

## 참굴, *Crassostrea gigas*, haemocytes의 형태 및 면역학적 특징

권문경 · 조병열\* · 최혜승 · 박명애\*\* · 박수일\*\*\*†

국립수산과학원 양식환경연구소, \*울산지방해양수산청, \*\*국립수산과학원 병리연구팀,  
\*\*\*부경대학교 수산생명의학과

## Morphological and immunological characterization of the haemocytes of the oyster, *Crassostrea gigas*

Mun-Gyeong Kwon, Byoung-Youl Cho\*, Hye Seung, Choi, Myoung Ae Park\*\* and Soo-Il Park\*\*\*†

Aquaculture Environment Institute, National Fisheries Research and Development Institute

\*Ulsan Regional Maritime Affairs and Fisheries office

\*\*Pathology Team, National Fisheries and Development Institute

\*\*\*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University

The internal defense system of mollusks consists of circulating haemocytes. In order to understand the morphological characterization of haemocytes, light and electron microscopy were carried out in oyster, *Crassostrea gigas*. Four types of haemocytes were recognized: type I small hyalinocytes, type II large hyalinocytes, type III large granulocytes and type IV small granulocytes. Additionally, the activities of alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP), peroxidase (POD),  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase,  $\beta$ -glucuronidase, PAS, sudan black B and oil red O in haemocytes were analysed by immunocytochemical methods. The results indicate that enzymatic activities were abundant and more active in granulocytes than in hyalinocytes.

After incubation with haemocytes and *Vibrio* FKC, phagocytic index and percentage of phagocytic cell were and shown to be increased from 15 to 120 min. In addition, the enzymatic activities were higher than those of controls: ALP, ACP,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase and  $\beta$ -glucuronidase, indicating that these enzymes can be related with phagocytosis in oyster.

*Key words:* *Crassostrea gigas*, Haemocytes, Immunology, Immunocytochemistry, Phagocytosis

패류의 haemocytes는 shell repair, 영양물질의 소화와 수송, 체내 방어 등 다양한 기능을 수행한다 (Sung, 1988). 패류의 면역 반응에 대해서 아직 불분명한 점이 많지만, 세포성 면역 반응에서 haemocytes는 이물질을 식작용하고, 가수분해 효소를 분비하여 세포내 소화를 하고, lysin (Cheng, 1981) 또는 superoxide anion, hydrogen peroxide와 같은 활성화산소를 분비하여 식작용을 돕는다 (Nakamura *et al.*, 1985; Pipe, 1992). 이

와 같은 병원체와 haemocytes의 상호작용을 이해하기 위해서는 세포독성기작에 대한 정보가 필요하지만 식작용 과정에서 haemocytes의 효소 활성화에 대한 연구는 부족하다.

Haemocytes의 분류를 위해서 형태, 세포화학적 특징 (Pipe, 1990), 밀도구배원심분리법과 면역학적 방법 등을 이용하여 subpopulation을 구분해왔지만 (Bachère *et al.*, 1988; Cheng *et al.*, 1980; Yoshino and Granath, 1983), 현재 같은 종이

†Corresponding Author : Soo Il Park, Tel : 051-620-6141,  
Fax : 051-628-7430, E-mail: parksi@pknu.ac.kr

라도 분류 방법에 따라 다양하게 분류되고 있다.

본 연구에서는 참굴 *Crassostrea gigas*의 haemolymph 중에 있는 haemocytes의 형태적 특징을 조사하고, haemocytes 내의 방어 기능과 관계가 있는 효소 및 다당류의 존재 및 위치를 조사하였다. 또한 *in vitro*에서 항원과 반응시킨 후 효소의 활성 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

실험용 참굴은 경상남도 통영의 수하식 양식장에서 채집하였으며, 실험실에서 약 1주간 순치 후 실험에 사용하였다.

### Haemolymph의 채취

Haemolymph는 멸균 주사기에 M'Berl 등의 modified HAAS (hemocyte anti-aggregate solution) (0.1 M phosphate buffer, 1.5 g/L EDTA, 2.0 g/L NaCl, pH 7.4~7.6)를 채운 후 심장 및 위심강에서 채혈하였다.

### 광학현미경용 haemocytes cytopsin 표본 제작

Haemocytes cytopsin 표본은 slide glass에 haemolymph 100  $\mu$ l를 적하한 후 500 g, 5분간 cytopsin하여 표본으로 사용하였다.

### Haemocytes의 염색

Haemocytes cytopsin 표본을 Pappenheim의 May-Grünwald Giemsa 염색액으로 염색하여, haemocytes의 형태, 크기를 관찰하였다. 염색된 haemocytes 표본에서 250개의 haemocytes 중 각각의 type이 차지하는 비율을 조사하였다 (Oubella *et al.*, 1996).

### Haemocytes의 효소 활성 검사

Haemocytes의 효소 활성은 세포화학적 방법을 이용하여서 각 haemocytes 250 cells 당 활성을 나타내는 세포수를 %로 환산하여 나타내

었다 (Xing *et al.*, 2002). 즉, alkaline phosphatase activity는 naphthol AS-MX phosphate, acid phosphatase activity (Dutcher법)는 naphthol AS-BI phosphate sodium salt, peroxidase activity (DAB)는 DAB Liquid Substrate System (Sigma, D-7304),  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity (Leader법)는  $\alpha$ -naphthyl acetate,  $\beta$ -glucuronidase activity는 naphthol AS-BI glucuronide를 기질로 이용하여 반응시킨 후 haematoxylin으로 후염색하여 활성을 관찰하였다.

### 지방염색 및 다당류염색

Sudan black B와 oil red O 염색으로 인지질과 중성지방, PAS 반응으로 haemocytes 내의 glycogen을 염색하였다.

### 투과전자현미경용 haemocytes 표본 제작

투과전자현미경용 표본을 제작하여 Uranyl acetate & lead citrate 중염색을 한 후 투과전자현미경 (JEM 2010, JEOL LTD.)으로 관찰하였다.

### Haemocytes의 식작용 시험

Haemolymph와 항원 (*Vibrio harveyi* ATCC 14126의 FKC 100 mg/ml)을 동량으로 혼합하여 27°C에서 24시간 배양한 후, 일정 시간별로 식균율과 식균지수를 구하였으며, haemocytes에 대한 alkaline phosphatase, acid phosphatase,  $\beta$ -glucuronidase 및  $\alpha$ -naphthylacetate esterase의 활성 변화를 관찰한 후 양성을 나타내는 수를 백분율로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

패류의 haemocytes는 전자현미경적 형태, 세포화학적 특성 및 면역기능 등을 기초로 하여 다양하게 분류되어 왔으나 대부분 연구자들에 의하여 크게 과립구와 hayalinocytes의 두 종류로 분류되었다 (Hine, 1999). 본 연구에서도 참굴의

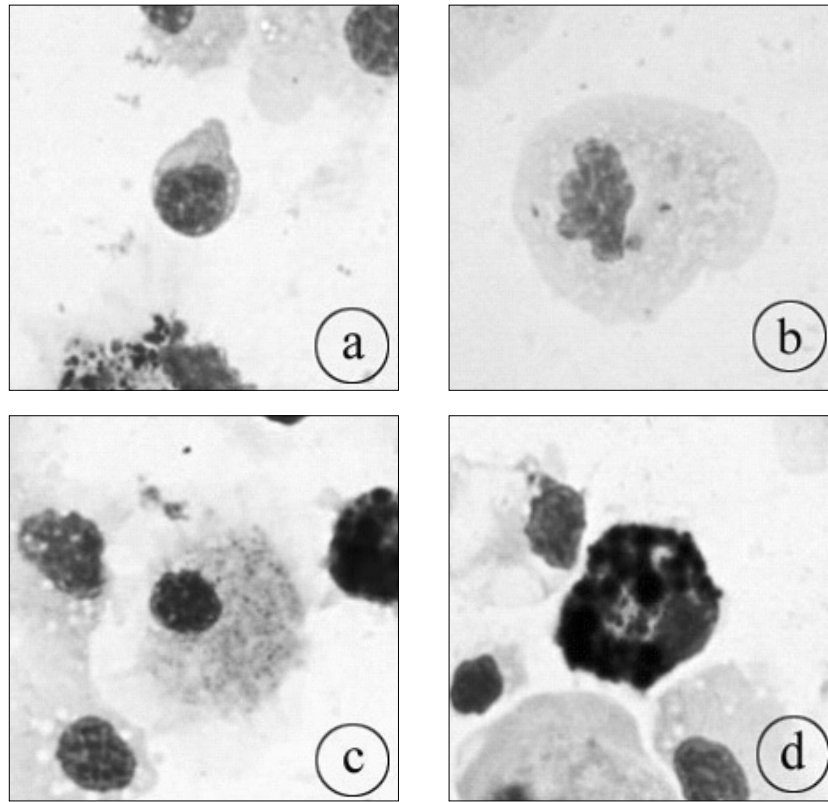


Fig. 1. Light micrographs of the haemocytes of *Crassostrea gigas*. May-Grünwald Giemsa stain. Four types of haemocytes are readily distinguished. (a) Small hyalinocytes; (b) Large hyalinocytes; (c) Small granulocytes; (d) Large granulocytes.

**Table 1.** Dimensions of *Crassostrea gigas* haemocytes measured in a cytospin monolayer (mean  $\pm$  SD)

	Hyalinocytes		Granulocytes	
	Small	Large	Small	Large
Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )	8.38 $\pm$ 1.12	16.50 $\pm$ 2.73	17.83 $\pm$ 1.44	15.62 $\pm$ 0.46
Nucleus diameter ( $\mu\text{m}$ )	4.50 $\pm$ 0.66	5.20 $\pm$ 0.59	5.99 $\pm$ 0.34	5.20 $\pm$ 0.64
N/C	0.60 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.05
Granule diameter ( $\mu\text{m}$ )	-	-	0.53 $\pm$ 0.11	1.36 $\pm$ 0.24

haemocytes를 May-Grünwald Giemsa 염색하여 세포의 형태학적 특징과 세포질 과립의 유무에

따라 2 종류의 hyalinocytes와 2 종류의 과립구로 분류할 수 있었다 (Fig. 1). 즉, hyalinocytes는 세

포의 직경이 큰 large hyalinocytes와 작은 small hyalinocytes로 나눌 수 있었으며 (Table 1), 모두 세포질에 과립이 관찰되지 않았다. 이 세포는 위쪽을 거의 내지 않았고, 형태는 둥글거나 난형을 하고 있었으며 핵은 중앙에 위치하였다. 또한 세포질의 내부원형질과 외부원형질의 구분이 되지 않았으며, 세포질은 과립구보다 약한 염기성을 나타내었다. 그리고 N/C는 large hyalinocytes는 작았으나, small hyalinocytes는 크게 나타났다 (Table 1).

과립구는 세포질에 과립이 함유되어 있었으며, 내부원형질과 외부원형질의 경계가 비교적 확실하였으며, 세포와 핵의 형태는 다형성이며

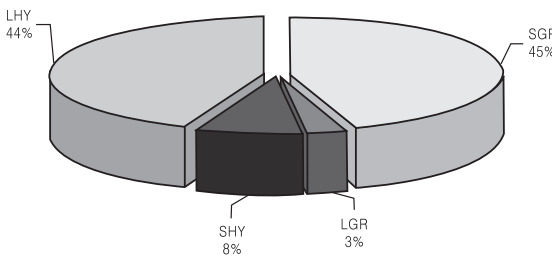


Fig. 2. Circulating haemocytes population proportions in Oyster, *Crassostrea gigas*. LHY = large hyalinocytes; SHY = small hyalinocytes; SGR = small granulocytes; LGR = large granulocytes. LHY and SGR constitute the main types of haemocytes.

핵은 대부분 세포의 바깥쪽으로 치우쳐 있었다. 과립구는 과립의 크기와 염색성에 따라 소과립구와 대과립구로 나눌 수 있었다. 소과립구는 세포질 내 과립의 직경이 작으며, 대과립구는 세포질 내 과립이 소과립구에 비하여 직경이 컸다. 또한, 소과립구의 과립은 호염기성이 강한 과립과 약한 과립 및 때때로 호산성의 작은 과립도 함께 관찰되었으나, 대과립구에서는 강한 호염기성의 과립 및 호산성의 큰 과립이 관찰되었다 (Fig. 1).

참굴의 haemolymph에서 각 haemocytes가 차지하는 비율을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 과립구와 hyalinocytes가 각각 48%, 52%씩 차지하고 있었으며, 그 중 소과립구는 45%, 대과립구는 3%, small hyalinocytes는 8%, large hyalinocytes는 44%를 차지하였다.

Haemocytes 표본에 여러 가지 효소 염색 결과, 대부분의 효소와 지방 염색에서 과립구가 hyalinocytes에 비하여 높은 활성을 나타내었다 (Table 2, Fig. 3).

Alkaline phosphatase 염색 결과, 대부분의 과립구와 일부 small hyalinocytes에서 자색으로 염색되어 양성반응을 보였으며, acid phosphatase,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase와  $\beta$ -glucuronidase도 비슷한 경향을 나타내었다. Peroxidase 염색 결과,

Table 2. Cytochemistry characteristics of *Crassostrea gigas* haemocytes in cytopsin monolayer

	Granulocytes (%)		Hyalinocytes (%)	
	Small	Large	Small	Large
Alkaline phosphatase	89.9	95.6	20.5	9.4
Acid phosphatase	93.5	86.1	22.1	19.4
Peroxidase	30.4	37.6	10.6	6.3
$\alpha$ -naphthyl acetate esterase	83.9	78.5	54.3	40.5
$\beta$ -glucuronidase	54.2	46.5	36.7	23.1
Sudan black B	44.4	30.5	6.7	10.5
Oil red O	43.9	16.3	10.4	9.7
PAS reaction	83	76.5	55.4	25.4

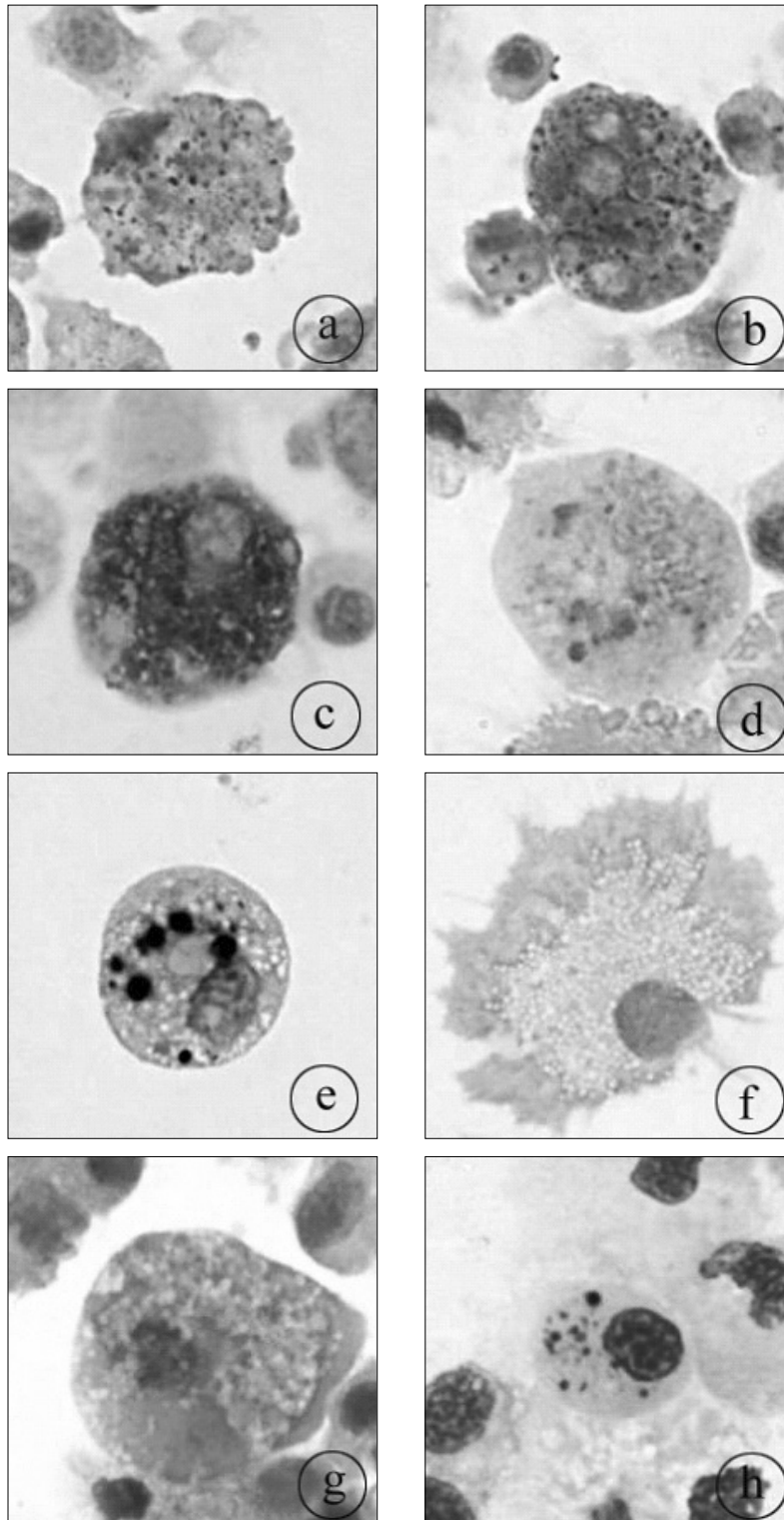


Fig. 3. Light micrograph of cytochemistry characteristics of *Crassostrea gigas* haemocytes in cytospinmonolayer. (a) alkaline phosphatase activity; (b) acid phosphatase activity; (c)  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity; (d)  $\beta$ -glucuronidase activity; (e) peroxidase activity; (f) PAS reaction; (g) oil red O; (h) sudan black B.

과립구가 hyalinocytes에 비하여 활성이 높게 나타났으나, 다른 효소에 비하여 다소 낮게 나타났다. 그러나, 바지락의 haemocytes는 alkaline phosphatase에 대해서 과립구와 hyalinocytes 모두 양성 반응을 나타내어 참굴과 같은 결과를 나타내었으나, acid phosphatase에 대해서는 과립구와 hyalinocytes 모두 음성 반응,  $\beta$ glucuronidase에 대해서는 과립구만 양성 반응을 나타내어 참굴의 haemocytes와 다른 반응을 나타내었다 (Cima *et al.*, 2000).

일부 연구지들에 의해 haemocytes의 효소 활성이 haemocytes 분류에 이용되어 왔으나 (Moore and Lowe, 1977; Bayne *et al.*, 1979; Pipe, 1990), Maria 등 (1997)은 *Mytilus galloprovin-*

*cialis* haemocytes 연구 결과, hyalinocytes와 과립구의 효소 반응이 동일하게 나타나 효소 활성으로 haemocytes를 분류하는 것은 불가능할 것이라고 하였다.

Haemocytes의 지방을 염색하기 위하여 sudan black B와 oil red O로 염색한 결과, 소과립구에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 hyalinocytes에서 낮은 활성을 나타내었다.

Haemocytes 중의 탄수화물 양을 측정하기 위하여 Schiff's 시약과 반응한 후 PAS 염색을 하였다. Large hyalinocytes에서는 전체적으로 음성반응을 나타내었지만 과립구에서는 양성을 나타내는 비율이 높게 나타났다.

투과전자현미경 관찰 결과 (Fig. 4), 소과립구

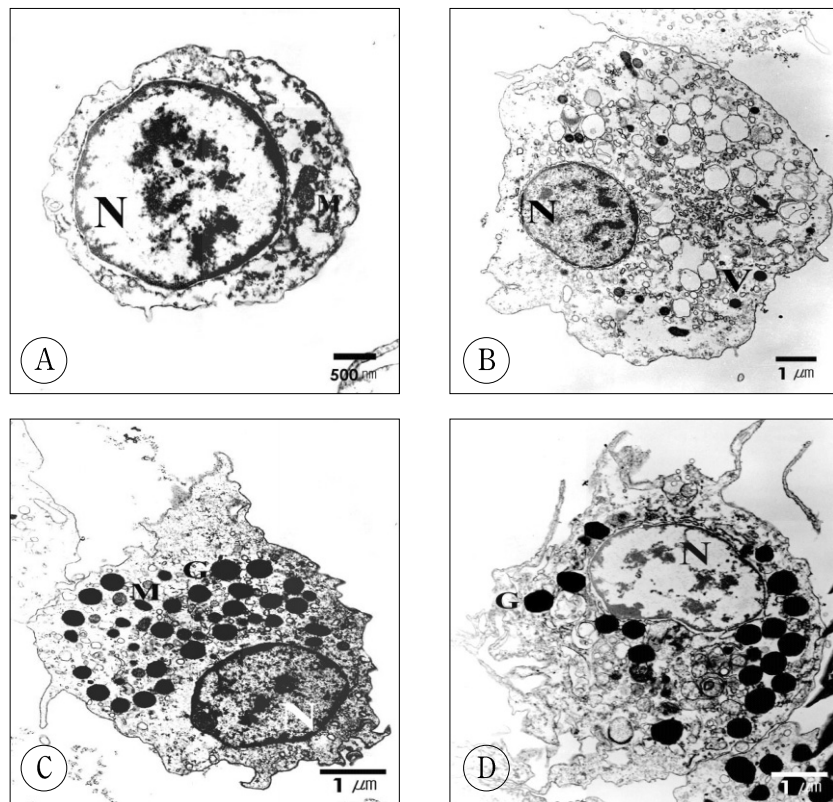


Fig. 4. Transmission electron micrograph of oyster, *Crassostrea gigas* haemocytes.

A, Small hyalinocytes; The nucleus to cytoplasm ratio is larger than large hyalinocytes (B). B, Large hyalinocytes; The nucleus to cytoplasm ratio is smaller than small hyalinocytes (A). It has many vacuoles (V) and many mitochondria (M). C, Small granulocytes; It has many small granule and abundant mitochondria (M) in the cytoplasm. D, Large granulocytes; It has many large granules (G).

에서 많은 미토콘드리아와 전자밀도가 높은 작은 (약 0.5  $\mu\text{m}$ ) 과립을 포함하고 있었으며, Large granulocytes는 전자밀도가 높은 core가 있는 큰 과립 (약 1.30  $\mu\text{m}$ )을 포함하고 있었다.

식작용을 조사한 결과 (Fig. 5), 식균율과 식균 지수는 반응 15분 쯤부터 증가하여 2시간 쯤까지 활성이 지속되었으며, 이후 서서히 감소하는 경향을 나타내었다.

식작용 동안 면역 기능에 관여하는 비특이적

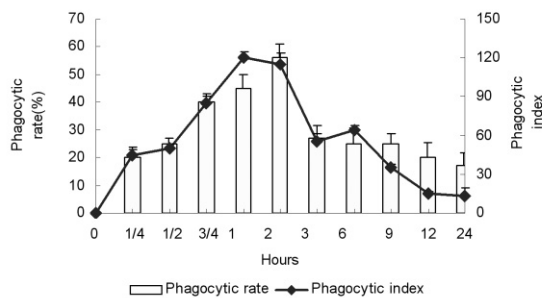


Fig. 5. Time course of phagocytic rate and phagocytic index in haemocytes of oyster, *Crassostrea gigas* after incubating with *Vibrio* FKC or PBS.

효소인 alkaline phosphatase, acid phosphatase,  $\beta$  glucuronidase와  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase 활성을 조사하여 양성 반응을 보이는 haemocytes 비율을 나타내었다 (Fig. 6). 그 결과 *Vibrio* FKC와 반응한 구에서는 양성 반응을 나타내는 haemocytes가 반응 15분째부터 높아져 2시간째까지 증가한 후 감소하여 식균율과 식균지수에서의 활성과 같은 경향을 나타내었다. Maria 등 (1997)은 *Mytilus galloprovincialis* haemocytes의 효소 활성이 과립구보다 hyalinocytes에서 다소 약하다고 하여 본 연구와 유사한 것으로 생각된다. 그러나 참굴 haemocytes의 효소 활성은 항원과 반응하는 시간대에 따라서 효소활성능이 차이를 보이므로 효소 활성만으로 haemocytes를 분류하는 것으로 어려울 것으로 판단된다. 본 연구와 유사하게 여러 연구지들에 의하여 다양한 종에서  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase,  $\beta$ -glucuronidase, acid phosphatase와 같은 lysosomal enzyme이 haemocytes의 활성이 항원과 반응 중에 관찰되었다 (Beckmann *et al.*, 1994; Birmingham and

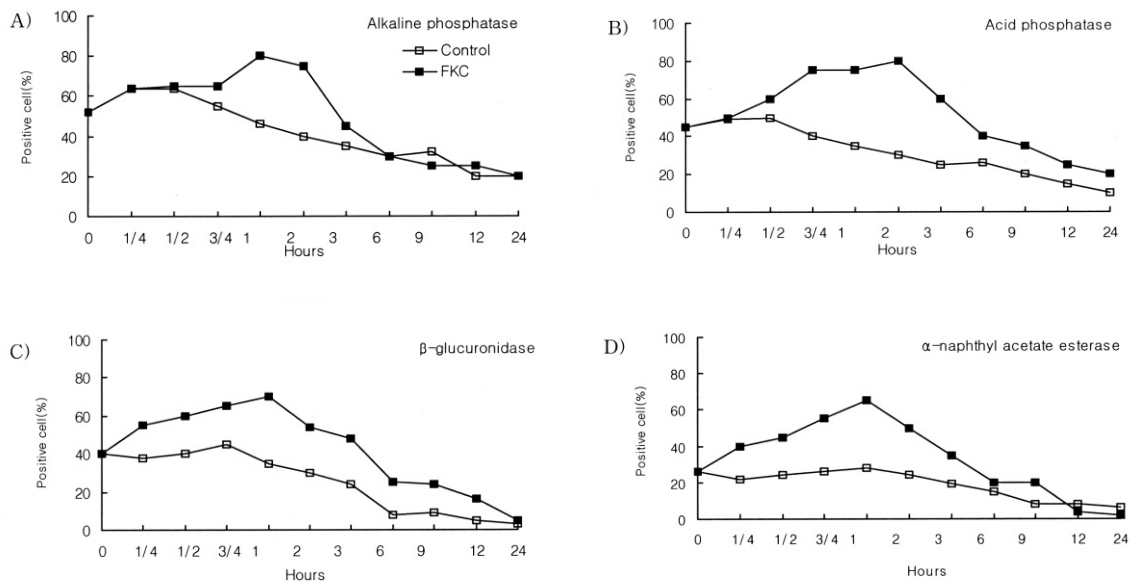


Fig. 6. Time course of alkaline phosphatase (A), acid phosphatase (B),  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase (C) and  $\beta$ -glucuronidase (D) activity in haemocytes of oyster, *Crassostrea gigas* after incubating with *Vibrio* FKC or PBS.

Jeska, 1981; Lentzen *et al.*, 1984; Moore and Gelder, 1983). 특히  $\beta$ -glucuronidase는 세균과 기생충의 acid mucopolysaccharides를 가수분해하는 것으로 (Cheng, 1976), 본 연구에서도 참굴 haemocytes가 *Vibrio* FKC를 식작용하는 과정 중에 효소 활성이 높아진 것으로 생각된다. 또한, haemocytes의 효소 활성이 반응 2시간째까지 증가된 후 감소하여, Sung and Ryan (1999)이 *Penaeus monodon*과 *Macrobrachium rosenbergii*에 *Vibrio* FKC를 주사하였을 때 acid phosphatase,  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase,  $\beta$ -glucuronidase의 활성이 주사 후 100분까지 증가 후 감소한다는 것과 유사한 결과를 나타내었다. 본 실험과는 대상 생물의 종이 다르지만 같은 무척추동물에 속하여 유사한 효소활성을 나타낸 것으로 사료되며 이후 인위감염 후 *in vivo*에서의 효소활성의 변화에 대한 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

## 요 약

패류의 방어시스템에서 순환 haemocytes는 중요하다. 참굴, *Crassostrea gigas* haemocytes의 형태적 특징을 이해하기 위해서 광학현미경적 특징과 전자현미경적 특징을 관찰하였다. 그 결과 4종류의 haemocytes type을 확인하였다: type I small hyalinocytes, type II large hyalinocytes, type III large granulocytes, type IV small granulocytes. 또한, 면역세포학적 방법으로 haemocytes의 alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP), peroxidase (POD),  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase,  $\beta$ -glucuronidase, PAS, sudan black B와 oil red O의 활성을 조사하였다. 그 결과, 조사한 모든 효소의 활성이 granulocytes에서 hyalinocytes에 비하여 높게 나타났다.

Haemocytes와 *Vibrio* FKC를 incubation 후 식균지수와 식균율을 조사하였다. 그 결과, 식균지수와 식균율은 배양 15분째부터 증가하여 120분까지 높게 나타났다. 또한, ALP, ACP,  $\alpha$ -naph-

thyl acetate esterase와  $\beta$ -glucuronidase의 효소활성도 대조구에 비하여 높게 나타나 이와 같은 효소는 참굴의 식작용에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 국립수산과학원 (양식생물질병 모니터링 및 역학연구, RP-2006-AQ-022)의 지원에 의해 운영되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Bachère, E., Chagot, D. and Grizel, H.: Separation of *Crassostrea gigas* haemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 549-559, 1998.
- Bayne, C. J., Moore, M. N., Carefoot, T. H. and Thompson, R. J.: Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: The cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. *J. Inverte. Pathol.*, 34: 1-20, 1979.
- Beckmann, M., Kolb, H. A. and Lang, F.: Atomic force microscopy of peritoneal macrophages after particle phagocytosis. *J. Membrane Biol.*, 140: 197-204, 1994.
- Birmingham, J. R. and Jeska, E. L.: *In vitro* interaction of bovine mononuclear phagocytes and lipopolysaccharide from *Brucella abortus*. *AFR J. Clinical Experimental Immunol.*, 2: 233-241, 1981.
- Cheng, T. C.: Beta-glucuronidase in the serum and hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Pelecypoda). *J. Inverte. Pathol.* 27: 125-128, 1976.
- Cheng, T. C.: Bivalves. In "Invertebrate Blood Cells. Academic Press, London. 231-300,



- 1981.
- Cheng, T. C., Huang, J. W., Karadogan, H., Renwartz, L. R. and Yoshino, T. P.: Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebrate Pathol.*, 36: 35-40, 1980.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M. G. and Ballarin L.: Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morpho-functional characterisation, 10: 677-693, 2000.
- Hine, P. M.: The inter-relationships of bivalve haemocytes. *Fish & Shellfish Immunol.*, 9: 367-385, 1999.
- Lentzen, H., Agrawal, B., Noske, W. and Herken, H.: Isolation and characterization of internalized glioma cell membranes. *Cell and Tissue Res.* 236: 147-151, 1984.
- Maria J. C., Carmen L., Carlos A. and Antonio V.: Enzyme involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J. Inverte. Pathol.*, 70: 96-105, 1997.
- Moore, C. A. and Gelder, S. R.: The role of the "blunt" granules in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* following phagocytosis. *J. Invertebrate Pathol.*, 41: 369-377, 1983.
- Moore, M. N. and Lowe, D. M.: The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected particles. *J. Invert. Pathol.*, 29: 18-30, 1977.
- Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C. and Auffre, M.: Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquat. Living Resour.*, 9: 137-143, 1996.
- Pipe, R. K.: Hydrolytic enzymes associated with the granular hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *J. Histochem.* 22: 595-603, 1990.
- Sung, H.-H. and Ryan, S.: Intrahaemocytic activity of lysosomal enzyme in *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunol.* 9: 505-508, 1999.
- Sung, Y. F.: Cellular defense mechanisms of oyster and mussels. *American Fisheries Society Special Pub.*, 18: 153-168, 1988.
- Xing, J., Zhan, W.-B. and Zhou, L.: Endoenzymes associated with haemocytes types in the scallop (*Chalmys farrei*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 13: 271-278, 2002.
- Yoshino, T. P. and Granath W. O.: Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane marker. *Cell and Tissue Research*, 232: 553-564, 1983.

---

Manuscript Received : July 28, 2006

Revision Accepted : December 8, 2006

Responsible Editorial Member : Tae-Sung Jung  
(Gyeongsang Univ.)