

## 산왕거미 (*Araneus ventricosus*) 혈구의 미세구조

최재영, 문명진\*  
단국대학교 첨단과학대학 생물학과

### The Fine Structure of Spider (*Araneus ventricosus*) Hemocytes

Jae-Young Choi and Myung-Jin Moon\*

Department of Biological Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received November 23, 2006; Accepted December 13, 2006)

#### ABSTRACT

Hemocytes of the spider *Araneus ventricosus* were investigated with histochemistry, density analysis of percoll gradient, and fine structural examinations using transmission electron microscope. The hemocytes of this spider were classified into two major groups: granulocytes and non-granulocytes. The granular hemocytes were subdivided into three subtypes according to their histochemical properties which are eosinophilic granulocytes (EGs), basophilic granulocytes (BGs) and cyanocytes. The EGs, which have small granules within the cytoplasm comprise about 5% of the total hemocytes. However the granules of BGs are larger than those of EGs. The cyanocytes were characterized to contain hemocyanin granules in their cytoplasm. On the other hand, the non-granulocytes were divided into three subtypes: hyaline leucocytes, oenocytoids, and molting hemocytes. The hyaline leucocytes are the most abundant and the smallest hemocyte type in this spider. The oenocytoids that have 10~15 µm in diameter are mostly found at the marginal region of the myocardium in the heart tube. The molting hemocytes, which only appeared during the molting period, contains plenty of glycogen particles in their cytoplasm.

**Keywords :** Fine structure, Hemocytes, Spider, *Araneus ventricosus*

#### 서론

절지동물의 혈구는 주로 크기나 형태 (Ravindranath, 1977), 핵과 세포질의 조직화학적 특성 (Chain & Anderson, 1982b; Hernandez et al., 1999) 및 미세구조 (Brehelin et al., 1978; Joshi & Lambdin, 1996) 등에 의

해 구분된다. Fahrenbach (1970)는 절지동물의 혈구 유형을 포유동물의 혈구 분류법과 마찬가지로 세포질에 함유된 과립의 유무에 따라 과립을 함유한 과립혈구와 과립을 가지지 않는 혈색소혈구 (cyanocytes)로 구분한 바 있다.

Chase (1994)는 정주성 거미류인 *Araneus cavaticus*를 실험재료로 탈피에 따른 혈림프내 단백질의 변화

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

를 관찰하고, 혈구를 투명혈구, 과립혈구, 탈피혈구의 세 가지 유형으로 구분하였다. 국내에서는 Chang & Yoe (1995)가 배회성 거미류인 별늑대거미 (*Pardosa astrigera*)의 혈구를 그 미세구조적인 특성에 따라 원시혈구 (prohemocytes), 무정형혈구, 과립혈구, 소구혈구 (spherulocytes)와 지방혈구 (adipohemocytes) 등 5가지 유형으로 구분하여 보고한 바 있다.

혈구의 종류는 일반적으로 그 형태적 및 세포화학적 특성을 기준으로 구분되지만 (Brehelin et al., 1978; Ahmad, 1988), 무척추동물의 경우 연구자에 따라 구분이 일정하지 않기 때문에, 보다 객관적인 기준을 제시하기 위해 다양한 실험법이 도입되었다. Peake (1979)는 곤충에서 Ficoll의 밀도구배의 차이를 이용하여 혈구를 구분하였고, Bohn (1977), Chain & Anderson (1982a) 등은 혈구가 커버글라스의 표면에 부착하는 점성의 차이를 기준으로 무정형혈구와 과립혈구를 구분하였다. Renwanz et al. (1986)도 몇 가지 종류의 곤충을 대상으로 percoll의 밀도구배를 이용하여 약 80~90%의 순수한 혈구들을 추출하고 그 결과를 보고한 바 있다.

절지동물의 혈구에 관한 연구는 주로 개체군이 다양한 곤충류에 집중되어 있으며 (Gupta, 1985), 거미류를 위시한 절지동물의 타 분류군에서는 아직 혈구의 종류조차 완전히 정립되어 있지 않은 실정이다. 특히 거미류는 곤충류 다음으로 많은 종을 보유하고 있고, 농작물의 주된 해충인 곤충류에 대한 강한 천적으로서 그 활용가치가 매우 높기 때문에 (Foelix, 1996) 이들의 생리특성에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 국내에 서식하는 왕거미종류 중에서 가장 몸체가 커서 대형의 곤충류를 포식하는 대표적 정주성거미인 산왕거미 (*Araneus ventricosus*)를 실험재료로 하여 미세구조적 및 세포화학적 특성을 기준으로 혈구의 구분을 시도하였다. 특히 percoll 밀도구배를 이용하여 객관적인 혈구의 구분을 시도하였으며, 탈피를 전후하여 혈구의 변화가 극심한 거미류의 생리특성을 고려하여 인공 사육을 통해 탈피시기의 거미를 확보하고, 이를 비탈피 시기의 혈구와 비교 분석도 병행하였다.

## 재료 및 방법

7, 8월 중 충남 천안시 안서동 소재 단국대학교 천안 캠퍼스 주변에서 채집한 왕거미과의 산왕거미 (*Araneus ventricosus*)를 실험재료로 사용하였다. 채집한 거미들은 양면이 유리로 된 40×40×10 cm 크기의 목재 사육조에 옮기고 안정화시킨 후, 갈색거저리 (*Tenebrio molitor*) 유충을 먹이로 사육하였다. 거미줄을 만드는 행동 습성과 먹이에 대한 거부반응 등을 토대로 탈피 시기에 접어든 개체들을 선별하였으며, 이들을 발생 단계별로 구분하여 실험에 사용하였다.

각 혈구의 운동성 및 접착성을 비교 관찰하기 위하여 산왕거미를 이산화탄소로 마취시킨 후, 부속지의 기부를 절단하고 10~20  $\mu$ L 모세관 튜브를 이용하여 혈림프를 채취하였다. 채취된 혈림프의 일부를 슬라이드 글라스 위에 도말하여 Wright-Giemsa 염색을 실시한 후, 고배율의 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 순환 혈구에 대한 세포화학적 특성을 확인하기 위하여 0.01% gentian violet, Wright-Giemsa, Periodic acid Schiff (PAS), Sudan black B 등의 특이적 염색도 병행하여 실시하였다.

한편, 혈림프내 혈구의 유형을 보다 객관적으로 구분하기 위하여 percoll의 밀도구배를 이용하여 혈구를 분리하였다. Percoll gradients를 제조하기 위해 멸균 후 6 M urea (pH 2)로 수세한 polycarbonate 원심분리 튜브와 20마리의 거미로부터 채취된 200  $\mu$ L의 혈림프를 분석시료로 사용하였다. 전체 7 mL의 60% percoll gradients를 제조하기 위해 원심분리 튜브 내에 3.2 mL의 100% percoll과 3.2 mL의 멸균된 증류수에 0.6 mL의 EGTA를 넣어 22,000 g (2°C)로 20분간 18° 각도의 A100S-10 로터에서 Supra 25K 고속원심분리기를 이용하여 원심분리시켰다. 제조된 60% percoll 혼합액에 곧바로 준비된 혈림프 시료를 주입하고 750 g (2°C)에서 20분간 동일한 방법으로 원심분리를 시행하였다.

원심분리후에 나타난 혈구의 밴드는 마이크로 팁을 이용하여 추출하였으며, percoll의 침전물을 제거하기 위해 거미생리식염용액 (Groome et al., 1991)과 항응고제의 혼합액이 담겨져 있는 튜브에 옮겨 담은 후,

2,000 rpm으로 원심분리하여 순수한 혈구 분획을 추출하였다. 분리된 혈구 분획의 일부는 슬라이드 글라스에 도달한 후, methanol로 고정하고 Wright-Giemsa로 염색하여 각 밴드에서 나타난 혈구의 유형을 구분하였으며 일부는 투과전자현미경 시료로 제작하였다.

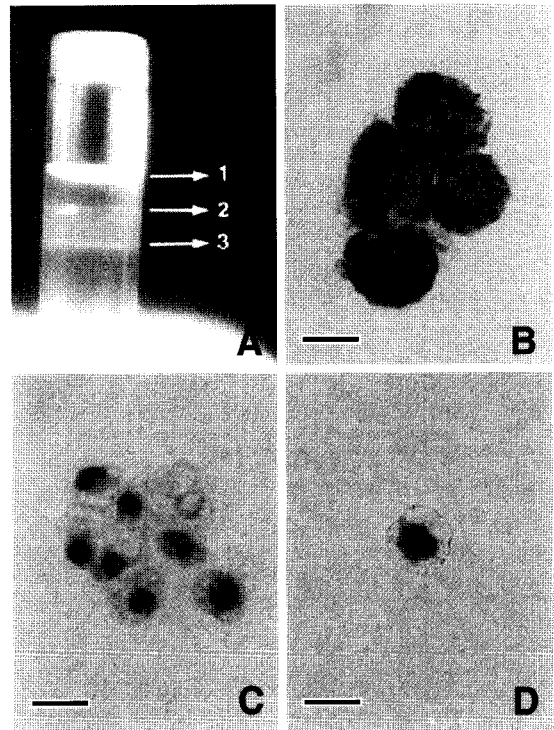
투과전자현미경 관찰을 위한 시료는 채취된 혈림프를 원심분리한 후, 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde (4°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, Karnovsky, 1965)와 1% OsO<sub>4</sub> (4°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)로 전 및 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 완충용액 (4°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 세척한 후, ethanol 농도 상승 순으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환하여 Poly/EM Bed-812 embedding medium으로 포매하였다.

포매된 조직은 먼저 ultramicrotome (LKB-2088)으로 준초박절편 (semi-thin section)을 제작한 다음, 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이어서 60~80 nm 두께의 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 JEOL 100 CX-II형 (Japan) 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

## 결 과

### 1. Percoll의 밀도구배를 이용한 혈구의 분리

혈구의 유형을 파악하기 위해 항응고 처리된 혈림프를 미리 제조된 60% percoll gradient를 통해 원심분리한 결과, 밀도구배에 의해서 모두 3개의 밴드가 관찰되었다 (Fig. 1A). 분리된 혈구밴드로부터 percoll의 성분을 제거하고 혈구들만을 추출하여 Wright-Giemsa 염색으로 관찰한 결과, 상층은 혈장 성분과 항응고제의 황색 침전물로 어떤 종류의 혈구도 관찰되지 않았다. 혈구는 중간층에서 80~90%의 과립혈구와 10~20%의 무과립혈구가 관찰되었으며 (Fig. 1B), 하층에서는 70~80%의 무과립혈구와 20~25%의 과립혈구, 그리고 탈피시기에만 볼 수 있는 5~10%의 탈피혈구가 함유되어 있었다 (Fig. 1C, D).



**Fig. 1.** Separation of hemocytes using percoll gradient. A: After centrifugation hemolymph and 60% percoll gradients mixture resulted in 3 bands. (upper; 1, middle; 2 base layers; 3). B: In the middle band, 80~90% granulocytes (GR) in total hemocyte counts group have observed. C: In the base band, 70~80% Hyaline leucocytes (HY) in total hemocyte counts group have observed. D: In the base band, about 5~10% molting hemocytes (MH) have observed. All scale bars indicate 10  $\mu$ m.

### 2. 순환혈구의 유형과 그 미세구조

산왕거미의 혈구는 세포질내 과립의 존재 유무를 기준으로 크게 과립혈구와 무과립혈구로 구분되었다. 이들은 다시 세포화학적 염색과 미세구조 특성을 기준으로 과립혈구의 경우, 산호성 과립혈구 (eosinophilic granulocytes)와 염기호성 과립혈구 (basophilic granulocytes), 그리고 혈색소혈구 (cyanocytes)로 구분되었고, 무과립혈구는 투명혈구 (hyaline leucocytes)와 편도혈구 (oenocytoids), 그리고 탈피시기에만 출현하는 탈피혈구 (molting hemocytes)로 구분되었다 (Table 1).

**Table 1.** Histochemical properties of various hemocytes during the molting period of the spider *Araneus ventricosus*

|                            | EGs | BGs  | CYs                  | HLs   | OE | MHs   |
|----------------------------|-----|------|----------------------|-------|----|-------|
| Wright-Giemsa              | Red | Blue | Deep purple or black | Clear | -  | Clear |
| Periodic acid Schiff (PAS) | +   | +    | -                    | +     | -  | +++   |
| Sudan black B              | -   | -    | -                    | -     | -  | -     |

EGs: eosinophilic granulocytes, BGs: basophilic granulocytes, CYs: cyanocytes, HLs: hyaline leucocytes, MHs: molting hemocytes, -: negative or no reaction, +: weak positive, ++: moderate positive, +++: strong positive reaction

### 1) 과립혈구 (Granulocytes)

산호성 과립혈구는 전체 혈구의 약 5~10%를 차지하는데, 구형 또는 난형으로 직경은 약 10~16 $\mu$ m 정도로 관찰되었다. 핵은 한쪽으로 치우쳐져 있고 세포질 전역에 산재해 있는 과립들은 직경이 0.2~0.3 $\mu$ m 인 비교적 소형의 구형과립들로 Wright-Giemsa 염색에 붉은색으로 강하게 염색되었다. 전자현미경 관찰에서 산호성 과립혈구는 염기호성 과립혈구의 과립에 비해 상대적으로 전자밀도가 높았으며 세포질 내에 유리 리보솜이 산재되어 있음이 관찰되었다 (Fig. 2A, B).

염기호성 과립혈구는 전체 혈구의 약 15~20%를 차지하였고, 세포질에 함유된 과립의 직경이 산호성 과립혈구에 비해 대형이며, Wright-Giemsa 염색에 푸른색으로 흐리게 염색되었다. 염기호성 과립혈구는 전자현미경 관찰에서 방추형, 또는 타원형으로 구분되는데, 방추형의 경우 장축의 길이는 최고 25 $\mu$ m에 달하며, 핵은 난형 또는 타원형으로 세포의 중앙에 위치하였다 (Fig. 2C, D). 세포질에는 타원형 또는 무정형 과립들이 산재되어 있는데, 원형질막을 따라 내세포작용에 의해 형성된 다양한 크기의 소포들도 확인되었다 (Fig. 2E, F). 타원형 혈구의 경우 장축의 길이는 약 12 $\mu$ m로 측정되었고 세포질 전역에 산재된 0.7~1.5 $\mu$ m 크기의 다양한 전자밀도를 지닌 과립들이 관찰되었다 (Fig. 2G). 또한 특히 탈피시기를 전후하여 과립의 전자밀도가 현저히 낮아지는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2H).

전체 혈구의 0.5% 미만으로 존재하는 혈색소혈구는

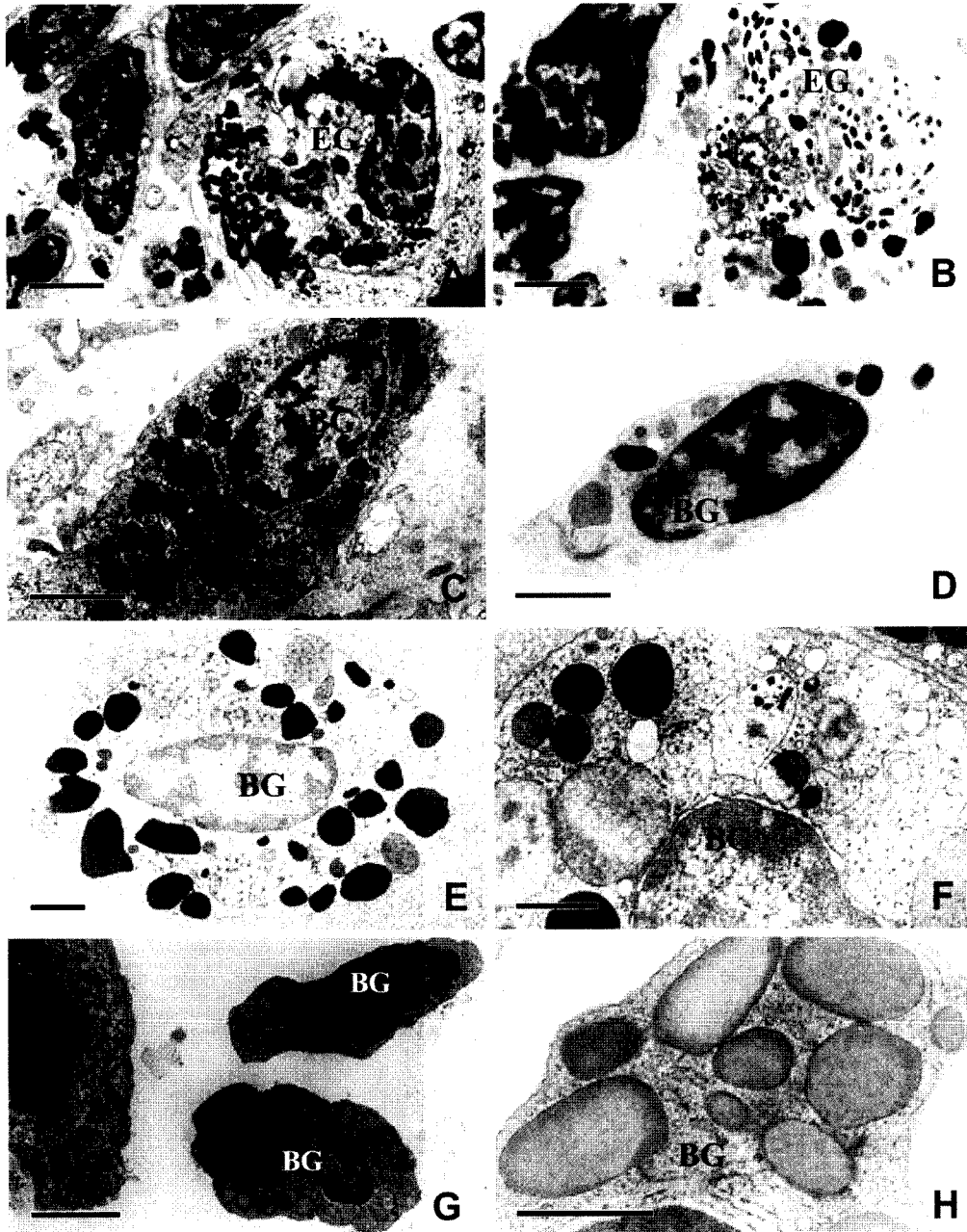
주로 난형이지만, 가끔 불규칙한 모양으로도 관찰되었다 (Fig. 3A). 세포질은 Wright-Giemsa 염색에 짙은 보라색으로 염색되어 중성을 나타내었다. 이들의 크기는 단축, 장축이 각각 12, 24 $\mu$ m로 순환혈구 중 가장 큰 혈구인 것으로 확인되었다. 세포질에는 세포소기관의 발달이 미약하였고, 다양한 크기의 소포들과 다량의 헤모시아닌 결정체들이 다발을 이루고 있음이 확인되었다 (Fig. 3B). 이들은 종단 단면에서 명대와 암대가 교대로 배열된 형태로 관찰되었으며, 횡단 단면에서는 직경이 약 150 nm이고 두께가 약 80 nm에 달하는 육각형의 격자구조로 관찰되었다 (Fig. 3C, D).

### 2) 무과립혈구 (Non-granulocytes)

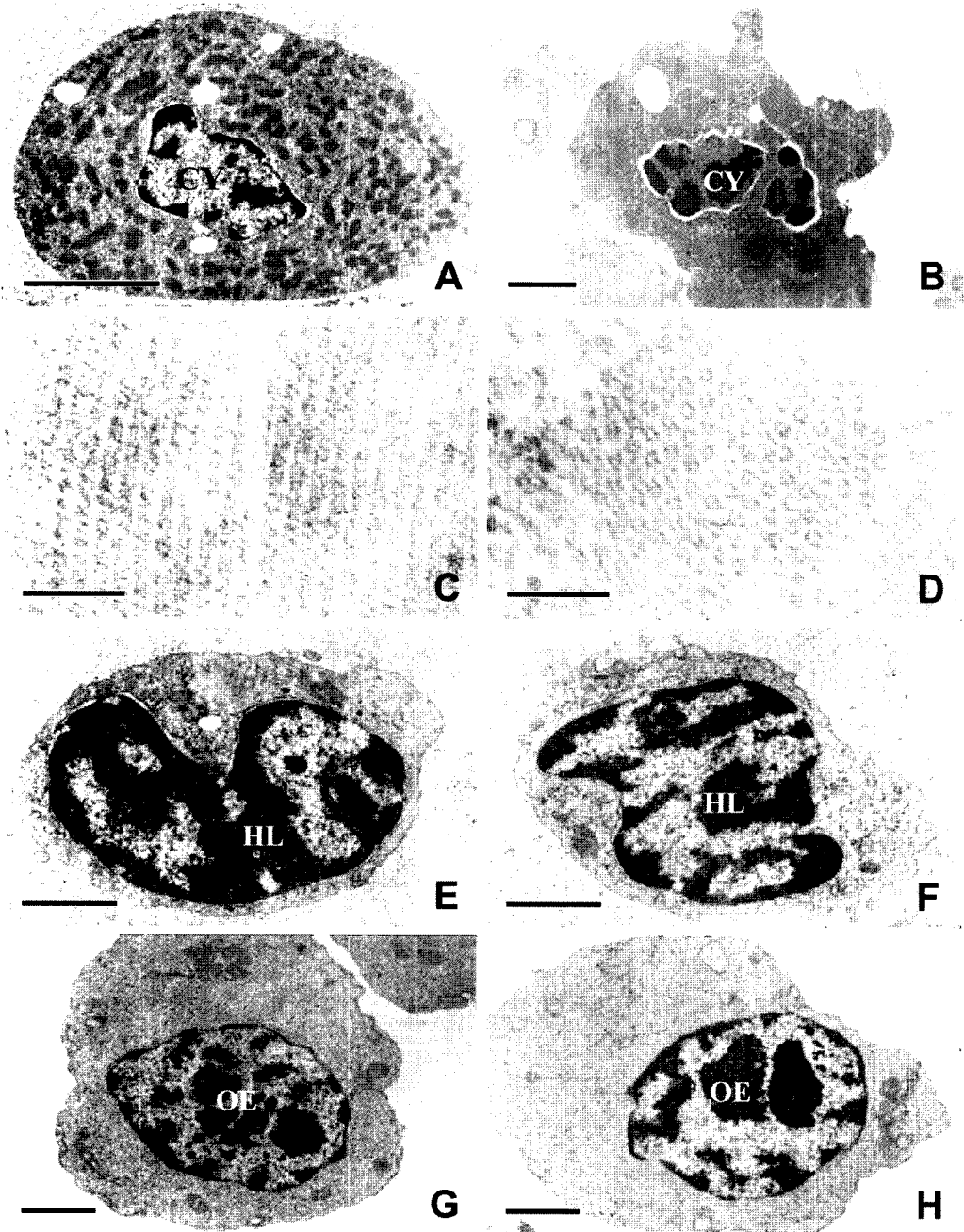
투명혈구는 전체 혈구의 약 70~80%를 차지하며, 평균 직경이 5~7 $\mu$ m인 구형 또는 타원형의 무과립혈구로 핵은 세포의 중앙부에 위치하였다. 핵이 전체 세포의 대부분을 차지할 정도로 세포질에 대한 핵의 비율이 높은 특징을 지니고 있었고, 세포질에는 특이 소견의 과립성분이 함유되어 있지 않아서 광학현미경하에서 세포질이 투명하게 관찰되었다. 전자현미경을 이용한 미세구조의 관찰에서 세포질 전역에 걸쳐 조면소포체와 유리 리보솜이 산재되어 있음이 확인되었고 세포의 가장자리를 따라 동심원상으로 배열된 미세소관 (marginal microtubules)도 관찰되었다 (Fig. 3E, F).

편도혈구는 혈림프에서 전체 혈구의 1% 미만으로 분포하지만, 거미의 심관 (heart tube) 내강에서는 약 70%의 비율로 존재하고 있음이 관찰되었다. 편도혈구는 세포의 직경이 10~15 $\mu$ m로 측정되었고, 평균 5 $\mu$ m 크기의 핵이 중앙부에서 관찰되었다. 특징적으로 핵에는 이질염색질 (heterochromatin)이 핵막을 따라 분포되어 있었고, 잘 발달된 인이 관찰되었다. 과립을 함유하지 않은 세포질에는 유리 리보솜이 산재되어 있었고, 신장된 미토콘드리아와 조면소포체 등이 관찰되었다 (Fig. 3G, H).

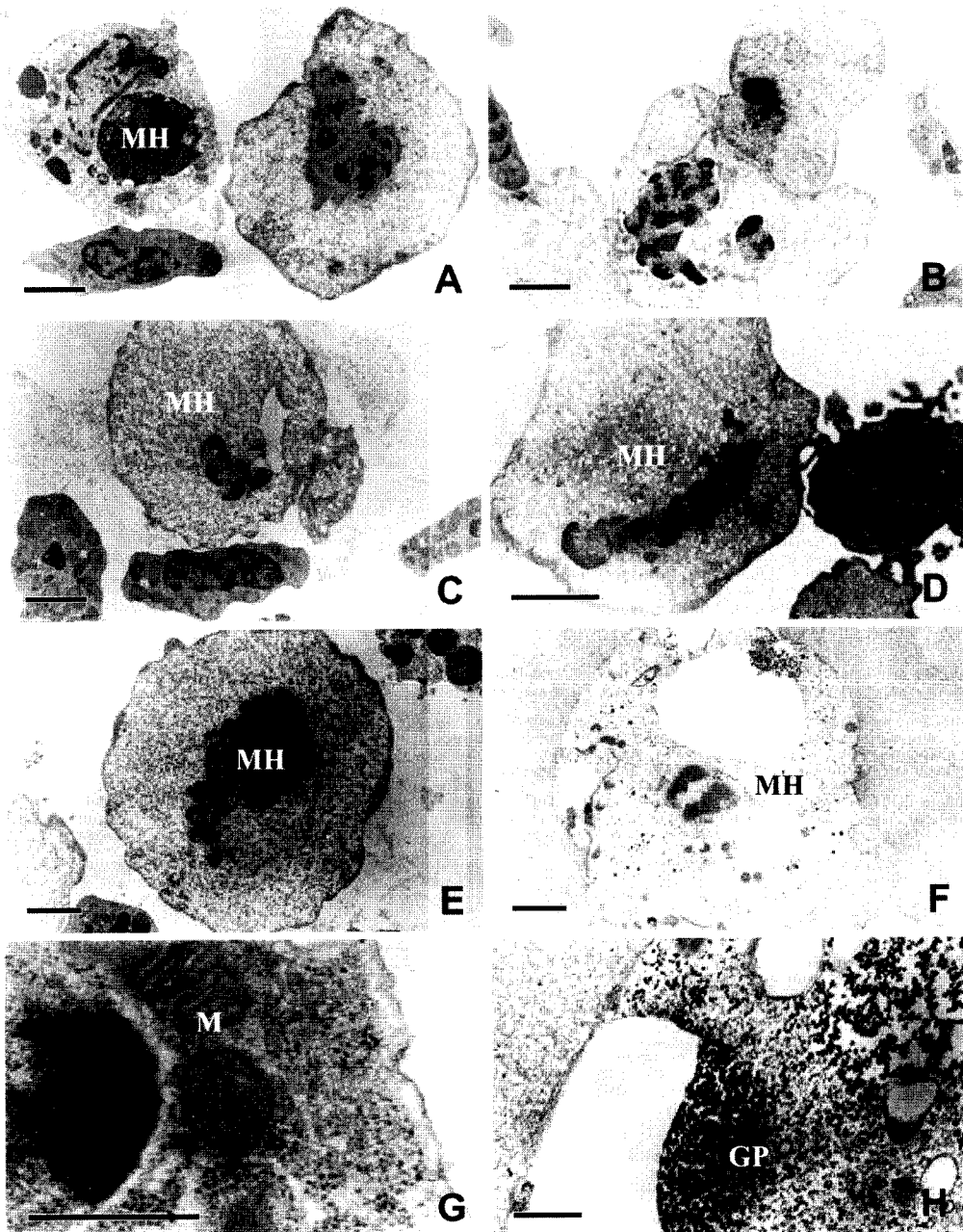
한편, 탈피혈구는 거미의 탈피를 전후한 시기에만 특징적으로 출현하는 대형의 구형 혈구로서 핵은 다른 혈구와 비슷한 크기 (5 $\mu$ m)이지만, 세포의 직경은 15~18 $\mu$ m에 달하는 대형의 세포임이 확인되었다 (Fig. 4A, B). 광학현미경하에서 세포질은 투명하게 관찰되었는데, 전자현미경을 이용한 미세구조 관찰에서



**Fig. 2.** A-B: Electron micrographs of eosinophilic granulocytes (EG) in the spider *A. ventricosus*. Most of the eosinophilic granulocytes have numerous small granules approximately  $0.3\ \mu\text{m}$  in diameter. Nucleus of each eosinophilic granulocyte appeared at the eccentric region of cytoplasm. C-D: The basophilic granulocytes (BG) have large granules with high electron densities approximately  $0.5\sim 1.5\ \mu\text{m}$  in diameter. They have well developed Golgi complexes and cytoplasmic projections. E-F: Some of the circulating basophilic granulocytes have granules with diverse electron densities. These hemocytes contain some of phagocytotic vesicles within the cytoplasm. 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 rough endoplasmic reticula are observed. Scale bars indicate  $2\ \mu\text{m}$  (A-E, G) and  $1\ \mu\text{m}$  (F, H), respectively.



**Fig. 3.** A-B: Electron micrographs of the cyanocytes (CY). The cyanocyte contains many hemocyanin crystals and few vacuoles within the cytoplasm. C-D: High magnification electron micrographs reveal the lattice sub-structure of the hemocyanin crystals with light and dark areas. E-F: Electron micrographs of the hyaline leucocyte (HL). The nucleus of the hyaline leucocyte is relatively larger in comparison with its cytoplasm. Microtubules, free ribosomes and well developed rough endoplasmic reticula are observed in the cytoplasm. G-H: Electron micrographs of the oenocytoid (OE). The oenocytoid contains cartwheel shaped nucleus and eccentric nucleolus. Each oenocytoid has rough endoplasmic reticulum and mitochondria within the cytoplasm. Scale bars indicate  $2\mu\text{m}$  (A, B, E-H) and  $0.1\mu\text{m}$  (C, D), respectively.



**Fig. 4.** Electron micrographs of the molting hemocytes. A-B, During the molting period, a characteristic molt-related hemocytes (MH) appeared in the circulating hemolymph. The molting hemocyte has a large volume of cytoplasm with normal sized nucleus. C-D, Nucleus of the molting hemocyte is located at the central region. In the cytoplasm of the molting hemocyte, only a few mitochondria can be seen near the nuclear membrane and plasma membrane. E-F, The molting hemocytes which contain small vacuoles also have free ribosomes, glycogen particles and pinocytotic vesicles along the plasma membrane. G-H, High magnification electron micrographs reveal mitochondria (M) and microtubules along the plasma membrane. On the 7th day after molting, numerous glycogen particles (GP) are accumulated near the edge of large vacuoles. Scale bars indicate 2  $\mu$ m (A-F), 0.5  $\mu$ m (G-H), respectively.

핵막과 원형질막 주위에 분포된 일부의 미토콘드리아만이 관찰될 뿐, 다른 세포소기관의 발달은 미약하였다(Fig. 4C, D).

과립을 함유하지 않은 세포질에는 전자밀도가 낮은 대형의 액포가 다수 형성되어 있음이 관찰되었고(Fig. 4E, F), 원형질막을 따라 배열된 미세소관도 확인되었다(Fig. 4G). 탈피혈구의 수는 탈피가 일어나기 약 3일 전부터 출현하기 시작하여 탈피시에 최고도에 도달하게 되며, 탈피 후 5일경부터 그 수가 급격히 감소하였다. 세포화학반응의 결과, 탈피 후 7일경 탈피혈구의 세포질 일부에서 PAS 양성반응이 관찰되었는데, 전자현미경 관찰에서 이 시기의 탈피혈구에 글리코겐 과립들이 액포의 가장자리에서 축적되어 있음이 확인되었다(Fig. 4H).

## 고 찰

본 실험에서 산왕거미의 혈구를 percoll의 밀도구배 원리를 이용하여 각 혈구의 집단을 분리하고, 보고된 혈구의 세포화학적(Fenoglio et al., 1993; Hernandez et al., 1999) 및 미세구조적 특성(Brehelin et al., 1978; Chang & Yoe, 1995)을 비교 분석한 결과, 세포질에 함유된 과립의 유무에 따라(Joshi & Lambdin, 1996) 과립혈구와 무과립혈구의 두 가지 유형으로 대별할 수 있었다. 과립혈구는 함유된 과립의 세포화학적 특성에 따라 다시 산호성 과립혈구(eosinophilic granulocytes), 염기호성 과립혈구(basophilic granulocytes), 혈색소혈구(cyanocytes)의 세 가지 유형으로 구분되었으며, 무과립혈구는 투명혈구(hyaline leucocytes)와 편도혈구(oenocytoids), 그리고 특이하게 탈피시에만 나타나는 탈피혈구(molting hemocytes)의 세 유형으로 세분되었다.

Percoll의 밀도구배(Renwrandt et al., 1986)를 이용하여 혈구를 분리한 결과, 상하층으로 분리된 두 개의 명확한 혈구밴드가 확인되었다. 상층은 혈구들의 응고 물질이 걸려있는 층으로 전체 혈구의 80~90%가 과립혈구들로 이루어져 있었으며, 하층에서는 무과립혈구들이 70~80%를 차지하고 있었다. 즉, 과립혈구는 무과립 혈구에 비해 상대적으로 밀도가 낮았으며, 밴

드의 두께로 볼 때 전체 혈구에서 무과립혈구가 차지하는 비율이 높음을 확인할 수 있었다.

과립혈구는 Wright-Giemsa 염색법에 의해 산성 과립은 산성염료인 eosin에 붉은색으로 염색되었고, 염기성 과립은 azure염료에 푸른색으로 염색되었으며, 중성 과립은 혼합색인 짙은 보라색 또는 검은색으로 염색되었다. 산호성 과립혈구에 함유된 세포질의 과립들은 구형 또는 타원형으로, 과립의 크기가 염기호성 과립혈구에 비해 작고 전자밀도는 높게 관찰되었다. 반면 염기호성 과립혈구에 함유된 대형의 과립들은 비교적 전자밀도가 낮았고, 보고된 바와 마찬가지로(Ravindranath, 1977), 혈구에 따라 밀도의 차이가 있는 것으로 확인되었다.

활동기의 거미 과립혈구에서는 세포질에 다수의 식포(phagosome)가 형성되어 있음이 관찰되는데, 이는 활발한 식균작용의 결과로 추정되며, 이는 거미의 과립혈구가 식균작용을 하는 면역혈구의 한 종류임을 확인할 수 있었다(Yakoo et al., 1995; Tojo et al., 2000; Lowenberger, 2001). 산호성 과립혈구는 조직화학반응의 결과, PAS 염색에 약한 양성반응을 보이는 과립들이 함유되어 있었고, 전자현미경 관찰에서 이차 라이소좀과 식세포작용을 짐작케 하는 식포가 세포질에 다수 형성되어 있었다. 반면, 염기호성 과립혈구는 탈피시에 과립의 전자밀도가 매우 낮은 상태로 변화하였으며, 혈구의 수도 탈피후 1일부터 7일까지 점진적으로 증가되었다.

일찍이 Deevey (1941)는 상처를 입거나 병든 거미에서 염기성 과립혈구의 수가 증가하는 현상을 관찰하고, 이들이 퇴화되는 조직이나 이물질을 제거하는 식균작용의 역할을 수행한다고 보고하였다. 또한, Browning (1942)도 탈피시 새로운 외골격이 형성되는 동안, 하피(hypodermis)에서 과립혈구들이 나타나고 세포질내 과립들의 특성이 산성에서 염기성으로 변하는 현상을 보고한 바 있다. 최근 Pech & Strand (1996, 2000)도 일련의 연구에서 과립혈구의 과립들이 분비됨으로써 encapsulation과 같은 혈구의 면역반응이 나타남을 관찰하였다. 본 연구에서도 역시 탈피시기중의 염기호성 과립혈구의 수가 증가함이 관찰되었는데, 염기호성 과립혈구는 세포질에 이차 라이소좀과 식포가 다수 형성되어 식세포 능력을 가진 면역혈구의 한 종



류임이 확인되었다 (Anggraeni & Ratcliffe, 1991; Lowenberger, 2001; Lavine & Strand, 2002). 또한, 탈피 시기동안 과립의 전자밀도가 낮아지는 점으로 미루어 탈피시 새로운 큐티클의 생성과정에도 관여할 것으로 사료된다.

혈색소혈구는 조직화학적 특성으로 미루어 중성의 과립을 함유한 혈구로 추정된다. 고배율의 전자현미경 상에서 세포질에 전형적인 단백질의 결정구조를 가진 물질들이 다수 함유되어 있음이 관찰되었는데, 이미 보고된 바 있는 헤모시아닌 결정체의 미세구조적 특성과 일치하는 것으로 확인되었다. Fahrenbach (1970)는 절지동물인 투구개 종류에서 푸른색을 띠는 혈색소 단백질을 함유한 혈구를 보고하였는데, 곤충의 편도혈구에 함유된 물질과 유사한 헤모시아닌 결정체인 것으로 밝혀졌다 (Paul, 1992). 거미의 혈색소혈구는 결정체가 과립의 형태로 세포질 속에 함유되어 있다는 특성으로 미루어 과립혈구의 한 종류로 구분되었으나, Gupta (1979)는 곤충의 혈색소혈구를 편도혈구의 발달된 형태로 추정할 바 있기 때문에 편도혈구와 혈색소혈구의 유연관계에 대한 해석은 좀 더 면밀한 검토가 필요할 것으로 생각된다.

무과립혈구의 대표적인 혈구 유형인 투명혈구는 정상시 전체 혈구유형 중 약 70~80%로 가장 많은 비율을 차지하며 혈구유형중 가장 작은 혈구로 관찰되었는데, Chase (1994)는 brilliant crecyl blue 염색에 비교적 세포질이 투명하게 보이며 세포의 유형중 가장 작은 혈구를 투명혈구로 분류하였으며 탈피시기중 탈피혈구의 증가와 상대적으로 전체 투명혈구의 수는 감소한다고 보고하였다. 본 실험에서도 유사한 결과가 나왔는데, 비탈피 시기에 전체 약 70~80%로 존재하는 투명혈구의 수가 탈피시기중 약 10% 미만까지 감소하였으나, 탈피혈구를 제외한 다른 혈구들의 수는 그다지 큰 변화를 보이지 않았다.

따라서 탈피시기에 투명혈구와 탈피혈구의 상대적인 증가와 감소는 투명혈구가 어떤 물질을 유입 또는 방출함으로써 탈피혈구로의 변화과정을 거칠 것으로 추정된다. 전자현미경으로 관찰한 투명혈구의 미세구조는 Sherman (1973), Pech & Strand (2000) 등에 의해 보고된 무정형혈구 (plasmacytes)와 유사한 특징을 가지고 있음이 확인되었는데, Deevey (1941)와 Seitz

(1976) 등도 탈피시기에 무정형혈구의 세포질에 커다란 공포가 생기면서 탈피혈구로 분화되었다가 탈피시기가 끝나면 다시 투명혈구로 된다고 보고한 바 있다.

편도혈구는 투명혈구보다 크기가 크며, 광학현미경으로 관찰하면 세포질이 약간 투명하게 보인다. 곤충의 경우 이 종류의 혈구가 관찰되지 않은 경우도 있으나 대부분의 경우 전체혈구의 약 1% 미만으로 존재하는 것으로 알려지고 있다 (Midttum & Jensen, 1978). 이 종류의 혈구들은 식균작용을 하지 않으며, 가장 큰 유형의 혈구이지만, *in vitro* 상에서 쉽게 용해되기 때문에 관찰하기 힘들다고 보고되었다 (Gupta, 1979). 산왕거미에서 관찰된 편도혈구의 수는 비탈피시기의 순환혈구에서 곤충과 유사하게 전체 약 1% 미만을 차지하고 있었지만, 심장의 내강에 분포된 근육층을 따라 밀집되어 있다는 최근의 보고 (Choi & Moon, 2003)로 미루어 또 다른 기능이 있을 것으로 추정되며, 이에 대한 보다 정밀한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Ahmad A: Free hemocytes in adult *Polistes hebraeus* Fabr. (Hymenoptera: Vespidae). *J Entomol Res* 12 : 28-35, 1988.
- Anggraeni T, Ratcliffe NA: Studies on cell-cell cooperation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 37 : 453-460, 1991.
- Bohn H: Differential adhesion of the haemocytes of *Leucophaea maderae* (Blattaria) to a glass surface. *J Insect Physiol* 23 : 185-194, 1977.
- 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 arica* (Araneae). *Proc Roy Soc London B* 131 : 65-86, 1942.
- Chain BM, Anderson RS: Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. *J Insect Physiol* 28 : 377-384, 1982a.
- Chain BM, Anderson RS: Observations on the cytochemistry of the hemocytes of an insect, *Galleria mellonella*. *J Histochem Cytochem* 31 : 601-607, 1982b.

- Chang BS, Yoe SM: Electron microscopic study on the hemocytes of the wolf spider, *Pardosa astrigera*. Kor J Electr Microsc 25 : 29-38, 1995. (Korean)
- Chase SF: Characterization of the hemolymph of the spider *Araneus cavaticus*: hemocytes and proteins. Thesis in Univ. of New Hampshire, USA, 1994.
- Choi JY, Moon MJ: Fine structure of the heart tube and its cardiac muscle cells in the spider, *Araneus ventricosus*. Kor J Electr Microsc 33 : 325-333, 2003. (Korean)
- 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.
- Fenoglio C, Bernardini P, Gervaso MV: Cytochemical characterization of the hemocytes of *Leucophaea maderae* (Diptera: Blaberoidea). J Morphol 218 : 115-126, 1993.
- Foelix RF: Biology of Spiders (2nd ed). pp. 52-67, Oxford Univ. Press, London, 1996.
- Groome JR, Townley MA, Detschaschell M, Tillinghast EK: Detection and isolation of proctolin-like immunoreactivity in arachnids: Possible cardioregulatory role for proctolin in the orb-weaving spiders *Argiope* and *Araneus*. J Insect Physiol 37 : 9-19, 1991.
- Gupta AP: Hemocyte types: their structures, synonymies interrelationships, and taxonomic significance. In: Gupta AP, ed, Insect Hemocytes, pp. 85-127, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1979.
- Gupta AP: Cellular elements in hemolymph. In: Kerkut GA, Gilbert LI, eds, Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, vol 3, pp. 401-451, Pergamon Press, Oxford, 1985.
- 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.
- Joshi PA, Lambdin PL: The ultrastructure of hemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye. Protoplasma 192 : 199-216, 1996.
- Karnovsky MJ: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27 : 137-138, 1965.
- Lavine MD, Strand MR: Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 32 : 1295-1309, 2002.
- Lowenberger C: Innate immune response of *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol 31 : 219-229, 2001.
- Midttun B, Jensen H: Ultrastructure of oenocytoids from two spiders, *Pisaura mirabilis* and *Trochosa terricola* (Araneae). Acta Zool 59 : 157-167, 1978.
- Paul RJ: La respiration des arachnides. La Recherche 226 : 1338-1357, 1990.
- Peake PW: Isolation and characterization of the haemocytes of *Calliphora vicina* on density gradients of Ficoll. J Insect Physiol 25 : 795-803, 1979.
- 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: Plasmatocytes from the moth *Pseudaugma includens* induce apoptosis of granular cells. J Insect Physiol 46 : 1565-1573, 2000.
- Ravindranath MH: A comparative study of the morphology and behaviour of granular haemocytes of arthropods. Cytologia 42 : 743-751, 1977.
- Renwranz LR, Mead GP, Ratcliffe NA: The separation of insect haemocyte types on percoll gradients: methodology and problems. J Insect Physiol 32 : 167-177, 1986.
- Seitz KA: Zur Feinstruktur der häutungshä mo cyten von *Cupiennius salei* keys (Araneae: Ctenidae). Zool Jb Anat Bd 96 : 280-292, 1976.
- Sherman RG: Ultrastructurally different hemocytes in a spider. Can J Zool 51 : 1155-1165, 1973.
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S: Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J Insect Physiol 46 : 1129-1135, 2000.
- 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.

#### < 국문초록 >

산왕거미 (*Araneus ventricosus*) 혈구의 유형을 세포화학적 및 percoll 밀도구배를 이용한 물리화학적 특성에 따라 구분하고, 각각의 미세구조를 고배율의 전자현미경으로 비교 관찰하였다. 혈구는 세포질에 함유된 과립의 유무에

따라 과립혈구와 무과립혈구로 구분되었으며, 과립혈구는 과립의 특성에 따라 다시 산호성 과립혈구와 염기호성 과립혈구, 그리고 헤모시아닌 과립을 함유한 혈색소혈구의 세 가지 유형으로 세분되었다. 산호성 과립혈구는 전체 혈구유형중 약 5% 정도를 차지하였으며, 염기호성 과

립혈구는 산호성 과립혈구에 비해 과립의 크기가 크고 구형이었다. 한편 무과립혈구는 혈구중 가장 크기가 작은 투명혈구와 심관의 내강에 주로 분포하는 편도혈구, 그리고 탈피 시에만 출현하는 대형의 탈피혈구로 다시 세분되었다.