

# 탈피에 따른 산왕거미 (*Araneus ventricosus*) 과립혈구의 미세구조 변화

문 명 진\*

단국대학교 첨단과학대학 생명과학과

## Molt-related Changes in the Granulocytes of the Spider *Araneus ventricosus* (Araneae: Arachnida)

Myung-Jin Moon\*

Department of Biological Sciences & Institute of Basic Science,  
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea  
(Received March 31, 2008; Accepted June 18, 2008)

### ABSTRACT

The fine structural modification of the granulocytes between the molt and intermolt period were investigated by the transmission electron microscopy. The granular hemocytes of the spider *Araneus ventricosus* were composed of three subtypes: eosinophilic granulocytes (EGs), basophilic granulocytes (BGs) and cyanocytes. Both of the EGs and BGs have electron dense granules within their cytoplasm, however the granules of BGs are larger than those of EGs. During the molt period, some of the EGs have fine structural modification in their cell organelles including formation of phagosomes as a result of active phagocytosis. However, the BGs have no phagosomes, but electron densities of the granules are changed to lower states than the intermolt period. The cyanocyte is the biggest hemocyte among the granulocytes. They contain numerous hemocyanin crystals in the cytoplasm with some electron-lucent vacuoles. During the molt period, some of the cyanocytes are changed to irregular shapes. High magnification electron micrographs reveal that the lattice sub-structure of the hemocyanin crystals are very similar to those of microtubules, and each tubule is composed of approximately 20 filaments with fine fibrillar structure.

**Keywords** : *Araneus ventricosus*, Granulocyte, Molt, Spider

### 서 론

절지동물의 혈구는 보통 세포의 크기나 형태 (Rosenberger & Jones, 1960; Ravindranath, 1977), 세포질의 조직화학적 특성 (Ashurst, 1982; Chain & Anderson, 1982; Gupta 1986; Hernandez et al., 1999), 그리고 세포의 미세구조적 특성 (Za-

chary & Hoffmann, 1973; Ratcliffe & Price, 1974; Arnold, 1982) 등에 따라 구분되는데, 일반적으로 과립을 함유한 과립혈구와 과립들을 가지지 않는 무과립혈구로 대별된다.

거미류의 혈구는 Deevey (1941), Browning (1942) 등에 의해 투명혈구 (hyaline leucocytes), 과립혈구 (granular hemocytes), 탈피혈구 (molting hemocytes or leberidocytes) 등의 세 가지 유형으로 구분된 바 있으며, Sherman (1973)은 타렌톨

\* Correspondence should be addressed to Myung-Jin Moon, Department of Biological Sciences & Institute of Basic Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Ph.: (041) 550-3445, Fax: (041) 550-3409, E-mail: moonmj@dankook.ac.kr

라 거미의 혈구를 대상으로 과립혈구(granulocytes), 편도혈구(oenocytoids), 무정형혈구(plasmacytoids)의 세 가지 유형으로 구분하고, 무정형혈구로부터 과립혈구와 편도혈구가 분화됨을 보고한 바 있다.

국내에서는 배회성 거미류인 별늑대거미를 대상으로 원시혈구(prohemocytes), 무정형혈구, 과립혈구, 소구혈구(spherulocytes)와 지방혈구(adipohemocytes) 등의 5가지 유형의 혈구가 구분된 바 있으며 (Chang & Yoe, 1995), 최근 정주성 거미류인 산왕거미(*Araneus ventricosus*) 혈구의 유형이 percoll 밀도구배를 이용한 물리화학적 특성과 세포화학적 및 미세구조의 특성에 따라 구분되어 보고된 바 있다(Choi & Moon, 2006).

절지동물의 혈구는 다양한 내적 및 외적 자극에 의해 활성화되어 식세포작용, 피낭형성, 결절형성 등의 세포성 면역 반응을 일으키는데 (Götz & Boman, 1985), 대부분의 경우 무정형혈구나 과립혈구에 의해서 수행되므로 (Rizki & Rizki, 1984; Wago & Kitano, 1985; Han & Gupta, 1988; Chang et al., 1992), 이들 혈구를 통칭하여 면역혈구(immunocyte)라는 용어가 사용되고 있다(Gupta, 1986).

이처럼 과립혈구는 절지동물 체내의 세포성 면역반응에 관여하는 중요한 혈구 종류임에도 불구하고, 거미류의 경우 과립혈구의 종류나 그 미세구조적 특성, 그리고 탈피 등의 성장에 따른 변화 양상에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내에 서식하는 대형의 산왕거미를 실험재료로 하여 탈피에 따른 과립혈구의 미세구조적 변화를 고배율의 전자현미경으로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

충남 천안시 안서동 소재 단국대학교 천안캠퍼스 주변에서 7, 8월 중에 채집한 왕거미과의 산왕거미(*Araneus ventricosus*)를 실험재료로 사용하였다. 채집한 거미들은 양면이 유리된 40×40×10 cm 크기의 목재 사육조에 옮기고 안정화시킨 후, 물과 갈색거저리(*Tenebrio molitor*) 유충을 먹이로 실온에서 사육하였다. 탈피시기에 접어들면 거미줄을 만들지 않는 행동학적 특성과 먹이를 먹지 않는 습성을 토대로 탈피시기에 접어든 개체들을 선별하였으며, 이들을 발생 단계별로 구분하여 실험에 사용하였다.

비탈피시기와 탈피시기의 혈구수 변화를 측정하기 위해 산성화 처리된 거미생리식염용액(2% acetic acid saline)에 동량의 항응고제를 넣어 0.01% gentian violet 용액을 만든 후 백혈구 회색 피펫을 이용하여 혈구계수기(hemocytometer)로 전체 혈구수를 계산하였다. 이 때, 슬라이드 글라스 위에 도말시킨 혈림프를 Wright-Giemsa 염색액으로 염색하여 현미경의 400배 배율에서 시야 안에 들어오는 혈구중

무작위로 최소 200개의 혈구들을 세어 유형별로 판독하였다. 혈구수를 계산하기 위하여 혈구수 측정기를 사용하여 한 칸 내의 혈구수×16(칸의 수)×10(슬라이드글라스와 커버글라스 사이의 깊이, 1/10 mm)×10(회석도)의 계산식으로 1 mm<sup>3</sup> 내 혈구의 총수를 확인하였다.

혈구의 미세구조를 관찰할 목적으로 채취된 혈림프는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, phosphate buffer, pH 7.4)가 들어있는 1.5 mL Eppendorf tube에서 1,500 r.p.m.으로 10분간 원심 분리시켜 혈구만을 모은 후, 1시간 동안 전고정하였다. 고정된 혈구덩어리는 완충용액(4°C 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 10분씩 3회 세척하였으며, 1% OsO<sub>4</sub> (4°C, phosphate buffer)로 1시간 동안 후고정하였다.

고정이 끝난 재료는 동일 완충용액에 2회 세척한 후, ethanol 농도 상승 순으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환하여 Poly/EM Bed-812 embedding medium으로 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven에서 36시간 중합 반응시켰다. 포매된 조직은 LKB-2088형 초박절편기(ultramicrotome)로 준초박절편(semi-thin section)을 제작한 다음, 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이어서 60~80 nm로 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEOL 100 CX II형 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

## 결 과

산왕거미의 과립혈구는 세포질에 함유된 과립의 세포화학적 및 미세구조적 특성에 따라 소형 과립을 가진 산호성 과립혈구(eosinophilic granulocytes)와 대형의 과립을 가진 염기호성 과립혈구(basophilic granulocytes), 그리고 헤모시아닌 결정체를 지니고 있는 혈색소혈구(cyanocytes)로 구분되었다. 거미의 탈피주기에 따른 과립혈구의 밀도 변화를 관찰하기 위해 혈구계수기를 이용하여 혈림프내에 함유된 과립혈구의 개수를 측정한 결과, 혈림프 1 mm<sup>3</sup> 내에 함유된 총혈구 수는 탈피시기의 경우 평균 8,780개로 측정되었고, 비탈피시기의 경우는 평균 8,380개로 측정되어 탈피시의 혈구수가 비탈피시에 비해 약간 증가하는 것으로 관찰되었다.

탈피시의 혈림프에 함유된 산호성 과립혈구는 비탈피시기와 비슷한 수준을 유지하여 탈피에 따른 급격한 변화를 보이지 않았으나, 염기호성 과립혈구는 탈피 직후에 급격히 감소되었다가 서서히 증가하여 탈피 7일 후에는 최고 수준에 도달하는 것으로 관찰되었다. 혈색소세포의 경우는 탈피 기간중 혈림프에 함유된 혈구의 비율이 비탈피시기에 비해 약간 감소하였으나, 그 변화량은 미미한 것으로 관찰되었다.

비탈피시의 산호성 과립혈구는 난형 또는 타원형의 세포로 장축의 평균 지름은 약 10~16  $\mu\text{m}$ 로 관찰되었다. 핵은 혈구의 중앙부에 위치하였고, 타원형의 핵 속에는 핵막을 따라 이질염색질이 발달되어 있었다. 전자밀도가 비교적 높은 산호성 과립혈구의 세포질에는 전자밀도가 극히 높은 구형 또는 다면형의 과립들이 함유되어 있었다. 이들 과립들의 평균 직경은 1.0  $\mu\text{m}$ 로 측정되었고, 전자밀도가 극히 높고 격자구조의 결정체를 지닌 단백질성 과립의 특성을 지니고 있음이 확인되었다. 혈구의 세포질에는 미토콘드리아가 산재되어 있었고, 핵 주변부에서는 조면소포체가 발달되어 있었으며, 전자밀도가 낮은 소형의 미분화 과립과 연결된 형태도 흔히 관찰되었다. 또한 세포질에는 혈구의 식작용(phagocytosis)에 의한 다양한 크기의 식포(phagosome)도 형성되어 있었다(Fig. 1A, B).

탈피시의 산호성 과립혈구들은 비탈피시기와 비교하여 급격한 밀도 변화를 보이지 않았지만, 탈피시기를 전후하여 다양한 형태적 변화를 나타내었다. 일부의 산호성 과립혈구들은 자기용해(autolysis)의 과정을 거치는 것으로 관찰되었는데, 이 과정에 있는 혈구들은 핵막이 부풀어 오르고, 핵의 이질염색질이 핵의 전역에 걸쳐 나타나며, 세포질에는 전자밀도가 높은 과립과 대형의 식포들을 제외한 대부분의 구성요소가 사라져, 세포질의 전자밀도가 낮게 관찰되었다(Fig. 1C, D).

또한, 대형의 식포를 함유한 산호성 과립혈구의 세포질에서는 전자밀도가 높은 구형과립의 일부가 용해되는 현상이 흔히 관찰되었는데, 대부분의 경우 핵막이 부풀어 올라 핵이 유리된 상태로 나타나며, 구형으로 응축된 핵 속에서는 핵막 주변부의 이질염색질이 확장된 형태로 관찰되었다. 특히, 혈구의 세포질에는 잘 발달된 골지복합체가 밀집되어 관찰되며, 전자밀도가 낮은 소형의 일차 리소솜(lysosome) 및 식포와 융합된 이차 리소솜도 풍부하게 함유되어 있음이 확인되었다(Fig. 1E, F).

염기호성 과립혈구는 긴 타원형 또는 방추형의 세포로 장축의 길이가 최고 20  $\mu\text{m}$ 에 달하며, 불규칙한 타원형의 핵은 세포의 중앙부에 위치하고 있었으며 이질염색질이 발달되어 있었다. 세포질에는 대형의 구형과립들이 함유되어 있는데, 세포질에 함유된 과립의 크기가 산호성 과립혈구에 비해 대형인 1.0~1.5  $\mu\text{m}$ 이며, 과립 가장자리 쪽의 전자밀도가 중심부에 비해 현저히 높은 미세구조적 특성을 지니고 있었다(Fig. 2A, B).

비탈피시의 염기호성 과립혈구 핵 주변부에서는 조면소포체가 발달되어 있었고, 세포질 전역에 걸쳐 미토콘드리아와 유리 리보솜(free ribosome)이 산재되어 있었다. 과립의 전자밀도는 높은 편이며 과립의 내부에 이질적인 미세구조를 가진 대형과립들도 함유되어 있음이 관찰되었다(Fig. 2C, D).

탈피시의 염기호성 과립혈구는 탈피 직후에 급격히 감소되었다가 서서히 증가하는 특징을 보이는데, 특히 탈피시기를 전후하여 과립의 전자밀도가 현저히 낮아지는 것으로 관찰되었다(Fig. 2F). 탈피시기를 전후하여 일부의 혈구들이 자기용해과정을 거치는 산호성 과립혈구들과는 달리, 염기호성 과립혈구들은 전 시기에 걸쳐 비교적 안정된 세포의 모습과 미세구조적 특성을 유지하는 것으로 관찰되었다(Fig. 2E, F).

또한 탈피 및 비탈피시기 모두의 혈구에서 식포가 관찰되지 않아, 염기호성 과립혈구가 식세포작용과 무관한 혈구종류임이 확인되었다. 오히려 탈피시기의 염기호성 과립혈구의 세포질에서는 새로운 과립의 형성과 관련된 세포소기관들의 분포가 확인되었는데, 핵 주변부에서는 물질생성이 활발한 골지복합체들이 다수 출현하였다. 골지복합체의 형성면을 따라 소형의 분비소포들이 형성되어 있었고, 분비소포의 융합에 의해 전자밀도가 높은 분비과립이 형성되는 과정이 이들 혈구에서 확인되었다(Fig. 2G, H).

비탈피시기의 혈색소혈구는 난형으로 장축과 단축의 직경이 각각 20, 12  $\mu\text{m}$ 에 달하는 대형의 혈구로 산왕거미의 과립혈구중 가장 대형의 혈구임이 확인되었다. 중앙부의 핵을 중심으로 전자밀도가 높은 헤모시아닌 과립들이 동심원상으로 밀집된 특성을 지니고 있었으며, 전자밀도가 낮은 구형의 소포들이 일부 함유되어 있음이 관찰되었다. 세포질의 전자밀도는 과립혈구중 가장 높게 관찰되었고, 세포질 전역에 걸쳐 결정체상의 과립과 유리 리보솜이 산재되어 있을 뿐, 다른 세포소기관의 발달은 극히 미약하였다(Fig. 3A, B).

탈피시기의 혈색소세포는 원형질막의 함입이 심한 다면형의 세포로 관찰되는 경우가 많으며, 혈림프에 함유된 혈구의 비율이 비탈피시기에 비해 약간 감소하는 경향을 보였다. 혈구의 중심에 위치한 핵도 요철이 심한 불규칙한 구조로, 이질염색질이 과립상으로 응축되어 있었다. 세포질에 함유된 과립들도 비탈피시기의 것에 비해 크고 신장된 형태로 관찰되었다(Fig. 3C, D).

혈색소혈구의 세포질에 함유된 헤모시아닌 결정체 과립들은 한계막이 없는 결정체 구조를 가지고 있었으며, 고배율의 투과전자현미경 상에서 격자 구조를 가진 전형적인 단백질 결정체의 구조임이 확인되었다. 다양한 크기의 소포들과 다량의 헤모시아닌 결정체들이 다발을 이루고 있음이 확인해 헤모시아닌 결정체의 다발로 이루어진 과립들은 종단면에서 명대와 암대가 교대로 배열된 격자구조로 관찰되었으나, 횡단 단면에서는 외부직경이 약 20 nm에 달하는 관상의 구조로 미세소관(microtubule)과 유사한 구조임이 관찰되었고, 각각의 관상구조 또한 20여 가닥의 극히 미세한 필라멘트들이 조합되어 이루어진 구조임을 확인할 수 있었다(Fig. 3E, F).

## 고 찰

거미의 혈구에 대한 연구는 많은 연구자들에 의해 수행되어 왔다. Sherman (1973)이 거미의 혈림프에서 과립혈구, 편도혈구, 무정형혈구 등의 혈구를 관찰하고, 혈구의 분화가 무정형혈구에서 과립혈구와 편도혈구로 진행됨을 보고한 이후, Chase (1994)는 정주성 거미류인 *Araneus cavaticus*를 실험재료로 탈피에 따른 혈림프내 단백질의 변화를 관찰하는 일련의 실험과정에서 광학현미경 하에서 관찰된 혈구의 종류를 투명혈구(hyaline leukocyte), 과립혈구(granulocyte), 탈피혈구(molting hemocyte)의 세 가지 유형으로 구분하였다.

최근 Choi & Moon (2006)은 세포화학적 및 percoll 밀도 구배를 이용한 물리화학적 특성과 전자현미경을 이용한 미세구조의 특성에 따라 산왕거미(*Araneus ventricosus*) 혈구의 유형을 과립혈구와 무과립혈구로 구분하고, 함유된 과립의 특성에 따라 다시 산호성 과립혈구(eosinophilic granulocytes)와 염기호성 과립혈구(basophilic granulocytes), 그리고 혈색소혈구(cyanocytes)로 구분하였고, 무과립혈구는 투명혈구(hyaline leucocytes)와 편도혈구(oenocytoids), 그리고 탈피시기에만 출현하는 탈피혈구(molting hemocytes)로 구분하여 보고한 바 있다.

투과전자현미경으로 산왕거미의 과립혈구를 관찰한 결과, 함유된 과립의 미세구조적 특성에 따라 3가지 유형으로 구분할 수 있었는데, 독특한 결정체 과립을 함유한 혈색소혈구를 제외한 2종류의 과립혈구들도 과립의 크기와 전자밀도의 차이에 따라 확연히 구분되었으며, 그 결과는 세포화학적 염색방법에 의해 과립혈구를 구분한 Choi & Moon (2006)의 결과와도 잘 일치하는 것으로 확인되었다.

산왕거미의 산호성 과립혈구와 염기호성 과립혈구는 모두 전자밀도가 높은 구형의 과립들을 함유하고 있음이 확인되는데, Hagopian (1971)은 바퀴벌레의 혈구에서 흑색소 과립(melanosome)과 비슷한 구조를 가진 과립들이 혈구들에 의한 피낭 형성시에 흑색소화 반응(melanization)을 일으키는 것으로 보고한 바 있으며, Shoura (1986)도 진드기(*Argas arboreus*) 혈구에서 전자밀도가 높은 과립에 대해 비슷한 의견을 제시한 바 있다.

탈피시기에 일부의 산호성 과립혈구들은 리소좀에 의한 자기용해 과정을 거치는 것으로 관찰되었고, 식포가 형성된 세포질에는 골지복합체와 일차 및 이차 리소좀들이 발달되어 있음이 확인되었다. 일반적으로 혈구의 세포질에는 공통적으로 유리 리보솜과 미토콘드리아, 조면소포체 등의 세포소기관이 잘 발달되어 있음이 보고된 바 있으며(Beeman et al., 1983; Han & Gupta, 1988), Brehelin et al. (1978)은 초파리 등의 곤충에서 혈구에 함유된 리소좀과 식포들을 보고

한 바 있다. 또한, Gupta (1986)는 조면소포체와 골지체, 그리고 풍부한 리소좀 등이 혈구세포의 특성임을 밝힌 바 있다. 본 실험에서 산호성 과립혈구의 세포질에 함유된 리소좀과 다수의 식포들은 활발한 식세포작용의 결과로 추정되며, 이는 거미의 산호성 과립혈구가 식세포작용을 하는 면역혈구의 한 종류임을 시사하는 것으로 판단된다(Yakoo et al., 1995; Tojo et al., 2000; Lowenberger, 2001).

한편, 대형의 식포를 함유한 산호성 과립혈구의 세포질에서는 전자밀도가 높은 구형과립의 일부가 용해되는 현상이 일부 관찰되었는데, Schmit et al. (1977)은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 결절(nodule) 형성과정 중에 초래되는 과립의 신속한 분해현상이 polyphenol oxidase의 방출과 관련된 것임을 보고한 바 있고, Chang et al. (1992)은 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii*) 과립혈구의 과립이 분해되면서 면역작용을 일으킨다는 보고 등으로 미루어, 과립의 용해현상은 과립혈구의 일반적인 생리기전으로 해석되나, 보다 정교한 기능적 측면에 대해서는 체내 이물질 처리와 관련된 심도 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

염기호성 과립혈구는 가장자리 쪽의 전자밀도가 높은 대형의 과립을 함유한 긴 타원형의 혈구로 탈피 및 비탈피시기의 혈구에서 식포가 관찰되지 않아, 식세포작용과 무관한 혈구 종류로 추정되었다. Browning (1942)도 탈피시 새로운 외골격이 형성되는 동안, 하피(hypodermis)에서 과립혈구들이 나타나고, 함유된 과립의 특성이 산성에서 염기성으로 변하는 현상을 보고한 바 있고, Pech & Strand (1996, 2000)도 과립혈구의 과립들이 분비되어 encapsulation과 같은 혈구의 면역반응이 나타남을 보고한 바 있다. 따라서 탈피 직후에 급격히 감소되었다가 서서히 증가하는 특징과 탈피시 그동안 과립의 전자밀도가 낮아지는 점 등으로 미루어, 산왕거미 염기호성 과립혈구들이 탈피시 새로운 큐티클 생성 과정에 상당부분 관여할 것으로 추정되나, 이에 대해서는 보다 면밀한 검토가 필요하다.

산왕거미의 혈색소혈구는 과립혈구중 가장 대형의 혈구로 고배율의 투과전자현미경 상에서 한계막이 없는 격자구조를 지닌 단백질 결정체 구조임이 확인되었는데, 일찍이 투구계 종류에서 푸른색의 혈색소 단백질인 헤모시아닌을 함유한 혈구가 Fahrenbach (1970)에 의해 보고된 이후, 곤충의 편도혈구에 헤모시아닌 결정체가 함유되어 있음이 보고된 바 있다(Paul, 1990). 혈색소혈구의 결정체는 고배율의 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 횡단 단면에서 20여 가닥의 극히 미세한 섬유구조가 조합되어, 미세소관과 유사한 관상의 구조를 가지고 있음이 확인되었다. Neuwirth (1973)은 꿀벌부채명나방의 과립혈구에서 관찰되는 직경 0.2 μm 크기의 과립들이 산성의 점액물질로 구성되어 있고, 미세소관과 비슷한 구조로 채워져 있음을 보고한 바 있지만, Gupta (1986)는 곤충의 혈색소혈구를 무과립혈구의 일종인

편도혈구의 발달된 형태로 추정할 바 있기 때문에, 혈색소 혈구와 편도혈구의 유연관계에 대한 해석은 좀 더 면밀한 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Arnold JW: Larval hemocytes in Noctuidae (Insecta: Lepidoptera). *Inter J Insect Morphol Embryol* 11 : 173-188, 1982.
- Ashhurst DE: Histochemical properties of the spherulocytes of *Galleria Mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Inter J Insect Morphol Embryol* 101 : 285-292, 1982.
- Beeman SC, Wilson ME, Bulla LA, Consigli RA: Structural characterization of the hemocytes of *Plodia interpunctella*. *J Morphol* 179 : 1-16, 1983.
- Brehelin M, Zachary D, Hoffmann JA: A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tiss Res* 195 : 45-57, 1978.
- Browning HC: The integument and moult cycle of *Tegenaria atrica* (Araneae). *Proc Roy Soc London B* 131 : 65-86, 1942.
- Chain BM, Anderson RS: Observations on the cytochemistry of the hemocytes of an insect, *Galleria mellonella*. *J Histochem Cytochem* 31 : 601-607, 1982.
- Chang BS, Yoe SM: Electron microscopic study on the hemocytes of the wolf spider, *Pardosa astrigera*. *Korean J Electron Microscopy* 25 : 29-38, 1995.
- Chang BS, Yoe SM, Kim WK, Moon MJ: Electron microscopic study on the hemocytic immune responses to the foreign substances in insects. (I) Response to gold particles. *Korean J Zool* 35 : 58-69, 1992.
- Chase SF: Characterization of the hemolymph of the spider *Araneus cavaticus*: hemocytes and proteins. Thesis in Univ. of New Hampshire, 1994.
- Choi JY, Moon MJ: The fine structure of spider (*Araneus ventricosus*) hemocytes. *Korean J Electron Microscopy* 36 : 259-269, 2006.
- Deevey GB: The blood cells of the Haitian tarantula and their relation to the moulting cycle. *J Morphol* 68 : 457-451, 1941.
- Fahrenbach WH: The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J Cell Biol* 44 : 445-453, 1970.
- Götz P, Boman HG: Insect immunity. In: Kerkut GA, Gilbert LI, eds, *Comprehensive Insect Phylogeny, Biochemistry and Pharmacology*, pp. 453-485, Pergamon Press, New York, 1985.
- Gupta AP: Arthropod immunocytes, In: Gupta AP, ed, *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*, pp. 3-61, John Wiley & Sons, New Jersey, 1986.
- Hagopian M: Unique structures in the insect granular hemocytes. *J Ultrastruct Res* 36 : 646-658, 1971.
- Han SS, Gupta AP: Arthropod immune system. V. Activated immunocytes (granulocytes) of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae) show increased number of microtubules and nuclear pores during immune reaction to foreign tissue. *Cell Struct Funct* 13 : 333-343, 1988.
- Hernandez S, Lanz H, Rodriguez MH, Torres JA, Martinez PA, Tsutsumi V: Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J Med Entomol* 36 : 426-434, 1999.
- Lowenberger C: Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 31 : 219-229, 2001.
- Neuwirth M: The structure of the hemocytes of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J Morphol* 139 : 105-124, 1973.
- Paul RJ: La respiration des arachnides. *La Recherche* 226 : 1338-1357, 1990.
- Pech LL, Strand MR: Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* 109 : 2053-2060, 1996.
- Pech LL, Strand MR: Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J Insect Physiol* 46 : 1565-1573, 2000.
- Ratcliffe NA, Price CD: Correlation of light and electron microscopic hemocyte structure in the Dictyoptera. *J Morphol* 144 : 485-498, 1974.
- Ravindranath MH: A comparative study of the morphology and behaviour of granular haemocytes of arthropods. *Cytologia* 42 : 743-751, 1977.
- Rizki TM, Rizki RM: The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In: King RC, Akai H, eds, *Insect Ultrastructure*, pp. 579-604, Plenum Press, New York, 1984.
- Rosenberger CR, Jones JC: Studies on total blood cell counts of the southern armyworm larva, *Prodenia eridania* (Lepidoptera). *Ann Entomol Soc Amer* 53 : 351-355, 1960.
- Schmit AR, Rowley AF, Ratcliffe NA: The role of *Galleria mellonella* hemocytes in melanin formation. *J Invert Pathol* 29 : 232-234, 1977.
- Sherman RG: Ultrastructurally different hemocytes in a spider. *Can J Zool* 51 : 1155-1165, 1973.
- Shoura SM: Fine structure of the hemocytes and neprococytes of *Argas (Persicargas) arboreus* (Ixodoidea: Argasidae). *J Morphol* 189 : 17-24, 1986.
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S: Involvement of both granular cells and plasmacytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 46 : 1129-1135, 2000.
- Wago H, Kitano H: Morphological and functional characterization of the larval hemocytes of the cabbage white butterfly, *Pieris rapae crucivora*. *Appl Ent Zool* 20 : 1-7, 1985.
- Yokoo S, Goetz P, Tojo S: Phagocytic activities of haemocytes separated by two simple methods from larvae of two lepidopteran species, *Agrotis segetum* and *Galleria mellonella*. *Appl Entomol Zool* 30 : 343-350, 1995.
- Zachary D, Hoffmann JA: The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* (Meig.) (Diptera). *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 141 : 55-73, 1973.

### < 국문초록 >

탈피에 따른 거미 과립혈구의 미세구조 변화를 고배율의 투과 전자현미경으로 관찰하였다. 산왕거미 (*Araneus ventricosus*)의 과립혈구는 산호성 과립혈구(EGs)와 염기호성 과립혈구(BGs), 그리고 혈색소혈구(cyanocytes) 등 세 종류가 구분되었다. EGs와 BGs는 공통적으로 전자밀도가 높은 구형 과립을 함유하고 있었지만, 과립의 크기와 미세구조의 차이에 따라 두 종류가 확연히 구분되었다. 과립의 크기가 작은 EGs는 탈피기간중 세포소기관 등의 다양한 형태적 변화가 나타나며, 왕성한 식작용을 통해 많은

식포를 형성하는 것으로 관찰되었다. 반면, 과립의 크기가 큰 BGs의 세포질에서는 식포가 관찰되지 않았으나, 탈피시기 동안 과립의 전자밀도가 낮아지는 특성이 관찰되었다. 가장 대형의 과립혈구인 혈색소세포의 세포질에는 많은 헤모시아닌 결정체가 동심원상으로 배열되어 있었으며, 탈피기간중 혈구의 일부는 불규칙한 구조로 변형되었다. 고배율의 투과전자현미경으로 헤모시아닌 결정체의 격자구조를 관찰한 결과, 미세소관(microtubule)과 매우 유사한 구조를 가지고 있었으며, 각각의 미세한 관상 구조는 다시 약 20여 가닥의 극히 미세한 필라멘트로 이루어져 있음이 확인되었다.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Electron micrographs of the eosinophilic granulocytes in the spider *Araneus ventricosus*. A, B: Eosinophilic granulocyte during intermolt period contains relatively small granules (G) with the size of 1.0  $\mu\text{m}$  in diameter. These granules have high electron densities. C, D: During the molt period, some of the eosinophilic granulocytes have fine structural modification in their cell organelles. Nucleus (N) of each granulocyte appeared at the centric region of cytoplasm. E-G: During the molt period, each granulocyte has a number of mitochondria (M), moderate amount of phagosomes (P), and elaborate rough endoplasmic reticula (Er) including well developed Golgi complex (Gc) within the cytoplasm. Scale bars indicate 5  $\mu\text{m}$  (B-D), 2  $\mu\text{m}$  (A, E, F) and 1  $\mu\text{m}$  (G), respectively.

**Fig. 2.** Electron micrographs of the basophilic granulocyte in the spider *Araneus ventricosus*. A, B: Basophilic granulocytes are observed as either spindle or elliptical shape, and contain relatively large granules with the size of 1.0~1.5  $\mu\text{m}$  in diameter. C, D: At the vicinity of the nucleus (N), rough endoplasmic reticulum (Er) and electron-dense granules (G) are seen. E, F: Some of the circulating basophilic granulocytes have granules with diverse electron densities during the molt period. G, H: During the molting period, the electron density of the granules within the basophilic granulocytes is changed to a lower state. At the vicinity of the nucleus, well developed Golgi complexes (Gc) are observed. Scale bars indicate 5  $\mu\text{m}$  (A, B, F, G), 2  $\mu\text{m}$  (E) and 1  $\mu\text{m}$  (C, D, H), respectively.

**Fig. 3.** Electron micrographs of the cyanocytes in the spider *Araneus ventricosus*. A, B: The cyanocyte during intermolt period is the biggest hemocyte among the granulocytes. The cyanocyte contains numerous hemocyanin crystals (Hc) and a number of electron-lucent vacuoles (V) in the cytoplasm. C, D: During the molt period, some cyanocytes with irregular shapes are also observed. High magnification electron micrographs reveal the lattice sub-structure of the hemocyanin crystals with light and dark areas. E, F: Granules of the hemocyanin crystals have a microtubule-like structure which composed of fine fibrillar filaments. N: nucleus. Scale bars indicate 5  $\mu\text{m}$  (A, C), 1  $\mu\text{m}$  (D), 0.2  $\mu\text{m}$  (B) and 0.1  $\mu\text{m}$  (E, F), respectively.







