멍게(*Halocynthia roretzi*) 혈구의 종류와 미세구조

신윤경 · 전제천 · 손맹현 · 김혜진¹ · 이정식^{1*}

국립수산과학원 전략양식연구소 양식관리과, ¹전남대학교 수산생명의학과

Classification and Ultrastructure of Hemocytes in the Tunicate *Halocynthia roretzi* (Ascidiacea: Pyuridae)

Yun Kyung Shin, Je Cheon Jun, Maeng Hyun Son, Hyejin Kim¹ and Jung Sick Lee^{1*}

Aquaculture Management Division, Aquaculture Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute,
Busan 619-902, Korea

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

The hemocytes of the tunicate *Halocynthia roretzi* are classified into six types based on their size, cellular form, and fine structure of the cytoplasmic granules: hyalinocytes, granulocytes, phagocytes, nephrocytes, morula cells, and multi-vacuole cells. Based on cell size, they are ordered multi-vacuole cells (7.5 μ m)>nephrocytes (7.1 μ m)>phagocytes (6.8 μ m)>granulocytes (6.1 μ m)>morula cells (5.7 μ m)>hyalinocytes (5.4 μ m). The proportion of hemocytes is ranked in the order multi-vacuole cells (54.8%)>nephrocytes (16.9%)>granulocytes (9.9%)>morula cells (8.8%)>phagocytes (6.1%)>hyalinocytes (3.5%).

Key words: *Halocynthia roretzi*, Hemocytes, Ultrastructure

서 론

해초강(Ascidiacea)은 미색동물아문(Urochordata)에 속하는 원시 척삭동물의 한 무리로서 주로 해양성이며, 대부분 성체시기에는 고착생활을 한다. 해초강의 혈구에 관해서는 이들의 면역, 무성생식 또는 유성생식, 중금속 축적 및 효소학적 기능에 관한 다양한 연구들이 수행되었다(Burighel et al., 1983; Hirose et al., 1991, 1998; Azumi et al., 1993; Manni et al., 1994; Dan-Sohkawa et al., 1995; Abe et al., 1999; Ballarin et al., 2001; Cima et al., 2001; Choi et al., 2010; Cha et al., 2011). 해초강의 혈구종류는 종에 따라 다소 차이가 있으나 형태 및 기능에 따라 5-9 종류가 보고되었다(Burighel and Cloney, 1997). 하지만, 해초강의 혈구는 관찰 방법, 혈구 분화과정의 중간단계 해석 및 생리학적 현상의 해석 차이 등에 의해 명확히 구분하기 어렵다(Hirose et al., 2003).

한국에서 해초강 멍게과(Pyuridae)에는 5속(*Boltenia*, *Halocynthia*, *Herdmania*, *Microcomus*, *Pyura*) 16종이 보고되었다(KSSZ, 1997). 이 가운데 멍게(*Halocynthia roretzi*)는 수온이 낮고 조류 소동이 원활한 바위 등의 단단한 기질에 부착하

여 서식하는 해양고착성 종으로 체 표면이 두꺼운 껍질(피낭)로 감싸져 있어 피낭류라고도 한다. 또한 멍게는 식용으로 산업적으로 매우 중요하게 이용되는 종이지만, 최근 이들의 물렁증 증가에 의한 사망률이 높아짐에 따라 산업적으로 커다란 손실을 초래하고 있다(Shin et al., 2011). 멍게의 물렁증 원인과 반응에 관해서는 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 혈액 면역학적인 측면의 연구 또한 필요한 실정이지만, 아직 멍게 혈구의 종류 및 형태학적 자료는 명확하지 않다. 따라서 본 연구에서는 멍게의 혈구종류, 미세구조 및 혈구 종류별 구성비를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

연구에 사용된 멍게는 대한민국 남해안 통영시 한산만 연안에서 채집한 개체들이다. 채집된 재료는 버니어캘리퍼스와 전자저울을 이용하여 측정형질을 계측하였다. 본 연구에 사용된 개체들의 크기는 체고 10 cm 내외의 성체였다.

혈구는 2 mL 1회용 주사기로 체강액을 추출하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde

Article history;

Received 13 August 2012; Revised 9 October 2012; Accepted 10 October 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7172 Fax: +82.61.659.7172

E-mail address: ljs@chonnam.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(5) 480-485, October 2012

http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0480

pISSN:0374-8111

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

용액으로 1시간 동안 전고정한 후, 1,000 rpm으로 5분간 원심 분리 하여 혈구 pellet을 제작하였다.

광학현미경 용 시료는 aqueous Bouin's fluid에 혈구 pellet을 6시간 동안 재 고정하고, 24시간 동안 수세하였다. 그 후 단계별 ethanol 탈수과정을 거쳐 paraplast (McCormick, USA)에 포매하였다. 포매된 시료는 microtome (RM2235, Leica, Germany)을 이용하여 두께 4-6 μm 의 조직표본을 제작하여 Masson 삼중염색을 시행하였다.

투과전자현미경(TEM) 조직표본 제작은 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액으로 12시간 동안 전고정하였으며, 1% osmium tetroxide (OsO_4) (Sigma)로 1-2시간 동안 후고정한 다음 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5)로 세척하고 ethanol로 단계별 탈수하였다. 이후 TEM 관찰하기 위해 에폭시 수지(epoxy resin)로 포매하고, 1-0.5 μm 두께의 semithin section을 만든 다음 toluidine blue로 염색하여 관찰하였다. 그리고 두께 70 nm의 ultrathin section을 제작하여 TEM (JEM-1200EXII, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

혈구의 종류별 분포율은 Image analyzer (IMT-VT Image analysis, IMT Inc., USA)를 이용하여 분석하였다. Image analyzer로부터 얻어진 자료는 Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)을 이용하여 통계분석을 실시하였다.

결 과

혈구의 종류 및 미세구조

파라핀 절편법으로 제작된 조직표본에서는 여러 가지 형태의 혈구들이 관찰되었으나 핵과 일부 과립을 제외하고는 이들 혈구의 종류를 세부적으로 구분하기 어려웠다(Fig. 1-1A). 하

지만 semithin section 표본(Fig. 1-1B)과 투과전자현미경 표본 관찰 결과, 세포의 크기와 형태 및 세포질 과립의 특징 등에 따라 멍게의 혈구는 여섯 종류(hyalinocyte, granulocyte, phagocyte, nephrocyte, morula cell, multi-vacuole cell)가 구분되었다(Fig. 2).

Hyalinocyte

이들은 장경 약 5.4 μm 크기의 원형으로 여섯 종류의 혈구 가운데 가장 작았다. 핵은 직경 약 2.4 μm 의 원형으로 핵막 주변과 핵질 가운데 일부에서 이형염색질이 발달되어 있었다. 핵 주변의 세포질에서는 다수의 발달된 조면소포체들이 관찰되었으며, 관상의 발달된 미토콘드리아와 골기체 및 소수의 용해소체와 글리코겐과립들이 세포질에 산재되어 있었다(Fig. 2-2A).

Granulocyte

이들은 장경 약 6.1 μm 크기의 타원형이었다. 핵은 직경 약 2.2 μm 크기의 원형으로 세포의 중심에 위치하며, 핵막 주변과 핵질 가운데 일부에서 이형염색질이 발달되어 있었다. 세포질에는 전자밀도가 높고 크기가 다양한(직경 0.2~0.3 μm) 막을 가진 원형의 과립들과 용해소체들이 존재하고 있었으며, 미토콘드리아와 글리코겐과립 그리고 소수의 조면소포체들이 관찰되었다(Fig. 2-2B).

Phagocyte

약간 타원형으로 장경 약 6.8 μm 크기였다. 핵은 직경 약 1.8 μm 크기로 세포의 중앙에 위치하며, 핵막 주변과 핵질에 전자밀도가 높은 이형염색질이 발달되어 있었다. 세포질의 전자밀

Fig. 1. Photomicrographs of hemocytes in *Halocynthia roretzi*. 1A, paraffin section. Masson trichrome stain; 1B, semithin section. Toluidine blue stain; A, hyalinocyte; B, granulocyte; C, phagocyte; D, nephrocyte; E, morula cell; F, multi-vacuole cell; N, nucleus.

Fig. 2. Transmission electron micrographs of hemocytes in *Halocynthia roretzi*. 2A, hyalinocyte; 2B, granulocyte; 2C, phagocyte; 2D, nephrocyte; 2E, morula cell; 2F, multi-vacuole cell; G, granule; Gc, Golgi complex; Lv, large vacuole; Ly, lysosome; Mt, mitochondrion; N, nucleus; Ph, phagosome; rER, rough endoplasmic reticulum; Sv, small vacuole; V, vacuole.

도는 hyalinocyte와 granulocyte에 비해 전체적으로 낮은 편이며, 세포질에서는 직경 0.1 μm 내외의 다수의 공포들과 발달단계가 다른 식포(phagosome)들이 존재하고 있었다(Fig. 2-2C).

Nephrocyte

직경 약 $7.1\ \mu\text{m}$ 의 원형으로 여섯 종류의 혈구 가운데 두 번째로 크다. 세포의 한 쪽 측면에 장경 약 $2.2\ \mu\text{m}$ 의 타원형 핵이 존재하고 있었다. 핵질의 대부분은 전자밀도가 다소 높은 이형염색질이 차지하고 있었다. 핵 주변부의 세포질 일부는 발달된 미토콘드리아들이 차지하고 있으나 세포질 대부분은 $1-2\ \mu\text{m}$ 크기의 전자밀도가 낮은 다수의 대형 공포들이 차지하고 있었으며, 이들 대형 공포의 내부에는 다각형 또는 모래시계 형태의 소형 과립들이 존재한다. 이들 소형 과립의 특징은 외부 막은 전자밀도가 높지만 내부는 전자밀도가 낮아 거의 투명하다 (Fig. 2-2D).

Morula cell

직경 약 $5.7\ \mu\text{m}$ 크기의 원형이며, 핵은 직경 약 $1.2\ \mu\text{m}$ 크기로 세포의 중앙에 위치하며 핵질에는 전자밀도가 높은 이형염색질이 과립상으로 고르게 분포하고 있었다. 세포질에는 원형으로 전자밀도가 높은 직경 약 $1.8\ \mu\text{m}$ 크기의 대형 과립들이 존재하고 있었는데, 이들 과립들은 세포질의 대부분을 차지하고 있었다. 과립들은 중심부와 주변부로 구분되는데 중심부는 전자밀도가 높은 균질상의 물질들로 구성되며, 주변부는 섬유상의 물질이 중심부를 감싸고 있는 형태였다 (Fig. 2-2E).

Multi-vacuole cell

장경 약 $7.5\ \mu\text{m}$, 단경 약 $5\ \mu\text{m}$ 의 타원형으로 여섯 종류의 혈구 가운데 가장 크다. 세포질의 대부분은 직경 $0.1\ \mu\text{m}$ 내외의 소형 공포와 직경 $1.5\ \mu\text{m}$ 내외의 불규칙한 형태의 공포들이 차지하고 있었다. 공포를 제외한 세포질의 전자밀도는 여섯 종류의 혈구 가운데 가장 높고 균질하였다 (Fig. 2-2F).

혈구의 종류별 구성비

멍게의 체액에서 확인된 여섯 종류 혈구들의 구성비는 multi-vacuole cell이 54.8%로 가장 높았으며, nephrocyte (16.9%) > granulocyte (9.9%) > morula cell (8.8%) > phagocyte (6.1%) > hyalinocyte (3.5%) 순이었다 (Fig. 3).

고 찰

원시 척색동물 가운데 하나인 미색동물아문 해초강의 혈구들은 분류군에 따라 매우 다양한 종류들이 보고되고 있다. 본 연구의 재료로 이용된 멍게는 멍게과(Pyuridae)의 한 종으로 판명게과(Botryllidae), 미더덕과(Styelidae) 및 가죽멍게과(Molgulidae)와 함께 측성해초목(Pleurogona)에 속한다(KSSZ, 1997). 해초강 무리의 혈구 구조에 관한 연구는 주로 판명게과에서 수행되어왔다. 판명게과에 속하는 *Botryllus schlosseri*의 혈구는 hemoblast, granulocyte, macrophage, morula

Fig. 3. Compositional ratio of hemocytes in *Halocynthia roretzi*.

cell, nephrocyte (Milanesi and Burighel, 1978) 및 pigment cell (Burighel et al., 1983)이 구분되었다. 또한, 판명게과의 *Botryllus* 5종(*B. primigenus*, *B. scalaris*, *B. schlosseri*, *B. delicatus*, *B. sexiens*)과 *Botrylloides* 4종(*B. simodensis*, *B. lentus*, *B. fuscus*, *B. violaceus*)을 대상으로 전자현미경적 미세구조 연구결과, 공통적인 다섯 종류(hemoblast, phagocyte, granulocyte, morula cell, pigment cell)의 혈구가 기재되었다 (Hirose et al., 2003). 본 연구에서 멍게의 혈구는 세포의 크기와 형태 및 세포질 과립의 특징 등에 따라 hyalinocyte, granulocyte, phagocyte, nephrocyte, morula cell, multi-vacuole cell의 여섯 종류가 구분되었다.

판명게과에서 보고된 혈구들의 미세구조적 특징은 hemoblast는 소형 혈구로서 핵/세포질의 비율이 높다. 핵은 직경 약 $3-4\ \mu\text{m}$ 의 원형이며, 인은 뚜렷하다. 세포질에는 여러 종류의 세포소기관들과 과립들이 발달하여 있으나 공포의 발달 정도는 매우 낮다(Milanesi and Burighel, 1978; Hirose et al., 2003).

Phagocyte는 식포(phagosome)와 위족(pseudopodia)을 가지는데, 식포의 크기와 수는 다양하다. 다수의 음소포를 가지며 세포질은 균질화 된 편이며, 골기체와 조면소포체 및 리보솜이 발달되어 있다(Milanesi and Burighel, 1978; Cima et al., 2001; Hirose et al., 2003). 멍게의 phagocyte에서도 발달 정도는 낮지만, 다수의 공포들과 발달단계가 다른 식포, 위족 및 음소포들이 관찰되었다.

Hyalinocyte는 *Botrylloides leachi*에서 기재되었는데, 이들 세포의 크기는 직경 $6-12\ \mu\text{m}$ 로 대형이다. 핵은 원형으로 인을 가지지 않으며, 핵막주변의 핵질에는 이형염색질들이 잘 발달되어 있다. 세포질에는 직경 약 $200\ \text{nm}$ 의 과립들이 다수 존재하며, 전자밀도가 높은 용해소체들을 함유한다(Cima et al., 2001). 멍게에서 hyalinocyte는 이들에 비해 크기가 장경 약 $5.4\ \mu\text{m}$ 로 소형이었으나 투과전자현미경적 미세구조는 유사하였다.

Granulocyte는 다수의 원형 또는 장방형의 과립을 가지지만, 이들 과립의 크기와 형태는 종에 따라 다소 차이가 있다. 과립의 크기는 *Botryllus primigenus*에서는 직경 약 $0.4\ \mu\text{m}$ 로 가

장 작았으며, *Botrylloides lentus*에서는 직경 약 1.8 μm 로 가장 컸다(Hirose et al., 2003). 멍게의 granulocyte의 과립의 크기는 직경 약 0.2-0.3 μm 로 판명계과에 속하는 종들에 비해 작은 편이었는데, 이러한 과립 크기의 차이는 종에 따른 차이로 판단된다.

Morula cell은 전자밀도가 높은 물질들로 채워진 다수의 액포를 함유하는데, 이들의 크기와 수는 동일종에서도 차이가 있다(Hirose et al., 2003). *Botryllus schlosseri*의 morula cell에서 이들 액포는 phenoloxidase와 quinone을 함유한다(Ballarin et al., 2001; Frizzo et al., 2000). 본 연구 결과, 멍게의 morula cell 역시 유사한 투과전자현미경적 특징을 보였으나 이들의 액포 성분에 관해서는 명확한 정보가 없으므로 추후의 연구가 필요하다.

Pigment cell은 위족을 가지지 않는 원형세포이다. 이들은 하나 또는 소수의 커다란 액포를 가지며, 핵은 세포질의 주변부에 위치한다. 액포는 막을 가지지 않는 다수의 색소과립들을 함유한다. 색소과립들의 크기와 형태는 다양하며, 단독으로 산재되어 분포한다. *Botrylloides leachi*에서 이들 세포의 크기는 직경 15-30 μm 로 대형이다(Cima et al., 2001; Hirose et al., 2003).

Nephrocyte는 pigment cell과 미세구조상 매우 유사한 형태이다. *Botrylloides leachi*에서 이들의 크기는 직경 10-20 μm 로 pigment cell보다 소형이지만, *Botryllus schlosseri*에서는 직경 15-40 μm 로 대형이다. 그리고 대형 액포 내의 과립들은 모래시계 형태이며, 외부는 전자밀도가 높지만, 내부는 거의 투명한 상태이다(Milanesi and Burighel, 1978; Cima et al., 2001; Hirose et al., 2003). 멍게에서 nephrocyte는 직경 약 7.1 μm 의 원형으로 판명계과의 이들 보다 소형이지만, 세포질에서 확인된 대형의 액포와 소형 과립의 미세구조는 유사하였다.

*Botrylloides leachi*에서는 아홉 종류의 혈구(hyaline amoebocyte, macrophage-like cell, granular amoebocyte, morula cell, compartment amoebocyte, compartment cell, granular cell, pigment cell, nephrocyte)가 기재되었다(Cima et al., 2001). Hemoblast는 최소한 다음과 같은 다섯 가지의 분화경로 및 고유기능을 가진다. 1) phagocytic line (hyaline amoebocyte, macrophage-like cell)으로 가수분해효소를 함유하며 렉틴 결합기능, 2) cytotoxic line (granular amoebocyte, morula cell)으로 산화효소 및 polyphenolic 효소 함유, 3) vacuolated cell line (pigment cell, nephrocyte)으로 대사물질 저장, 4) compartment cell line (compartment amoebocyte, compartment cell)으로 백혈구응집, 5) granular cell line (granular cell)으로 주로 장상피에 침윤 기능을 가진다(Cima et al., 2001).

본 연구에서 멍게의 혈구의 크기는 대부분 판명계과의 혈구들 보다 소형이었으며, 종류에 따른 구성비는 vacuolated cell line에 해당하는 multi-vacuole cell과 nephrocyte가 전체의 약

70% 이상을 차지하였는데 이와 같은 결과는 멍게의 활성적인 대사를 의미하는 것 같다. 아울러 멍게는 판명계과에 속하는 종들에 비해 보다 두꺼운 피낭을 가지면서도 크기가 대형인 점도 이러한 특징과 연관이 있을 것으로 추측된다.

사 사

이 연구는 국립수산물과학원 수산시험연구사업 '양식생물(멍게) 환경내성 범위 및 폐사메커니즘 구명 연구'의 지원(RP-2012-AQ-73)에 의해 운영되었습니다.

참고문헌

- Abe Y, Ishikawa G, Satoh H, Azumi K and Yokosawa H. 1999. Primary structure and function of superoxide dismutase from the ascidian *Halocynthia roretzi*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 122, 321-326.
- Azumi K, Satoh N and Yokosawa H. 1993. Functional and structural characterization of hemocytes of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. J Exp Zool 265, 309-316.
- Ballarin L, Franchini A, Ottaviani E and Sabbadin A. 2001. Morula cells as the major immunomodulatory hemocytes in ascidians: Evidences from the colonial species *Botryllus schlosseri*. Biol Bull 201, 59-64.
- Burighel P and Cloney RA. 1997. Urochordata: Ascidiacea. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol. 15, Hemichordata, Chaetognatha, and the Invertebrate Chordates. Harrison FW and Ruppert EE, eds. Wiley-Liss, New York, USA, 221-347.
- Burighel P, Milanesi C and Sabbadin A. 1983. Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. II. Pigment cells. Acta Zool 64, 15-23.
- Cha IS, Castillo CS, Nho SW, Hikima J, Aoki T and Jung TS. 2011. Innate immune response in the hemolymph of an ascidian, *Halocynthia roretzi*, showing soft tunic syndrome, using label-free quantitative proteomics. Dev Comp Immunol 35, 809-816.
- Choi DL, Lee NS, Kim MS, Seo JS, Park MA, Kim JW and Hwang JY. 2010. Flow cytometry analysis of softness syndrome effects on hemocytes of the tunicate *Halocynthia roretzi*. Aquaculture 309, 25-30.
- Cima F, Perin A, Burighel P and Ballarin L. 2001. Morpho-functional characterization of haemocytes of the compound ascidian *Botrylloides leachi* (Tunicata, Ascidiacea). Acta Zool 82, 261-274.
- Dan-Sohkawa M, Morimoto M, Mishima H and Kaneko H. 1995. Characterization of coelomocytes of the ascidian *Halocynthia roretzi* based on phase-contrast, time lapse video and scanning electron microscopic observation. Zool Sci 12, 289-301.
- Frizzo A, Guidolin L, Ballarin L, Baldan B and Sabbadin A. 2000. immunolocalization of phenoloxidase in vacuoles of the

- compound ascidian *Botryllus schlosseri* morula cells. Ital J Zool 67, 273-276.
- Hirose E, Saito Y and Watanabe H. 1991. Tunic cell morphology and classification in botryllid ascidians. Zool Sci 8, 951-958.
- Hirose E, Yoshida T, Akiyama T, Ito S and Iwanami Y. 1998. Pigment cells representing polychromatic colony color in *Botrylloides simodensis* (Asciacea, Urochordata): Cell morphology and pigment substances. Zool Sci 15, 489-497.
- Hirose E, Shirai M and Saito Y. 2003. Ultrastructures and classification of circulating hemocytes in 9 botryllid ascidians (Chordata: Asciacea). Zool Sci 20, 647-656.
- KSSZ (Korean Society of Systematic Zoology). 1997. List of Animals in Korea (excluding insects). Academy press, Seoul, Korea, 489.
- Manni L, Zaniolo G and Burighel P. 1994. Ultrastructural study of oogenesis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri* (Tunicata). Acta Zool 75, 101-112.
- Milanesi C and Burighel P. 1978. Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I. Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte. Acta Zool 59, 135-147.
- Shin YK, Jun JC, Kim EO and Hur YB. 2011. Physiological changes and energy budget of the sea squirt *Halocynthia roretzi* from Tongyeong, south coast of Korea. Kor J Fish Aquat Sci 44, 366-371.