

등글장수풍뎅이 혈구 종류와 식균작용

황두선 · 장영철 · 조세열*

강원대학교 생물자원과학부 응용생물전공

Morphological and Immunological Characterization of Hemocytes in Larvae of *Pentodon quadridens bidentulus* (Famaire, 1887)

Dooseon Hwang, Young-Chul Jang and 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: The purpose of this study was to analyze the characteristics of hemocytes in the hemolymph of the larvae of *Pentodon quadridens bidentulus* and the characteristics of the hemocytes responsible for cellular immunity during pathogen infection. Granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids, spherulocytes, prohemocytes and adipo-hemocytes were found in the circulating hemocytes. Among them, granulocyte were observed as cells responsible for immunological phagocytosis during entry of foreign substances. In particular, it was observed that the most active phagocytic action occurred within 12 hours *in vivo*, and that after 24 hours, the immune activation was reduced and converted to a normal state. Plasmatocytes were occasionally observed as immunological response, but the remaining hemocytes were not related to immunological activation.

Key words: *Pentodon quadridens bidentulus*, Immune, Hemolymph, Granulocytes, Phagocytosis

초 록: 본 연구는 등글장수풍뎅이(*Pentodon quadridens bidentulus* (Famaire, 1887)) 유충의 혈림프에 존재하는 혈구세포들의 종류와 병원균 침입 시 세포 면역을 담당하는 세포를 특정하고 분석하였다. 등글장수풍뎅이(*P. quadridens bidentulus*) 유충 혈강내에는 과립혈구세포, 부정형혈구세포, 편도혈구세포, 소구형혈구세포, 원시혈구세포, 지방혈구세포 총 여섯 종류의 혈구세포들이 존재하였다. 여섯 종류의 혈구세포 중 과립혈구세포가 병원균 침입 시 형태적 변이와 함께 병원균들에 대한 식균작용을 수행하는 면역세포로 관찰 되었다. 특히, 생체 내에서 병원균 침입시 12 시간 안에 활발히 식균작용을 수행하였고 24시간 이후로는 면역 활성화가 줄어들면서 정상상태로 전환되는 것을 알 수 있었다. 세포질 혈구세포의 식균작용도 간혹 관찰 되었으나 나머지 세포들은 면역과 연관된 활성화가 없는 것으로 나타났다.

검색어: 등글장수풍뎅이, 면역, 혈림프, 과립혈구세포, 식균작용

곤충 혈관계는 포유동물과 다른 개방혈관계(Open circulatory system)를 바탕으로 기관들 사이로 다양한 신호전달, 영양분 운송 등을 수행하고 있다. 특히, 이러한 개방혈관계는 면역적 측면에서 매우 큰 장점을 가지고 있다. 예를 들면, 병원균 침입 장소로 면역전달물질과 면역세포의 빠른 발현과 이동은 폐쇄 혈관계(Closed circulatory system)를 가진 동물들과 비교 큰 장점으로 보고되고 있다(Dubovskiy et al., 2016). 포유동물은 긴

혈관을 따라 이동하므로 병원균 침입시 면역전달물질과 면역 세포의 반응은 곤충과 비교 다소 느린 것으로 보고되고 있다 (Dubovskiy et al., 2016).

곤충과 포유동물 면역반응의 또 다른 차이점은 대다수 포유 동물들은 항원/항체 반응에 의존 침입한 병원균을 기억, 훗날 대응하는 후천적 면역반응이 매우 잘 발달 되어 있다. 그러나 대부분 곤충은 척추동물과 비교 매우 짧은 생활사를 가지기에 항체를 생산 하여 훗날 병원균들에 대항하는 장기적인 후천 면역 반응 보다 직접 병원균에 대항하여 즉시 반응을 수행하는 선천적 면적이 매우 잘 발달 되어 있다(Lee et al., 2016).

*Corresponding author: saeyoullcho@kangwon.ac.kr

Received April 7 2017; Revised June 28 2017

Accepted August 1 2017

곤충에서 선천적 면역반응은 항생단백질(AMPs; Anti-microbial peptides) 작용에 의한 체액성 면역(Humoral immune response) 과 면역혈구세포에 의한 세포성 면역(Cellular immune response) 으로 구성된다(Janeway and Medzhitov, 2002; Hoffmann, 2003; Kwon et al., 2014).

곤충은 다양한 종류의 항생단백질들을 활용하여 다양한 병원균들과 대항하며 진화 하였다(Bang et al., 2015; Hwang et al., 2015; Lee et al., 2016). 예를 들어, 흰점박이꽃무지유충(*Protaetia brevitarsis seulensis*)의 경우 인위적으로 박테리아와 곰팡이를 혈강내 주입 후 지방체(Fatbody)에서 발견되는 유전자를 조사한 경우 약 ~3,000개 이상이 과 발현(Up-regulation) 되었고 그 중 100배 이상 발현되는 Attacin과 Defencin 등을 포함 10종 항생단백질들이 발굴되기도 하였다(Bang et al., 2015). 이러한 곤충유래 항생단백질들은 병원균 세포벽과 직접 결합 천공하여 치사케 하는 기존 항생제와 다른 기작이 있음이 보고 되기도 하였다(Kwon et al., 2014; Bang et al., 2015; Lee et al., 2016).

곤충에서 세포성 면역반응의 경우 면역세포 주체가 혈구세포로 제한되며 대 다수 곤충이 한 두 종 혈구세포 종류에 의존 면역반응을 수행하고 있다(Gupta, 1985; Hoffman, 2003). 곤충에서 면역 혈구세포에 의한 반응은 감염부위 멜라닌화(melanization), 식균(phagocytosis), 소낭형성(nodulation), 피낭형성(encapsulation) 등 다양한 방법을 활용 병원균을 직접 치사케 하는 대항 기작을 가지고 있다(Gupta, 1985). 특히 혈구세포에 의한 병원균 식균작용은 이물질이라는 신호 하에 체내에 침입한 어떤 물질도 무조건 식균하려는 경향을 보이며 식균된 물질은 세포질내 리소좀과 결합 매우 빠르고 강력하게 제거 된다. 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충 혈구세포는 다양한 미생물들을 식균하기도 하지만 자신보다 크기가 ~3 배 이상 되는 사람 유방암(MCF10) 세포도 식균하려는 경향을 보이는 등 식균작용이 매우 강력한 것으로 보고되고 있다(Kwon et al., 2014).

연구가 되어있지 않은 곤충에서 면역 세포를 특정하고 그 세포의 특성을 분석하기 위해서는 혈림프내 존재하는 모든 혈구세포에 대해 형태적 분류와 함께 면역 세포 동정이 필수적이다. 그러나 본 작업은 다양한 현미경, 세포 실험방법, 곤충 혈구세포의 분류 경험과 함께 상당한 시간이 요구되는 작업이다(Giglio et al., 2008; Cho, 2016). 특히 면역세포 특성을 분석하기 위해서는 곤충체내에 인위적으로 외래물질을 주입 후 시간 경과에 따른 면역 반응의 정확한 시간을 특정하고 경과에 따른 혈구세포의 형태와 모양을 추적하면서 알 수 있다.

세포성면역 연구는 초파리(*Drosophila melanogaster*), 누에

(*Bombyx mori*), 거저리(*Tenebrio molitor*), 흰점박이꽃무지유충(*P. brevitarsis seulensis*)등 연구모델화 된 곤충을 대상으로 세계적으로 많은 연구가 진행 되었다. 그러나 곤충은 지구상에서 종(species) 수면에서 가장 커다란 그룹을 형성하는 동물이며 다양한 환경에 적응해 살아가기 때문에 자기만의 특별한 면역방범을 발달 시켜 진화 했다. 따라서 혈구세포의 종류를 곤충 종별로 확인하지 않는 이상 정확한 판단을 내리기는 어렵다. 일반적으로, 곤충 혈구세포는 원시혈구세포(prohemocytes), 부정형혈구세포(plasmacytes), 과립혈구세포(granulocytes), 편도혈구세포(oenocytoids), 소구형혈구세포(spherulocytes), 지방혈구세포(adipohemocytes), 응집혈구세포(coagulocytes) 등으로 구분되고 있다(Jones, 1962; Gupta, 1979; Pandey and Tiwari, 2012; Cho, 2016). 메뚜기목(Orthoptera)인 경우 원시혈구세포(prohemocytes), 부정형혈구세포(plasmacytes), 과립혈구세포(granulocytes), 소구형혈구세포(spherulocytes)만 존재하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 딱정벌레목(Coleoptera)의 경우 위에서 언급한 모든 혈구세포가 모두 존재하는 것으로 보고 되고 있다.

본 연구는 우리나라 시화호 간척지에 서식하는 등글장수풍뎡이(*P. quadridens bidentulus*)유충을 대상으로 다양한 현미경과 유세포분석기(Flow cytometry)를 사용 혈구세포의 특성 및 형태를 제시하였다. 특히, 혈구세포의 형태적 분류를 통하여 면역세포를 파악하였고 병원균 침입 후 생체 내에서 활성화되는 시점과 특성을 제시함으로써 등글장수풍뎡이(*P. quadridens bidentulus*)유충 세포성 면역반응을 규명하였다.

재료 및 방법

공시 곤충

본 연구 공시곤충인 등글장수풍뎡이(*Pentodon quadridens bidentulus*)유충은 시화호 간척지에서 채집하였다. 채집된 20 개체 유충은 성충으로 사육하여 등글장수풍뎡이(*P. quadridens bidentulus*)임을 확인 하였다. 사육 온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 광조건은 16:8 (L:D) h, 상대습도는 $70 \pm 10\%$ 로서 살균된 시화호 깃벌 모래 속에서 함께 사육하였다. 채집 후 ~80개체 유충들은 3령 유충까지 사육 후 혈구세포 특성분석을 위하여 사용하였다.

혈림프와 혈구세포

등글장수풍뎡이(*P. quadridens bidentulus*)유충의 혈림프 채혈을 위하여 멸균된 유리 파스츄어피펫(Pasteur pipette)을

사용하였다. 유리 파스츄어피펫은 100°C 이상의 열을 가하여 직경 ~1 mm의 크기로 만든 후 유충의 등(Dorsal)쪽 큐티클에 구멍 내어 순수한 혈림프만 추출하였다. 본 실험 목적은 면역 세포를 특정하고 특성을 분석하는 것이라 채혈시 유충은 항시 70% 알코올로 큐티클 표면을 멸균하고 다시 증류수로 세척 하여 사용하였다. ~0.7 ml 정도의 혈림프는 항응고제(98 mM NaOH; 186 mM NaCl; 17 mM EDTA; 1mM citric acid; pH = 4.5)와 1:1 비율로 혼합하여 응고를 방지하였다. 혈구세포 관찰을 위하여 4°C, 1,000 g 에서 5분간 원심분리 후 혈구세포 펠렛은 다시 항응고제나 PBS buffer (137 mM Sodium Chloride; 10 mM phosphate; 2.7 mM Potassium Chloride; pH = 7.4)로 세척 후 시료로 사용하였다.

비드(Latex)와 대장균(*Escherichia coli*)의 주입과 혈구 세포 관찰

혈구세포 면역반응을 관찰하기 위하여 외래물질로 비드(2.28×10^6 carboxylate-modified polystyrene latex beads)와 대장균(*E. coli* K12, 8×10^6)을 사용하였다. 비드는 카르복실기로 변형된 라텍스 비드로서 일반적으로 동물세포들의 식균 작용 여부를 확인 할 때 사용된다. 혈구세포들의 면역 활성화 재확인을 위하여 대장균(*E. coli* K12)을 직접 유충 혈강내 주입하여 확인 하였다. 주입하기 전 유충은 70% 알코올로 큐티클 표면을 멸균하고 4°C 에서 20분간 보관하여 마취시켰고 유리 파스츄어피펫(직경 ~0.5 mm)을 사용하여 유충의 등(Dorsal)쪽 큐티클에 구멍을 내어 주입하였다. 현미경 관찰과 유세포 분석을 위해 주입된 유충은 ~1시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 간격으로 채혈하여 면역 활성화 여부를 확인 하였다.

혈구세포 염색 및 유세포분석

면역 활성화된 혈구세포분석을 위하여 세포내 리소좀만 특별히 염색하는 LysoTracker Red (7.5 nM; Molecular Probes) 시약을 사용하였다. 대부분 세포에서 식균된 이물질들은 세포내 리소좀과 합쳐져 제거 되는데 LysoTracker Red 시약은 세포내 활성화되는 리소좀(Lysosome)만 특별히 염색할 수 있는 시약이며 세포내 리소좀의 활성화, 식균작용표시 시약으로 널리 사용 되고 있다(Kwon et al., 2014). 면역 유도된 유충들은 혈구 세포를 채혈하고 항응고제와 1:1 비율로 섞은 후 원심분리 하였다. 혈구세포 펠렛은 시약과 30분간 실온에서 배양 하였고 1분 간격으로 3반복 PBS buffer (137 mM Sodium Chloride; 10 mM phosphate; 2.7 mM Potassium Chloride; pH = 7.4)로 세척

후 현미경으로 관찰하였다. 동시에 위 방법으로 염색된 혈구세포들은 유세포분석기(BD Bioscience; San Jose, CA)를 사용하여 1마리 유충 당 10,000개의 혈구세포를 분석하여 Red-signal (FL1; 530/30 band-pass)을 기록하고 활성화 여부를 재확인 하였다.

현미경(Microscopy)관찰

모든 혈구세포 시료들은 라이카 현미경(Leica DM2500 upright and Leica DMI 3000B inverted fluorescence microscopes)으로 관찰하였고 세밀한 세포 사진 결과들을 위하여 컨포컬(Olympus FV1000 confocal microscope)현미경을 사용하였다.

결과 및 고찰

등글장수풍뎅이(*Pentodon quadridens bidentulus*) 유충의 혈구세포 분류

등글장수풍뎅이속 유충의 경우 주로 초원, 사막 모래 ~20 cm 깊이에 서식 하는 것으로 보고되고 있다(<https://no.wikipedia.org/wiki/Pentodon>). 본 연구에 사용된 우리나라 등글장수풍뎅이(*P. quadridens bidentulus*)유충은 염분농도가 비교적 높은 간척지 등지에 서식하는 것으로 조사 되었다. 채집된 장소는 경기도 시흥시(오이도)와 안산시(대부도)를 잇는 인공호수인 시화호 주변으로 이전 보고에서도 등글장수풍뎅이(*P. quadridens bidentulus*) 성충은 모두 서해안 주변에서 채집되었다(Kim,



Fig. 1. The larvae of *Pentodon quadridens bidentulus* and adults. (A) Larva collected from sampling sites; (B) Adults.

2011). 채집된 100마리 유충 중 20개체는 재료 및 방법에 묘사한 사육환경에서 성충으로 우화시킨 후 등글장수풍뎅이(*P. quadridens bidentulus*)임을 확인 하였다(Fig. 1A and B). 80개체 유충은 본 실험을 위하여 채혈하여 혈구세포 형태, 면역 반응을 조사하는데 사용 하였다. 등글장수풍뎅이(*P. quadridens bidentulus*)유충의 크기는 길이 4 ± 0.55 cm, 평균 너비 2 ± 0.47 cm의 크기로서 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)유충과 비교하여 약 1.5배 큰 것으로 나타났다. 유충 1마리 평균 혈림프의 양은 ~0.8 ml 내외로 파악 되었으며 혈구세포 수는 1 μ l 당 평균 80개 내외로 측정되었다.

혈림프 내에는 Fig. 2A와 같이 총 6종의 혈구세포가 관찰 되었다. 혈구세포 종류는 원시혈구세포(Prohemocytes), 부정형혈구세포(Plasmacytes), 과립혈구세포(Granulocytes), 편도

혈구세포(Oenocytoids), 소구형혈구세포(Spherulocytes), 지방혈구세포(Adipohemocytes)특징들을 가진 세포들이 관찰 되었다. 원시혈구세포(Prohemocytes)는 본 유충에서도 관찰되었듯이 대부분의 곤충 중에서 상대적으로 가장 작은 혈구세포로 보고되고 있다. 편도혈구세포(Oenocytoids)의 경우 ~1% 내외로 가장 낮은 비율로 존재하며 Fig. 2A에서와 같이 낮은 배율($\times 40$) 현미경 아래에서 편도혈구세포(Oenocytoids)를 쉽게 발견하지 못했으며 고배율의 현미경을 사용하여 면밀히 조사하면서 발견 하였다. 부정형혈구세포(Plasmacytes), 과립혈구세포(Granulocytes), 소구형혈구세포(Spherulocytes), 지방혈구세포(Adipohemocytes)등은 쉽게 구분 관찰 할 수 있었다(Fig. 2A).

Fig. 2B-F는 고배율($\times 100$)의 현미경을 사용한 혈구세포들의 형태적 특징을 나타내고 있다. Fig. 2B는 위에서 묘사 하였듯이

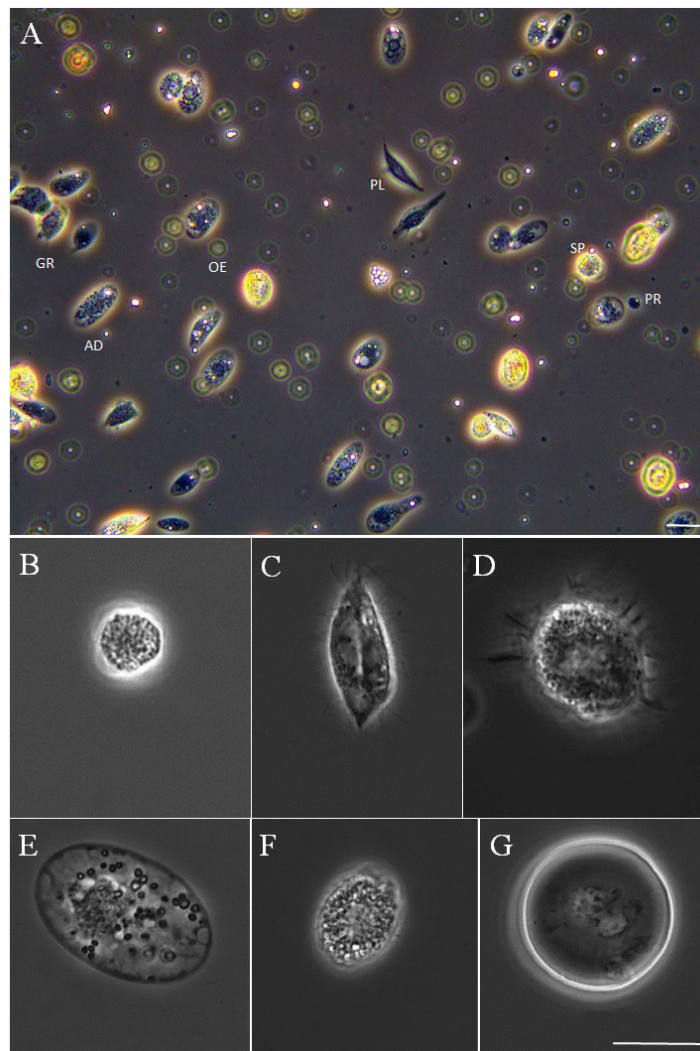


Fig. 2. Images of hemocytes from the larvae of *Pentodon quadridens bidentulus*. (A) Overall shape and relative size of total hemocytes ($\times 20$): PR, prohemocytes; PL, plasmacytes; GR, granulocytes; SP, spherulocytes; AD, adipohemocytes. (B-G) Hemocytes were classified as prohemocytes (B), plasmacytes (C), granulocytes (D), adipohemocytes (E), spherulocytes (F), and oenocytoids (G). Scale bar = 10 μ m.

곤충의 전형적인 원시혈구세포(Prohemocytes)로서 핵이 상대적으로 커서 세포질과 구분이 어려우며 혈구세포 중 가장 작은 세포로 특징지어진다. 이는 대 다수의 곤충에서도 적용되며 그 기능은 조건에 따라 다른 종류의 혈구세포로 분화 될 수 있는 혈구 줄기세포 기능이 있음을 보고하였다. 그 예로 초파리(*D. melanogaster*)에서 원시혈구세포(Prohemocytes)는 특별한 신호전달 체계를 거쳐 부정형혈구세포(Plasmotocytes), 크리스탈 세포(Crystal cells), 라멜로세포(Lamellocytes)로 분화되는 것을 확인 보고 하였다(Krzemien' et al., 2007). Fig. 2C는 세포가 상대적으로 크고 전형적인 타원형 형태이고 세포막 주변에 위족(pseudopod)들이 자주 관찰 되는 것으로 보아 부정형혈구세포(Plasmotocytes)로 판단된다. 많은 곤충에서도 부정형혈구세포(Plasmotocytes)는 가장 쉽게 구분 할 수 있는 세포로서 과립혈구세포(Granulocytes)와 함께 외부물질을 인지하고 식균작용을 수행하는 곤충 대표적 면역 혈구세포로 보고되고 있다(Kwon et al., 2014; Lee et al., 2016). Fig. 2D는 전형적인 곤충 과립혈구세포(Granulocytes)로 둥근 형태이며 세포질내에 다양한 과립(vacuoles)들이 존재하고 세포막 주변으로 매우 잘 발달된 위족(pseudopod)과 트랩(Extracellular Traps; ETs)들이 관찰 되는 특징을 가지고 있다. 특히, 세포막 주변 트랩들은 항생단백질 포함 다양한 단백질, DNA, 섬유질로 구성되어 있으며 주로 외래물질과 접촉하여 고정시키고 식균하여 세포질내 리소좀과 결합 외래물질을 제거하는 역할을 담당하고 있다(Kaplan and Radic, 2012; Boe et al., 2015). 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)유충과 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)유충 과립혈구세포(Granulocytes)의 경우도 세포막 트랩이 매우 잘 발달

되어 있었으며 외래물질 침입 후 매우 빠르고 활발히 활성화 되는 것으로 보고되었다(Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015).

Fig. 2E and F는 지방혈구세포(Adipohemocytes)와 소구형혈구세포(Spherulocytes)를 나타낸다. 특히, 딱정벌레목 지방혈구세포(Adipohemocytes)는 세포막에 어떠한 구조물도 관찰 되지 않는 매끄러운 형태이며 특히 세포질은 투명하고, 규칙적인 동그란 과립들이 관찰되는 특징을 가지고 있다(Arnold, 1974; Gupta, 1979).

Fig. 2G는 전형적인 편도혈구세포(Oenocytoids)로서 둥글고 세포막 구조물이 보이지 않았으며 세포질이 매우 탁한 형태를 나타낸다. 크기는 직경 ~15 μm 정도 크기로 관찰되며 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*)유충과 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*)유충의 경우도 비슷한 크기로 관찰되었다(Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015). 일반적으로 편도혈구세포(Oenocytoids)는 상처부위 멜라닌화나 면역에도 어느 정도 관여하는 혈구세포로 알려져 있으며 크기는 혈구세포 중 상대적으로 크고 혈림프내 가장 낮은 비율로 존재하는 것으로 알려져 있다(Kwon et al., 2014).

외래물질 주입에 따른 혈구세포의 면역학적 활성화

6종의 혈구세포 중 주요 면역 혈구세포를 파악하기 위하여 면역 활성화를 유도하는 세균 세포막 주요성분으로 도포 된 비드를 주입하였다(Kwon et al., 2014). 주입 직후(~1시간)부터 최대 24시간 까지 혈구세포 6종의 형태적 변이를 추적 관찰 하였고 과립혈구세포(Granulocytes)를 제외하고 5종의 세포들은

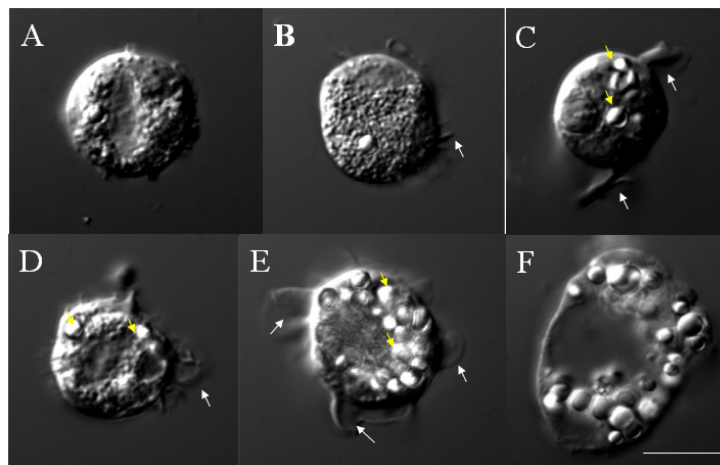


Fig. 3. The confocal images of immunological activated granulocytes. (A) Wild type granulocytes; (B-F) Granulocytes from larvae which were injected with carboxylate-modified polystyrene latex beads: (B) under 1 hour; (C) 4 hour; (D) 8 hour; (E) 12 hour; (F) 24 hour; Scale bar = 10 μm . Immune activated granulocytes changed their shape with generated large pseudopodia-like and extracellular traps-like structures (indicated by white arrow). The polymorphic glittering vacuoles were closely packed in the immune activated granulocyte cytoplasm (indicated by yellow arrow).

면역 활성화에 따른 형태적 변이를 관찰 할 수 없었다(Fig. 3A-F).

Fig. 3A는 면역 유도되기 전 과립혈구세포(Granulocytes)의 모습이다. 비드 주입 ~1시간이 지난 후 부터 과립혈구세포(Granulocytes)들은 위족과 세포막 트랩이 조금씩 발달되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3B). 주입 후 4시간부터 과립혈구세포질내에서 식균된 비드들 과립형태로 관찰 되었다(Fig. 3C). 주입 8시간(Fig. 3D)부터 12시간(Fig. 3E)사이대부분의 과립혈구세포(Granulocytes)들은 세포질 내 많은 비드들이 과립형태로 축적 되는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, Fig. 3D와 같이 8시간 후 부터 더욱 활성화 된 위족과 세포막 트랩들이 쉽게 관찰 되었고 12시간 이후 대다수의 과립혈구세포(Granulocytes)들은 매우 발달된 위족, 세포막 트랩, 세포질 내 많은 과립으로 채워지는 현상이 관찰 되었다(Fig. 3E). 위에서도 기술하였지만, 이러한 현상은 포유동물 면역세포에서도 쉽게 관찰되며 병원균의 제거에 필수적인 세포성 면역 반응으로 보고되고 있다(Boe et al., 2015).

24시간 이후(Fig. 3F)에는 대다수의 과립혈구세포(Granulocytes)들이 직경 ~30 μm 이상으로 커지면서 파열되는 세포사멸이 관찰 되었다(Fig. 3F). 면역세포 활성화에 따른 식균작용 후 세포 내 들어온 외래물질은 리소좀과 결합되어 외래물질의 제거가 진행된다. 세포질내 유입된 외래물질들이 리소좀에 의하여 제거 되지 못 한다면 세포는 부담감을 갖게 되며 자연스럽게 세포 자체가 사멸되어 죽는 현상이 발생된다(Kroemer and Levine; Tettamanti et al., 2011; Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015). 따라서 Fig. 3F는 리소좀에 존재하는 다양한 효소들에 의하여 비드가 제거 돼야 하는데 그러지 못하고 자연스럽게 세포가 죽어가는 현상이 관찰 된 것으로 판단된다. 이러한 세포 죽음이 괴사(Necrosis) 혹은 세포자멸(Apoptosis)인지는 정확한 진단이 필요하며 현재 세포죽음과 연관된 병원균의 청소는 곤충 세포면역 분야에서 새롭게 조명 받고 활발히 연구가 진행되는 분야이다. 특히 초파리(*D. melanogaster*)의 경우 식균 후 세포질내 병원균 제거가 활성 리소좀과 연관되어 자가세포사멸(Autophagic cell death)와 세포자멸 2가지 작용이 동시에 발생하는 등 특별한 연관이 있음을 보고 하였다(Mariño et al., 2014). 또한 흰점박이꽃무지(*P. brevitarsis seulensis*) 유충에서도 자가세포사멸이 병원균의 제거에 연관이 있음이 보고되기도 하였다(Kwon et al., 2014).

Fig. 3E and F와 같이 과립혈구세포(Granulocytes)의 세포질내 형성되는 과립들이 비드 주입에 따른 현상인지를 재확인 하기 위하여 병원균인 대장균(*E. coli* K12)을 직접 주입 하였다. 대장균(*E. coli* K12)주입에 의한 곤충 혈구세포 면역 활성화 유도

는 초파리(*D. melanogaster*)를 포함 많은 곤충을 대상으로 수행되는 전형적인 방법이다. 식균된 병원균들이 세포질내 리소좀과 결합되어 제거되는 과정은 다양한 방법들을 통하여 증명되었다(Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015; Lee et al., 2016). 특히 리소좀 활성화에 따른 병원균 제거는 리소좀 염색 시약(LysoTracker-Red)으로 염색 후 형광현미경으로 혈구세포들을 관찰 하면서 알 수 있다.

Fig. 4A는 주입 ~1시간 후(면역 유도가 되지 않는 시간) 염색된 전체 혈구세포들을 나타낸다. 과립혈구세포(Granulocytes)를 포함 5종 혈구 세포들은 형태적 면역 활성화(위족, 세포막 트랩 형성)를 비롯 세포질내 리소좀이 활성화 되지 않았음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 12시간(Fig. 4B)과 24시간(Fig. 4C)을 지나면서 과립혈구세포(Granulocytes)들은 Fig. 3과 같이 형태적 면역 활성화가 진행 되었고 세포질내 과립들이 형성되는 것을 알 수 있었다. 특히 12시간(Fig. 4B)의 과립혈구세포(Granulocytes)내 축적, 형성되는 과립들은 리소좀 염색시약(LysoTracker-Red)으로 매우 진하게 염색 되었다. 이는 Fig. 3에서와 같이 비드 주입 후 과립혈구세포(Granulocytes)내 형성, 축적되는 과립들이 활성화 된 리소좀과 결합 되면서 발생되었던 것으로 판단 할 수 있었다. 주입 24시간 이후에는 대다수의 과립혈구세포(Granulocytes)들은 원래 형태로 전환되었고 세포질내 리소좀도 불활성 상태로 전환되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4D). 따라서 본 유충은 병원균 침입 후 혈강내 면역 혈구세포의 활성화가 4시간 전 후로 시작되어 12시간에는 최고점에 이르며 24시간을 지나면서 병원균을 제거하고 원래 상태로 복귀되는 과정이 있음을 알 수 있었다. 대장균이 주입된 유충에서는 Fig. 3F와 같이 비드 주입 후 발생했던 세포 사멸은 관찰 되지 않았는데 이는 대장균의 경우 세포질내 리소좀에 의하여 대부분 제거되기 때문에 세포사멸 없이 원래 상태로 복귀되었으리라 판단 할 수 있었다. 과립혈구세포(Granulocytes)들 이외에 다른 세포들은 리소좀이 염색되거나 형태적 변이, 면역 활성화 등은 관찰 할 수 없었다(Fig. 4E).

Fig. 4의 결과 신뢰도를 높이기 위하여 유세포분석기를 사용하여 리소좀의 빨간색 형광량을 정량적으로 측정하였다(Fig. 5A-E). 대장균 주입 ~1시간, 12시간, 24시간, 48시간 후 유충 혈림프를 채혈한 후 염색 하여 측정하였다. 주입 ~1시간 후 혈구세포 샘플들의 염색량은 2.70%로 관찰되었다(Fig. 5B). 12시간 후 62.17% (Fig. 5C) 이상 염색되면서 대부분의 과립혈구세포(Granulocytes)들이 염색 되었고 그 후 점차적으로 감소되는 것으로 나타났다. 24시간 후 19.27% (Fig. 5D), 48시간 후 염색량(12.92%)은 다시 감소하는 것을 확인 하였다(Fig. 5E). Fig. 5F는 유세포 분석 후 각 3반복 통계 결과를 나타내고 있다.

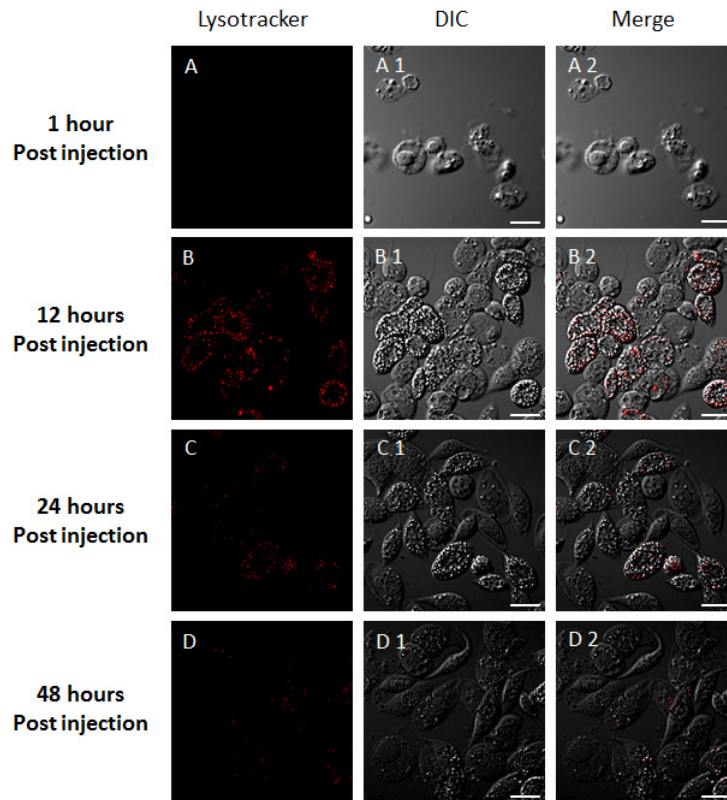


Fig. 4. LysoTracker-Red labeling of lysosomes in immunological activated granulocytes activated by *E. coli* (A, A1, and A2) 1 h post injection, (B, B1, and B2) 12 h post injection, (C, C1, C2) 24 h post injection. (D, D1, and D2) 48 h post injection. The granulocytes of 12 h post injection group were strongly stained and gradually diminish with time (24 h post injection group). A2, B2, C2, and D2 indicate merged images. Scale bar = 10 μ m.

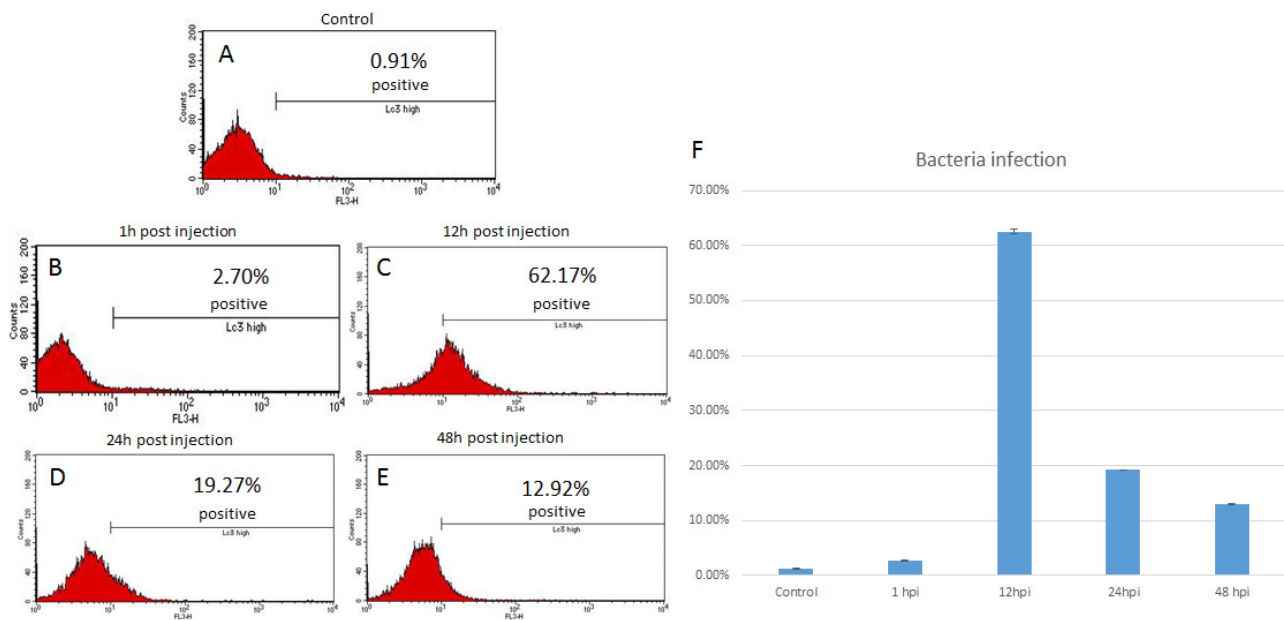


Fig. 5. Flow cytometric analysis after *E. coli* injection. The red filled histogram indicate positive staining of granulocytes from challenged larvae, respectively. (A-E) Flow cytometric results after infection; (F) Results are given as means. Based on the red fluorescence intensity, 2.7% of granulocytes at 1 h post injection group were positively detected red-signal. Positively stained granulocytes were detected more than over 60% at 12 h post infection group. Granulocytes began to decrease in red-signal after 24 hours of infection.

위 결과는 Fig. 4의 현미경 결과와 일치하며 주입 후 12시간까지 강한 면역 반응을 보이면서 빠르게 병원균을 제거하고 시간이 흐르면서 원래 상태로 복귀하는 것으로 판단 할 수 있었다.

현재까지 조사된 딱정벌레들의 경우 위축 형성 등 형태적 변이와 함께 면역반응은 대부분 ~24시간 이내에 수행 되는 것으로 보고되고 있다. 하지만 본 유충은 생체 내에서 ~12시간 내 세포 면역을 수행하는 매우 빠른 반응(급격히 활성화되는 위축과 세포막 트랩 형성 등 형태적 활성화)과 Fig. 3E and F와 같이 개개의 과립혈구세포들이 세포 자신이 견딜 수 없을 정도로 많은 수의 외래 물질을 식균하면서 세포가 사멸되는 세포성 면역반응을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다(Kwon et al., 2014; Hwang et al., 2015). 위와 같은 현상은 곤충 세포 면역 분야에서 매우 드문 경우이며 아마도 곤충이 처한 서식처 환경에 따라 면역 반응도 함께 진화된 것으로 추측 할 수 있다

사사

본 연구는 농림수산식품기술평가원(과제번호: 314086-3)의 지원 하에 수행 되었습니다. 2016-강원대학교 전임교원기초연구비(D1000918-01-01) 지원도 감사드립니다.

Literature Cited

- Arnold, J.W., 1974. The hemocytes of insects. Academic Press. New York, U.S.A. pp. 201-254.
- Bang, K., Hwang, S., Lee, J., Cho, S., 2015. Identification of immunity-related genes in the larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Coleoptera: Cetoniidae) by a next-generation sequencing-based transcriptome analysis. *J. Insect Sci.* 15, 142.
- Boe, D.M., Curtis, B.J., Chen, M.M., Ippolito, J.A., Kovacs, E.J., 2015. Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *J. Leukoc. Biol.* 97, 1023-1035.
- Cho, S., 2016. Ultrastructure characterization of hemocytes in larva of *Protaetia brevitarsis seulensis*. *Korean J. Appl. Entomol.* 55, 215-221.
- Dubovskiy, I.M., Kryukova, N.A., Glupov, V.V., Ratcliffe, N.A., 2016. Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr. Survival J.* 13, 229-246.
- 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.
- Gupta, A.P., 1979. Insect hemocytes development, forms, functions and techniques. Cambridge University Press. New York, U.S.A. 83 pp.
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- 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.
- Janeway, C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jones, J.C., 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. *Rev. Am. Zool.* 2, 209-246.
- Kaplan, M., Radic, M., 2012. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 189, 2689-2695.
- Kim, J., 2011. Arthropoda: Insecta: Coleoptera: Scarabaeoidea: Pleurosticti. *Insect Fauna of Korea. NIBR.* 12, 120-121.
- Kroemer, G., Levine, B., 2008. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 1004-1010.
- Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., Crozatier, M., 2007. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446, 325-328.
- 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(8), e103620.
- Kwon, H., Bang, K., Lee, M., Cho, S., 2014. Molecular cloning and characterization of a lysozyme cDNA from the mole cricket *Gryllotalpa Orientalis* (Orthoptera: Gryllotalpidae). *Mol. Biol. Rep.* 41, 5745-5754.
- Lee, J., Bang, K., Hwang, S., Cho, S., 2016. cDNA cloning and molecular characterization of a defensin-like antimicrobial peptide from larvae of *Protaetia brevitarsis seulensis* (Kolbe). *Mol. Biol. Rep.* 43, 371.
- Lee, J., Hwang, S., Cho, S., 2016. Immune tolerance to an intestine-adapted bacteria, *Chryseobacterium* sp., injected into the hemocoel of *Protaetia brevitarsis seulensis*. *Sci. Rep.* 6, 31722.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15, 81-94.
- Pandey, J.P., Tiwari, R.K., 2012. An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and biomedical fields. *Am. J. Biochem. Mole. Biol.* 2, 82-105.
- Tettamanti, G., Cao, Y., Feng, Q., Grimaldi, A., Eguileor, M., 2011. Autophagy in Lepidoptera: more than old wine in new bottle. 8, 5-14.