

흰점박이꽃무지 유충의 혈구세포에 대한 형태학적 특성

조세열*

강원대학교 생물자원과학부 응용생물전공

Ultrastructure Characterization of Hemocytes in Larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*

Saeyoull Cho*

Department of Applied Biology, Division of Bioresource Sciences, College of Agriculture and Life Science, Environment Friendly Agriculture Center, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

ABSTRACT: In this study, we used electron microscopic analysis to characterize the hemocytes in the last larva of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Colbe) (Cetoniidae, Coleoptera). Granulocytes (GR), plasmatocytes (PL), oenocytoids (OE), spherulocytes (SP), prohemocytes (PR) and adipohemocytes (AD) were classified based on their size and ultrastructural differences in the circulating hemocytes. Many dark granules (<1 μ m in diameter) in the GR's cytoplasm were observed and well-developed mitochondria, endoplasmic reticulum (ER), nucleus, and Golgi complex were also seen. After microorganisms infected, the GRs were morphologically activated and phagocytosed them. Especially, dark granules (lysosomes) were fused themselves and these bigger granules finally agglomerate together with microorganisms. Other hemocytes seem to have no immune functions.

Key words: *Protaetia brevitarsis seulensis*, Granulocytes, Cellular immune response, Lysosomes

초록: 본 연구는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis* (Colbe) (Cetoniidae, Coleoptera) 유충의 혈림프에 존재하는 혈구세포들의 형태학적 특성분석을 위하여 수행하였다. 흰점박이꽃무지 유충 혈강 내에는 과립혈구세포, 세포질혈구세포, 편도혈구세포, 구상적혈구세포, 전혈구세포, 지방혈구세포 총 여섯 종류의 혈구세포들이 관찰 되었다. 그 중 과립혈구세포는 핵, 미토콘드리아, 골지체를 포함하여 잘 발달된 세포소기관들이 관찰 되었고 외래물질 침입시 면역학적 식균작용을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 특히, 과립혈구세포의 세포질에는 잘 발달된 리소좀(<1 μ m 직경)들이 세포막 주변으로 분포되어 존재하고 있음을 알 수 있었다. 식균된 외래물질은 다양한 크기의 리소좀들과 서로 합쳐지면서 외래물질을 제거하는 것으로 판단된다. 그 외 다섯 종의 혈구세포들은 외래물질 침입시 면역학적 활성화와 관계가 없는 것으로 관찰되었다.

검색어: 흰점박이꽃무지 유충, 과립혈구세포, 세포면역반응, 리소좀

곤충을 포함한 무척추동물은 항체를 생산하여 병원균에 대항하는 후천적 면역 반응보다 직접 병원균에 대항하는 선천적 면역이 잘 발달되어 있다(Tsakas and Marmaras, 2010). 이러한 선천적 면역반응은 혈구세포들에 의하여 수행되는 세포성 면역반응과 항생단백질들에 의한 체액성 면역반응으로 구분된다(Hoffman, 2003; Lemaitre and Hoffman, 2007; Strand, 2008).

특히, 곤충의 혈구세포들에 의하여 수행되는 세포성 면역반응은 멜라닌화를 포함한 식균작용, 노듈형성, 캡슐형성 등의 방법으로 병원균/외래물질과 대항하는 기작을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Gupta, 1985). 외부 침입 병원성 미생물들이 그람양성 세균, 그람음성 세균, 곰팡이, 기생자 등 침입 주체에 따라 조금씩 면역반응의 시작과 종결에 관련된 유전자들/관련 단백질들이 달라질 수 있다. 그 중 곤충의 패턴인식 수용체(pattern recognition receptors: PRRs)가 미생물들의 세포벽 주요 구성 성분들인 peptidoglycan, lipopolysacchride, β -glucans, 다양한 lipoproteins, CpG dinucleotides 등과 결합을 시작으로 세포성

*Corresponding author: saeyoullcho@kangwon.ac.kr

Received May 19 2016; Revised May 31 2016

Accepted June 14 2016

면역 반응이 시작된다(Tauszig et al., 2000; Silverman and Maniatis, 2001).

곤충의 세포성 면역반응의 주체인 혈구세포(hemocytes)는 곤충 종의 다양성, 혈구세포의 형태 및 역할의 다양성 때문에 그 분류 및 동종이 매우 어려운 분야이다. 또한 면역반응의 주체가 되는 혈구세포의 동종은 한 종의 혈구세포가 담당하기보다는 때때로 2종, 3종의 혈구세포 협력으로 면역 반응을 수행하기에 정확한 면역 혈구세포의 동종은 더욱 어려운 실정이다. 따라서 곤충의 세포성 면역반응을 연구하기 위해서는 연구 대상 곤충의 혈구세포 형태학적 분석이 먼저 완료되어야만 한다.

일반적으로, 곤충 혈구세포는 전혈구세포(prohemocytes; PR), 세포질혈구세포(plasmatocytes; PL), 과립혈구세포(granulocytes; GR), 편도혈구세포(oenocytoids; OE), 구상적혈구세포(spherulocytes; SP), 지방혈구세포(adipohemocytes; AD), 응집혈구세포(coagulocytes; CG) 등으로 구분되고 있다(Jones, 1962; Gupta, 1979; Pandey and Tiwari, 2012). 특히, 곤충은 종의 다양성 때문에 곤충에 따라 발견되는 혈구세포 종류, 형태, 비율 등 서로 다른 경우가 많이 존재 한다. 예를 들면, 메뚜기목의 경우 전혈구세포, 세포질 혈구세포, 과립혈구세포, 구상적혈구세포가 주로 발견되며 편도혈구세포, 응집혈구세포, 지방혈구세포는 일반적으로 관찰 되지 않는다. 원시곤충인 툴토기목(Collembola)의 경우는 단지 과립혈구세포 한 종만 관찰되는 것으로 알려져 있다(Gupta, 1979). 또한 딱정벌레목(Coleoptera), 나비목(Lepidoptera), 파리목(Diptera)의 경우는 위에서 언급한 모든 혈구세포들이 관찰되기도 한다. 그러나 곤충 종 별로 관찰하면 그 예외는 많이 발견되는데 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 경우 단 3종의 혈구세포(세포질혈구세포, 층판혈구세포(lamellocytes), 결정혈구세포(crystal cell)로 구성되어 있다(Williams, 2007).

위에서 언급한 혈구세포들 중 어떤 혈구세포가 세포성 면역 반응을 담당하느냐를 결정하는 것은 다양한 현미경적 접근 방법이 필요하다. 정확한 혈구세포 종류와 형태 분류가 선행 되고 외래 물질을 곤충의 혈강(hemocoel)내로 인위적으로 주사하여 시간별로 모든 혈구세포 종류들에 대하여 추적 관찰하면서 결정할 수가 있다(Giglio et al., 2008). 외래물질이 주입된 곤충의 면역 혈구세포들은 순식간에 활성화 되는 것이 아니라 시간적 차이를 두고 발생되는데 일반적으로 3시간에서 48시간 간격을 두고 발생 하는 것으로 알려져 있다(Kwon et al., 2014). 이는 많은 현미경 작업을 필요로 하는데 연구 대상 곤충이 충분한 혈구세포의 량을 가지고 있어야 가능하다.

본 연구는 우리나라 대표적인 농·산업곤충인 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seoulensis*) 유충의 혈구세포를 주사전자현미경(SEM; scanning electron microscopy)과 투과전자현

미경(TEM; transmission electron microscopy) 두 가지 방법을 사용하여 혈구세포의 특성 및 형태를 제시하였다. 흰점박이꽃무지 유충 한 마리는 상당한 량의 혈림프(약 0.5 ml)를 가지고 있는 장점이 있으며 쉽게 인위적으로 병원균 감염을 유도할 수 있고, 특히 세포성 면역반응도 활발히 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히 본 연구를 통하여 과립혈구세포의 식균작용을 비롯하여 리소좀들이 외래물질과 직접 합쳐지면서 외래물질을 제거하는 리소좀과 연관된 세포성 면역반응을 규명하였다.

재료 및 방법

공시 곤충

본 연구에 이용한 흰점박이꽃무지 유충은 Kwon (2009)에 의한 방법으로 사육하였다. 사육 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주조건은 16:8 (L:D)h, 상대습도는 $60 \pm 10\%$ 로서 살균된 오크나무 톱밥을 먹이로 제공하면서 사육하였다.

혈림프(hemolymph)와 혈구세포(hemocytes)

대략적인 0.5 ml 정도의 혈림프는 흰점박이꽃무지 유충의 등에서 멸균된 유리 파스츄어피펫(Pasteur pipette)을 사용하여 추출하였다. 특히, 혈림프 추출 전, 흰점박이꽃무지 유충은 70% 알코올로 큐티클 표면을 멸균하였고, 추후 증류수로 다시 세척하여 사용하였다. 약 0.5 ml 정도의 혈림프는 항응고제(98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM EDTA, 41 mM citric acid, pH 4.5)와 1:1 비율로 혼합하여 혈림프의 응고를 방지하였다. 구세포 관찰을 위해서는 4°C , 1,000 g에서 10 분 간 원심분리한 후 혈구세포 펠렛은 다시 항응고제로 세척 한 후 시료로 사용하였다.

주사전자현미경(SEM; Scanning Electron Microscopy)

항응고제와 혼합된 혈구세포 10 μl 는 0.1% poly-L-lysine으로 처리된 커버슬립(cover slip)위에 직접 떨구어 사용되었다. 커버슬립에 부착된 혈구세포는 2.5% glutaraldehyde가 들어있는 cacodylate 버퍼(0.1 M, pH 7.3)에 고정되었다. 그 후, 혈구세포는 osmium tetroxide 1%로 다시 고정하고 에탄올을 사용하여 탈수하였다. 위 처리로 준비된 시료를 스티브(stubs)에 올리고 sputter coater에서 골드 코트화하였고 주사전자현미경(SEM; LEO 420)으로 시료를 관찰하였다.

투과전자현미경(TEM; Transmission Electron Microscopy)

투과전자현미경은 Huang et al. (2008)에 의해서 발표된 방법을 변형하여 수행하였다. 전 처리된 혈구세포는 osmium tetroxide 1%로 다시 고정하고 에탄올을 사용하여 탈수하였다. 고정된 시료는 레진(Epon 812)에 임베디드(embedded)한 후 초미세절편기(Pabisch Top Ultra 150)를 사용하여 미세절편을 만들고 200-mesh nickel grid에 절편된 시료를 올려놓았다. 시료는 아세트산 우라닐로 염색하고 5분간 구연산염에 침전하였다. 그 후 시료는 투과전자현미경(JEX-1230 transmission electron microscope, JEOL, Tokyo)으로 관찰하였다.

효모(Yeast)의 주입과 혈구세포 관찰

혈구세포의 면역반응을 투과전자현미경으로 관찰하기 위하여 외래미생물로서 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 선택하였다. 흰점박이꽃무지 유충에 대한 효모면역반응 유도는 Kwon et al. (2014)에 의해서 정립된 방법을 사용하였다. 본 실험실에서 제조한 멸균된 미세한 유리 바늘을 사용하여 효모(2.16×10^5) 40 μ l를 등쪽에서 혈강 안으로 피하 주사하였고 주사된 유충은 정해진 시간별로 혈림프를 추출하여 시료로 사용하였다.

결과 및 고찰

주사전자현미경에 의한 혈구세포 형태적 분류

흰점박이꽃무지 유충은 평균적으로 길이 3 ± 0.5 cm, 너비 1.6 ± 0.4 cm의 크기로서 보통 500 μ l~1 ml의 혈림프를 가지고 있다. 혈구세포수는 혈림프 1 μ l 당 평균 72 개 정도이고 종류는 6종으로 과립혈구세포(13%), 세포질혈구세포(20%), 편도혈구세포(1%), 구상적혈구세포(5%), 전혈구세포(17%), 지방혈구세포(44%)로 구성되어 있음이 보고되었다(Kwon et al., 2014). 흰점박이꽃무지 유충에 존재하는 전체적인 혈구세포의 주사전자현미경 사진은 Fig. 1A와 같다. Fig. 1A에서 나타난 여섯 종의 혈구세포 중 약 1% 정도를 차지하는 편도혈구세포는 동그란 원형으로서 다른 혈구세포보다 크기가 큰 것이 특징이다(Fig. 1B). 특히 세포막은 어떠한 구조물도 관찰되지 않으며 매우 매끈한 형태로 관찰된다. 누에(*Bombyx mori*)를 비롯하여 다양한 곤충에서도 편도혈구세포는 대체적으로 크고 세포막이 어떤 구조물이 관찰되지 않는 매끈한 형태로 보고되고 있다(Gupta, 1979). 기능은 멜라닌화를 책임지고 있으며, prophenoloxidase

(PPO)를 생산, 분비하여 큐티클에 발생한 상처치료 등에 기여하는 것으로 알려져 있다(Liu et al., 2013). 최근, 본 실험곤충에서도 편도혈구세포가 멜라닌화와 연관되어 있음을 보고하였다(Kwon et al., 2014).

Fig. 1C는 곤충에서 관찰되는 전형적 세포질혈구세포를 나

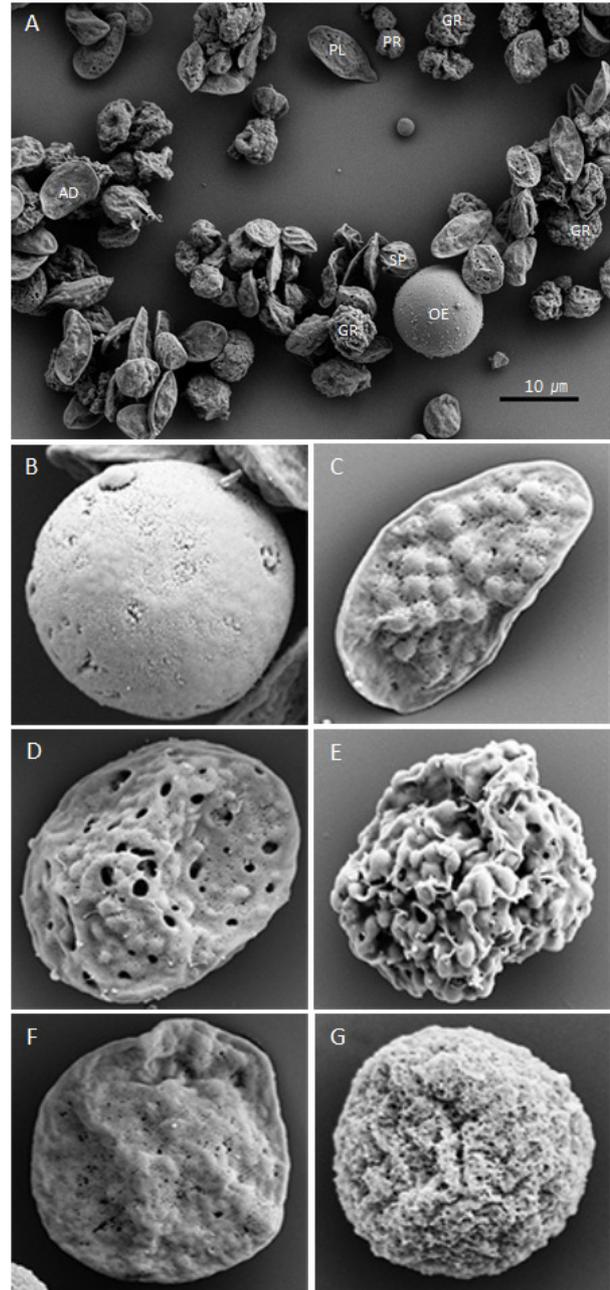


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) of the last larva of *Protactia brevitarsis seulensis* hemocytes. (A) General aspect of hemocytes. OE: oenocytoids; GR: granulocytes; PL: plasmatocytes; AD: adipohemocytes; PR: prohemocytes; SP: spherulocytes. High-magnification detail of each hemocyte type (B) OE; (C) PL; (D) AD; (E) GR; (F) SP; (G) PR. scale bar 10 μ m.

타내고 있다. 초파리(*D. melanogaster*)를 비롯하여 다양한 곤충에서 세포질혈구세포는 세포막에 구조물, 위족(micropapillae와 filopodia)이 매우 잘 발달되어 있는 것이 특징이다. 또한 병원균에 대항하는 세포성면역 기작인 식균작용과 캡슐화작용을 수행하는 대표적 혈구세포로 인지되고 있다(Williams, 2007). 그러나 흰점박이꽃무지 유충의 세포질 혈구세포는 세포막의 위족도 잘 발달되어 있지 않았으며 외부미생물에 대하여 어느 정도 면역반응을 보이지만 주된 면역 혈구세포는 아닌 것으로 보고되었다(Kwon et al., 2014). 곤충 지방혈구세포의 경우는 세포질혈구세포의 형태와 유사한 타원형 이며 특히 세포막에는 어떠한 구조물도 관찰되지 않는 매끈한 형태가 특징이다(Gupta, 1979). 흰점박이꽃무지 유충의 지방혈구세포도 타원형이고 세포막은 구조물이 관찰되지 않는 매끈한 형태로 관찰되었다(Fig. 1D).

흰점박이꽃무지 유충의 과립혈구세포의 경우 편도혈구세포와 같이 일반적으로 둥근 형태로 관찰되었으나, 그 크기가 편도혈구세포보다는 작고 다양한 형태의 구조물들이 관찰되면서 때때로 불규칙적인 형태도 관찰된다(Fig. 1E). 최근, 광학현미경과 다양한 염색법을 활용하여 본 곤충의 과립혈구세포의 면역학적 활성화가 보고되었다(Kwon et al., 2014). 주사전자현미경을 사용하여 관찰된 결과도 기 보고된 바와 같이 다양한 형태의 구조물들이 세포막에서 관찰되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1E). Fig. 1에서와 같이 여섯 개의 세포 중 과립혈구세포만이 세포막의 형태가 가장 다양하게 발달된 것을 알 수 있었다.

그 외에 구상적혈구세포와 전혈구세포는 비교적 크기가 작으며 둥근 원형의 형태를 보이는 것으로 관찰 되었다(Fig. 1F와 G). 초파리에서 전혈구세포는 초파리에 존재하는 모든 혈구세포 형성의 조혈구세포로서 인지되고 있다(Williams, 2007). 이러한 다른 세포로의 분화는 Hippo, GATA, RUNX, Friend-of-GATA families (Serpent (Srp)) 전사조절단백질들에 의하여 수행되는 것으로 알려져 있다(Williams, 2007; Milton et al., 2014). 현재까지, 흰점박이꽃무지 유충을 포함하여 대부분 곤충에서 어떠한 혈구세포나 조직이 조혈구세포로의 역할을 하는지? 어떤 전사조절단백질들과 조건이 다양한 혈구세포로의 분화를 유도하는지? 등에 대한 연구는 곤충학 전반적으로 매우 초보적인 단계에 있다. 예를 들어, 전혈구세포만 분리 배양할 수 있다면 위와 같은 질문에 정답을 유추할 수 있으리라 판단되나 아직까지 특정 곤충들의 특정 혈구세포들의 선택적 배양은 어려운 실정에 있다.

일반적으로 딱정벌레목은 위 여섯 종의 혈구세포와 함께 응집혈구세포도 함께 관찰이 되는 것으로 보고되었으나 흰점박이꽃무지 유충에서 응집혈구세포는 관찰할 수가 없었다. 응집

혈구세포의 일반적인 특징은 세포질이 일반적으로 맑고 투명하며, 세포가 쉽게 부서지기 쉬우며 세포막은 어떠한 구조물이 관찰되지 않는 특징이 있다(Arnold, 1974). 응집혈구세포의 기본적 기능은 멜라닌화 반응과 연계된 상처치료나 병원균 침입 시 식균작용도 책임지는 것으로 보고되고 있다. 많은 딱정벌레 종에서는 과립혈구세포와 세포질혈구세포가 그 기능을 대체 담당하는 것으로 보고되고 있다(Gupta, 1985). 최근 과립혈구세포와 편도혈구세포가 흰점박이꽃무지 유충과 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충에서 멜라닌화를 담당하면서 세포성 면역에 중추적인 역할을 하는 것으로 보고하였다(Kwon et al., 2014, Hwang et al., 2015). 또한 붉은야자나무바구미(*Rhynchophorus ferrugineus*)에서는 과립혈구세포와 세포질혈구세포(Manachini et al., 2011), *Cetonischema aeruginosa* 유충에서는 과립혈구세포(Giulianini et al., 2003)가 그 역할을 담당하는 것으로 보고되었다. 따라서 주로 과립혈구세포가 응집혈구세포의 기능과 중첩되거나 하여 많은 딱정벌레 종에서 응집혈구세포가 관찰 되지 않는 경향이 있는 것으로 판단된다.

투과전자현미경에 의한 혈구세포 형태적 분류

주사전자현미경은 흰점박이꽃무지 유충 혈구세포들의 외형적 모습에 대한 정보를 제공한 반면 투과전자현미경은 구체적으로 세포 소기관(핵, 미토콘드리아, 마이크로튜블, 세포내 발견되는 다양한 크기의 낭리소솜)을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2A는 편도혈구세포를 나타내는데 다른 혈구세포와 비교 커다란 핵과 세포질 가지고 있는 것을 재확인할 수 있었다. 세포막은 주사전자현미경 결과와 같이 다양한 구조물이 관찰되지 않는 매끈한 형태이며 세포질에는 다양한 크기의 짙은 낭들이 관찰되었다. 일반적인 곤충의 편도혈구세포들은 리소솜이 발달되어 있지 않는 것으로 알려져 있어서 다양한 크기 낭들은 리소솜은 아닌 것으로 판단되고 동시에 적은 수의 미토콘드리아도 관찰되었다(Fig. 2A). 소포체도 관찰할 수 있었으나 그 크기와 모양을 비교하면 일반적으로 잘 발달되어 있지 않는 것으로 판단되며 골지체는 관찰할 수 없었다. 문헌에서도 곤충의 편도혈구세포는 소포체와 골지체를 관찰하기가 힘든 것으로 보고된바 있다(Gupta, 1985).

Fig. 2B는 과립혈구세포를 나타내는데 다른 세포와 비교하여 매우 잘 발달된 미토콘드리아들을 발견할 수 있다. 이는 여섯 개의 혈구세포 중 에너지(ATP)를 가장 많이 사용하는 세포로 추측할 수 있었으며 소포체와 골지체도 관찰되었다(Fig. 2B). 또한 매우 잘 발달된 다양한 크기의 낭들이 관찰되는데 특히 짙은 색을 가지는 낭들은 다른 세포에 존재하는 낭들과 비교 주

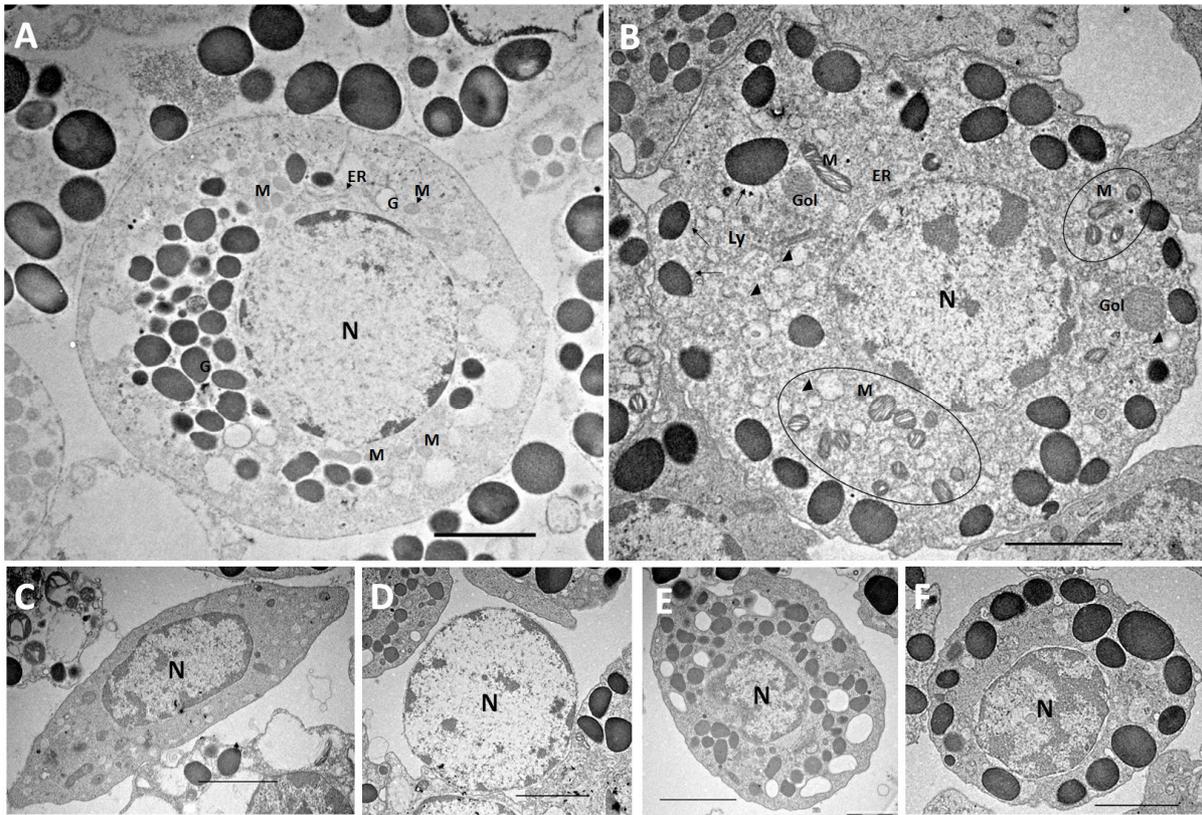


Fig. 2. Transmission electron microscopy (TEM) of the last larva of *Protaetia brevitarsis seulensis* hemocytes. (A) Oenocytoid; N: nucleus; M: mitochondria; ER: endoplasmic reticulum; G: granules. Scale bar = 1 μm . (B) Granulocyte; N: nucleus; M: mitochondria; ER: endoplasmic reticulum; Gol: golgi body; Ly: lysosomes and granules (Arrow); Arrowhead: various granules. Scale bar = 2 μm . (C) Plasmatocyte; Scale bar = 1 μm . (D) Prohemocyte; Scale bar = 0.5 μm . (E) Adipohemocyte; Scale bar = 1 μm . (F) Spherulocyte; Scale bar = 1 μm .

로 세포막 주변으로 위치하고 있었으며 그 크기와 위치를 비교하여 리소좀일 것으로 추측하였다. 일반적인 세포내 리소좀의 크기는 0.1-1.2 μm 이고 식물세포는 녹색계통, 동물세포는 짙은 보라색 계통으로 염색이 된다. 투과전자현미경 결과 보통 짙은 색으로 관찰 되는 경우가 흔하며 곤충의 혈구세포내 리소좀은 Fig. 2B 화살표와 같은 모습으로 종종 관찰 되는 것으로 보고되었다(Alves e Silva et al., 2013). 최근, 뱀잡자리(*Oncopeltus fasciatus*)의 혈구세포에서 기생자 침입시 면역혈구세포에 의한 식균작용 후 리소좀들의 활성화가 관찰 되었고 Kwon et al. (2014)은 흰점박이꽃무지 유충의 과립혈구세포에서 리소좀의 활성화를 리소좀 마커를 사용 확인하였고 크기는 일관되지 않으며 대략 1.2 μm 이하로 보고하였다(Alves e Silva et al., 2013; Kwon et al., 2014). 또한 편도혈구세포를 포함 다른 혈구세포들에서 관찰되는 과립들은 리소좀 마커로 염색 되지 않는 것으로 보아 리소좀이라기보다 다른 기능을 수행하는 낭들로 판단된다(Kwon et al., 2014). 그 외에 다른 세포에서 볼 수 없는 다양한 크기의 투명색 낭들도 많이 관찰되며 대체적으로 다른 세포 비교 매우 복잡한 세포질 구조를 가지고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 2C는 세포질혈구세포를 나타낸다. 전형적으로 긴 타원형 형태로 비교적 커다란 핵을 가지고 있음 알 수 있었다. 여러 개의 미토콘드리아도 관찰 되나 과립혈구세포에서 관찰 되었던 활성화 된 리소좀들은 많이 관찰 되지 않았다. Fig. 2D는 전혈구세포를 나타내며 그 크기가 가장 작은 혈구세포이다. 전혈구세포의 핵은 세포전체를 차지 할 정도로 그 크기가 컸으며 세포소기관을 포함 세포질을 관찰하기가 힘들었다. 곤충 전혈구세포의 기능은 모든 혈구세포들로 분화 될 수 있는 특징이 있는 혈구세포로서 복잡하고 다양한 세포질을 바탕으로 기능을 수행하기 보다는 잘 발달된 핵을 이용하여 다른 기능을 가진 혈구세포들로 분화 될 수 있는 특징을 가지고 있는 것으로 판단된다. 본 실험에서 관찰된 전혈구세포의 특징은 누에(*Bombyx mori*)를 비롯하여 많은 곤충에서 보고되고 있다(Yamashita and Iwabuchi, 2001). Fig. 2D는 구상적혈구세포를 나타내는데 편도혈구세포 보다는 작으며 세포막은 어떠한 구조물도 관찰 되지 않는 매끈한 형태를 보인다. 또한 다양한 크기의 낭들도 관찰 되는데 낭의 색깔은 과립혈구세포의 낭보다 옅은색이며 구형의 모습으로 관찰 된다. 또한 미토콘드리아, 골지체, 소포체등도 잘 발달

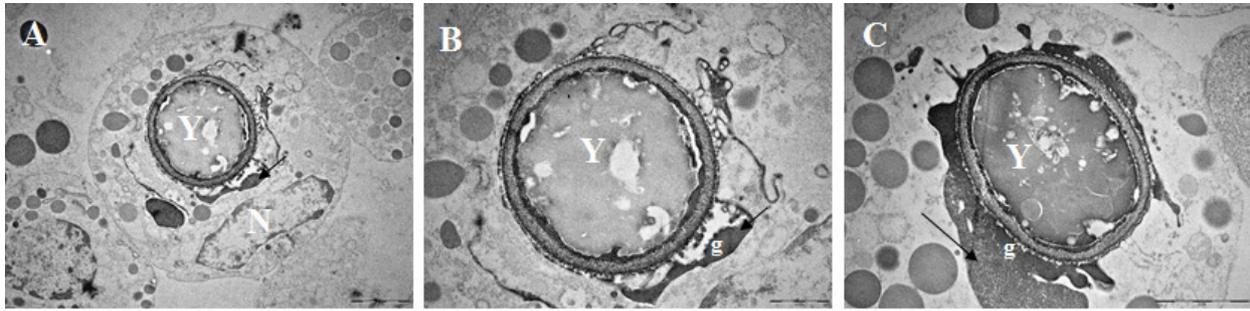


Fig. 3. Transmission electron microscopy (TEM) of granulocytes after 12 h of infection with *Saccharomyces cerevisiae*. (A) The yeast (Y) was engulfed by granulocytes and fused with lysosomes (g and arrow). N: nucleus. scale bar = 2 μm . (B) and (C) higher magnification images of the yeast engulfed by granulocytes. Scale bar = 1 μm and 2 μm .

되어 있지 않았다. Fig. 2E는 약간의 타원형인 지방혈구세포인데 세포크기에 비해 핵의 크기는 작고 완전한 구형의 질은 낭들이 관찰되며 주로 지방들을 함유하여 에너지를 필요로 하는 기관에 지방을 전달하는 기능을 할 것으로 판단된다. 마지막으로 Fig. 2F는 구상적혈구세포로서 곤충에서 그 기능은 정확히 알려져 있지 않다.

외래물질 주입에 따른 혈구세포의 형태학적 활성화

외래미생물 침입시 발생하는 흰점박이꽃무지 유충 혈구세포의 면역학적 활성화를 관찰하기 위하여 인위적으로 세균보다 크기가 큰 효모를 주입하였다. 주입 12시간 후 혈림프를 추출하고 여섯 종의 혈구세포들을 투과전자현미경으로 관찰하였다. 여섯 종의 혈구세포 중 과립혈구세포만이 효모를 식균하여 제거하는 면역학적 활성화가 관찰되었다(Fig. 3A). 효모를 식균한 과립혈구세포는 식균된 효모에 의하여 중앙에 위치했던 원형의 핵은 타원형 형태로 가장자리로 밀려나 있었으며 그 자리를 효모가 위치해 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). 과립혈구세포의 특징 중 하나인 다양한 크기의 질은 리소좀들은 서로 합쳐져 있었으며 최종적으로 리소좀이 효모와 합쳐져 있는 모습이 관찰되었다(Fig. 3B). 세포내 리소좀은 세포내에서 강한 산성을 띠는 단일막 구조로서 주로 50종 이상의 효소들을 함유하고 세포내 필요 없는 소기관, 단백질, 지방, 침입외래 병원균 등을 분해하는 소기관이다. Fig. 2B와 같이 면역학적으로 불활성 상태에서는 리소좀들이 주로 세포막 주변에 산재해 있는 상태로 존재하다 식균작용에 의하여 세포질로 외래미생물이 세포질에 노출되면 여러 개의 리소좀들이 서로 합쳐지면서 최종적으로 외래미생물과 합쳐지면서 제거하는 것을 알 수 있었다. Kwon et al. (2014)은 흰점박이꽃무지 유충을 이용하여 인위적으로 병원균 주입 후 과립혈구세포의 면역 활성화를 다양한

염색법, 유세포 분석기(flow-cytometry), 위상차현미경(confocal microscopy) 등을 사용하여 특성을 분석하였다. 그러나 흰점박이꽃무지 유충 과립혈구세포에 의한 외래미생물의 식균과 상태를 정확히 제시한 결과는 없었으며 특히, 리소좀과 외부미생물과의 합쳐지는 현상은 척추동물을 포함하여 쉽게 관찰하지 못하는 결과이다. 본 논문의 연구 결과는 우리나라 주요 농업곤충인 흰점박이꽃무지 유충의 혈강내 존재하는 혈구세포들의 종류와 형태적 특성을 제시하고 특히 과립혈구세포가 외부미생물들과 대항하는 주요 혈구세포임을 알 수 있었다. 또한 과립혈구세포의 세포질은 매우 잘 발달되어 있었으며 특히 발달된 리소좀은 외래미생물 제거에 중추적 역할을 담당하는 것으로 판단된다.

사사

본 연구는 농림수산물기술평가원(과제번호: 314086-3)지원에 의해 이루어졌습니다. 본 논문의 실험과 관련하여 방경린, 황세정, 이지애, 강원대학교 전자현미경센터가 수고해 주셨습니다.

Literature Cited

- Alves e Silva, T.L., Vasconcellos, L.R.C., Lopes, A.H., Souto-Padron, T., 2013. The immune response of hemocytes of the insect *Oncopeltus fasciatus* against the *Flagellate Phytomonas serpens*. PLoS ONE 8, e72076.
- Arnold, J.W., 1974. The hemocytes of insects. Academic Press. New York, U.A.S. p. 201-254.
- Giglio, A., Battistella, S., Talarico, F.F., Brandmayr, T.Z., Giulianini, P.G., 2008. Circulating hemocytes from larvae and adults of *Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei* Dejean 1826 (Coleoptera, Carabidae): Cell types and their role in phagocytosis after in vivo

- artificial non-self-challenge. *Micron*. 39, 552-558.
- Giulianini, P.G., Bertolo, F., Battistella, S., Amirante, G.A., 2003. Ultrastructure of the hemocytes of *Cetonischema aeruginosa* larvae (Coleoptera, Scarabaeidae): involvement of both granulocytes and oenocytoids in *in vivo* phagocytosis. *Tissue Cell* 35, 243-251.
- Gupta, A.P., 1979. *Insect hemocytes development, forms, functions and techniques*. Cambridge University Press. New York, U.S.A. p. 83.
- Gupta, A.P., 1985. *Cellular elements in hemolymph*. Pergamon Press. Oxford, England. p. 401-451.
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- Huang, F., Shi, M., Chen, Y.F., Cao, T.T., Chen, X.X., 2008. Oogenesis of *Diadegma semiclausum* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its associated polydnavirus. *Microsc. Res. Tech.* 71, 676-683.
- Hwang, S., Bang, K., Lee, J., Cho, S. 2015. Circulating hemocytes from larvae of the Japanese rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma* (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae) and the cellular immune response to microorganisms. *PLoS ONE* 10, e0128519.
- Jones, J.C., 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *Rev. Am. Zool.* 2, 209-246.
- Kwon, H., Bang, K., Cho, S., 2014. Characterization of the hemocytes in larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis*: Involvement of granulocyte-mediated phagocytosis. *PLoS ONE* 9, e103620.
- Kwon, O., 2009. Effect of different diets on larval growth of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe)(Coleoptera:Cetoniidae). *Entomol. Res.* 39, 152-154.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697-743.
- Liu, F., Xu, Q., Zhang, Q., Lu, A., Beerntsen, B.T., Ling, E., 2013. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Sci. J.* 10, 102-109.
- Manachini, B., Arizza, V., Parrinello, D., Parrinello, N., 2011. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. *Invertebr. Pathol.* 106, 360-365.
- Milton, C.C., Grusche, F.A., Degoutin, J.L., Yu, E., Dai, Q., Lai, E.C., Harvey, K.F., 2014. The Hippo pathway regulates hematopoiesis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 24, 2673-2680.
- Pandey, J.P., Tiwari, R.K., 2012. An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and iomedical fields. *Am. J. Biochem. Mole. Biol.* 2, 82-105.
- Silverman, N., Maniatis, T., 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Dev.* 15, 2321-2342.
- Strand, M.R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15, 1-14.
- Tauszig, S., Emmanuelle, J., Hoffmann, J.A., Imler, J., 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10520-10525.
- Tsakas, S., Marmaras, V.J., 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Surv. J.* 7, 228-238.
- Williams, M.J., 2007. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J. Immunol.* 178, 4711-4716.
- Yamashita, M., Iwabuchi, K., 2001. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *J. Insect Physiol.* 47, 325-331.