicular body(M.B.)는 단순히 phagosome들의 집합체라기 보다는 여기에 리소소움이 첨가되어 형성된 구조. 말하자면 이차 리소소움의 일종으로 여겨진다. Protein A-gold의 경우는 소포 들이 서로 모여있는 것은 관찰하였으나 colloidal gold와 같은 M.B.의 형태는 찾아 볼 수 없었다. 이러한 현상이 주입한 gold의 양이나 종류 혹은 세포 상태에 의한 것인지에 관해서는 좀 더 연구해 보아야 할 것이다.

인용문헌

- Anderson, R.S., B.Holmes, and R.A.Good, 1973. In vitro bactericidal capacity of *Blaberus craniifer* hemocytes. *J.Invert.Pathol.* **22**: 127-135.
- Boman, H.G., I.Faye, A.Pye, and T.Rasmuson, 1978. The inducible immunity system of giant silk moths. In: Comparative Pathobiology (Bulla, L.A. and T.C. Cheng, eds.) Vol.4, pp.145-163.
- Boman, H.G. and D.Hultmark, 1981. Cell-free immunity in insects. *Trends Biochem.Sci.* **6**: 306-309.
- Brehelin, M. and J.A.Hoffmann, 1980. Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*: study of ultrastructure and clearance. *J. Insect Physiol.* **26**: 103-111.
- Chang, B.S., S.M.Yoe., W.K.Kim, and M.J.Moon, 1992. Electron microscopic study on the hemocytic immune responses to the foreign substances in insect. Response to gold particle. *Korean J.Zool.* **35**: 58-69.
- Cheng, T.C., 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* **266**: 343-379.
- Crossley, A.C.S., 1975. The cytophysiology of insect blood. *Adv.Insect Physiol.* **11**: 117-222.
- Croizier, G. and L.Croizier, 1978. Purification et comparision immunologique de 2 lysozymes d.insects. *C.R. Acad.Sci.Paris.* **286D**: 469-472.
- De verno, P.J., J.S.Chadwick, W.P.Aston, and G.B. Dunphy, 1984. The in vitro generation of an antibacterial activity from the fat body and hemolymph of nonimmunized larvae of *Galleria mellonella*. *Dev. Comp.Immunol.* **8**: 537-546.
- Dunn, P.E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann.Rev.Entomol.* **31**: 321-339.
- Dunn, P.E. and D.R.Drake, 1983. Fate of bacteria injected into naive and immunized larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J.Invert.Pathol.* **41**: 77-85.
- Foley, D.A. and T.C.Cheng, 1975. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the Pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *J. Invert.pathol.* **25**: 189-197.
- Gagen, S.J. and N.A.Ratcliffe, 1976. Studies on the in vivo cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invert.Pathol.* **28**: 17-24.
- Grimstone, A.V., S.Rotheram, and G.Salt, 1967. An electron-microscope study of capsule formation by insect blood cells. *J.Cell.Sci.* **2**: 281-292.
- Gupta, A.P., 1985. Cellular Elements in the hemolymph, In: Comprehensive Insect Phylogeny Biochemistry and Pharmacology (Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert, eds.), Pergamon Press, New York, pp.401-451.
- Gupta, A.P., 1986. Arthropod Immunocytes, In: Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods (Gupta,A.P., ed). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 3-61.
- Hinsch, G.W. and M.Hunte, 1990. Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the american oyster.In: Pathology in Marine Science. pp.479-488.
- Hiltmark, D., H.Steiner, T.Rasmuson, and H.G.Boman, 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7-16.
- Jeon, S.J., 1989. The hemocytic reactions to the introduction of foreign substances(gold particles) into the haemocoel of the pine moth, *Dendrolimus spectabilis* Butler. M.Sc. Dissertation. Korea University, Graduate School.
- Kim, K.S., 1981. Ultrastructure of Bean leaf Beetle (*Ceratoma trifurcata*) hemocytes and their phagocytic activities on Tobacco mosaic virus, a non-beetle-transmitted virus. *J.Ultra.Research.* **75**: 300-313.
- Lackie, A.M., 1979. Cellular recognition of foreignness in two insect species, the American cockroach and the desert locust. *Immunology.* **36**: 909-914.
- Lackie, A.M., 1981. Immune recognition in insects *Dev.*

- Comp. Immunol.* **5**: 191-204.
- Leippe, M. and L. Renwrandt, 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 297-308.
- Ratcliffe, N.A. and A.F. Rowley, 1979. Role of hemocytes in defense against biological agent. In: *Insect Hemocyte*. pp.331-414.
- Rizki, T.M. and R.M. Rizki, 1984. The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In: *Insect Ultrastructure* (King, R.C. and H. Akai, eds.). Plenum Press, New York, Vol 2, pp.579-604.
- Ryan, M. and W.L. Nicholas, 1972. The reaction of the cockroach *Periplaneta americana* to the injection of foreign particulate material. *J. Invert. Pathol.* **19**: 299-307.
- Salt, G., 1970. The cellular defence reactions of insects. *Monogr. Exp. Biol.* Vol.16. pp.118
- Scott, M.T., 1971. Recognition of foreignness in invertebrates. In vitro studies of cockroach phagocytic haemocytes. *Immunology.* **21**: 817-828.
- Slot, J.A. and H.J. Geuze, 1985. A new method of preparing gold probes for multiple labeling cytochemistry. *Europen J. Cell Biol.* **38**: 87-93.
- Stevens, J.M., 1962. Bactericidal activity of the blood of actively immunized wax moth larvae. *Can. J. Microbiol.* **8**: 491-499.
- Stevens, J.M., 1963. Protective effects of several immunizing preparations that produce active immunity in *Galleria mellonella* (Linnaceous). *J. Insect Pathol.* **5**: 129-130.
- Wago, H., 1984. In vitro evidence for the requirement of filopodial elongation for the process of phagocytosis by phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **8**: 7-14
- Wittig, G., 1966. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars II. A consideration of the method of making hemocyte counts. *J. Invert. Pathol.* **8**: 461-477.
- Zachary, D. and D. Hoffmann, 1984. Lysozyme is stored in the granules of certain hemocyte types in *Locusta*. *J. Insect Physiol.* **30**: 405-411.

(Accepted February 5, 1993)

Cellular Immune Responses of *Lucilia illustris* Hemocyte to Protein A- Gold and Colloidal Gold Particles

Mee Jeon Roe and Woo Kap Kim (Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Cellular immune responses of hemocytes to protein A-gold particles (20 nm size), colloidal gold particles (15 nm size) and mixture of these, which were injected into the hemocoel of last larval *Lucilia illustris*, were examined using the electron microscopy.

Cellular immune response of hemocytes to gold was phagocytosis and this was carried out by type II granulocyte out of six types of hemocytes. Gold entered the hemocyte through flattened plasma membrane processes, and also through coated-pit like structure. Phagocytosis occurred within 10 minute after gold injection. Phagosome containing gold particles fused with lysosome to form phagolysosome in the cytoplasm.

Cytoplasmic processes, electron-dense granules, and cellular organelles disappeared in type II granulocyte after gold injection.

There were no difference in the basic way of phagocytosis between protein A-gold and colloidal gold particles, but a little differences were found in the initial gold engulfment way, amount, and multivesicular body patterns.