

行政院國家科學委員會專題研究計劃進度報告

比較自然及注射感染縮小包膜條蟲之美洲蟑螂與寄生蟲之關係

Comparative study on host-parasite relationship of natural and inoculated infection to the cockroach, *Periplaneta americana*, infected with *Hymenolepis diminuta*

計劃編號：92-2320-B-040-017

執行期限：2003-01-01~2003-07-31

主持人：賴世展

執行機構及單位名稱：中山醫學大學寄生蟲學科

壹、中文摘要

血球在對抗病原及寄生蟲進入無脊椎動物宿主血腔扮演重要的角色。本研究美洲蟑螂 (*Periplaneta americana*) 經口自然食入縮小包膜條蟲 (*Hymenolepis diminuta*) 蟲卵，蟑螂並不會產生包囊作用，而人為注射縮小包膜條蟲蟲卵感染美洲蟑螂則會引起包囊作用。利用 Zymography 分析結果顯示注射蟲卵 6 小時及 24 小時出現分子量 65 kDa 的 gelatinase 酵素活性與包囊作用的過程呈正相關，酵素抑制試驗結果顯示，分子量 65 kDa 的 gelatinase bands 可被 cysteine proteinase 抑制劑 leupeptin 抑制，而二價陽離子螯合劑 EDTA、serine proteinase 抑制劑 PMSF 及

metalloproteinase 抑制劑

phenanthroline 並不影響此酵素活

性。因此確認此 65 kDa 的 gelatinase 為 cysteine proteinase 類的酵素。此酵素的活性與包囊作用的形成呈正相關，此結果顯示分子量 65 kDa 的 cysteine proteinase 可能與蟑螂對縮小包膜條蟲蟲卵的包囊作用相關。本研究在病媒生物學上是一個重要的進展，瞭解縮小包膜條蟲與宿主專一性的問題。

關鍵詞：蟑螂、美洲蟑螂、縮小包膜條蟲、免疫反應、血球

貳、英文摘要

Haemocytes play an essential role in

defending invertebrates against pathogens and parasites that enter their haemocoel. In the present study, the cockroach, *Periplaneta americana* were not encapsulated the *Hymenolepis diminuta* eggs. However, the *H. diminuta* eggs can be encapsulate within 24 h after injection. Proteolytic activity of extracts was determined by using gelatinase zymography. This gelatinase has a molecular weight about 65 kDa, Ca²⁺ dependency, and produced maximal activity in the pH range of 6-8. Enzyme activity was obviously inhibited by leupeptin; however, This study is important advancements in vector biology. The aim is to understand the host-specificity of this parasite and *P. americana*.

KEY WORD : *Periplaneta americana* ;
Hymenolepis diminuta ; encapsulation ;
cysteine proteinase

貳、研究之背景及目的

一、昆蟲免疫反應

在生物醫學的領域中，蟑螂為重要的病媒，更是公共衛生上的重要害蟲。蟑螂與人們的生活非常的接近，它們喜歡出沒

於垃圾堆、糞坑、廁所及排水溝等不衛生的地方，它們經常利用夜深人靜時侵入住家廚房、餐廳覓食，爬遍人類的食物及餐具，將病原帶到食物及餐具上。他們可以藉由機械及生物的方式來傳播細菌、病毒、原蟲及蠕蟲(Mimiollu and Sahin, 1976)。在自然界採集的蟑螂體表及糞便中發現許多種寄生蟲，線蟲類寄生蟲主要有短小包膜條蟲(*Hymenolepis nana*)、牛肉條蟲(*Taenia saginata*)、蛔蟲 (*Ascaris lumbricoides*)、鉤蟲 (hook worm)、蟯蟲 (*Enterobius vermicularis*)、鞭蟲 (*Trichuris trichiura*)、埃及住血吸蟲 (*Schistosoma haematobium*)，原蟲類寄生蟲主要有痢疾阿米巴原蟲 (*Entamoeba histolytica*)、大腸纖毛蟲 (*Balantidium coli*)、梨形鞭毛蟲 (*Giardia lamblia*)、弓漿蟲 (*Toxoplasma gondii*) (Wallace, 1972; Mallis, 1990)。

縮小包膜條蟲(*Hymenolepis diminuta*)是常見於鼠類的條蟲，其生活史以許多昆蟲當做中間宿主，最重要的中間宿主是穀類的甲蟲，在中間宿主中，蟲卵會發育為六鉤幼蟲(oncosphere)進而發育為囊尾幼蟲(cysticercoid)，當中間宿主再被中宿主吃下時，約 18 至 20 天內便可發育為成蟲。世界各地均有人類感染的病例報告，

人是在偶然的情況下經由糞口途徑接觸被污染的食物和水而感染(Markell et al., 1986; Bogitsh and Cheng, 1998)。

一般來說，寄生蟲只能在某些特定的宿主中發育，大部分寄生蟲感染宿主後，寄生蟲蟲體的體表抗原及其代謝產物的分泌性抗原會刺激宿主產生免疫反應。當外物侵入昆蟲體內時，昆蟲會因外物的特性，引發不同免疫反應以保護蟲體本身免於被侵害。昆蟲雖無如脊椎動物般，具記憶性及專一性的免疫反應，但昆蟲亦有自我辨識的能力。當昆蟲受傷或被外來物侵入而誘發免疫反應，其過程複雜但有效率，依照血球參與的程度，可分為細胞性(cellular)與體液性(humoral)防禦反應(Dunn, 1986)。昆蟲主要的細胞性防禦反應有吞噬作用(phagocytosis)、瘤結形成作用(nodule formation)及包囊作用(encapsulation)。小型的外來物，如細菌、真菌孢子或非生物性的乳膠粒子(latex beads)侵入蟲體，可藉血球伸出偽足進行吞噬作用(Butt et al., 1996)。瘤結的形成是由許多吸附或吞噬外來物的血球聚集而成(Gupta, 1986; Ratcliffe, 1993)。若外來物太大不能被吞噬，會於外來物表面聚集更多血球或黑色素，形成多層血球的聚集

物謂之包囊作用。昆蟲之防禦機制與體腔中之血球因子密不可分，目前已知昆蟲血球可進行細胞性免疫反應，其具有分泌抗菌因子、輸送脂質蛋白質、血液凝集、形成結締組織、傷口癒合、表皮硬化、防禦作用及調節生長發育等功能(Arnold, 1974; Dunn, 1986; Pech et al., 1995)。體液性的包囊作用只有少量血球或不需血球參與包囊作用，直接以黑色素聚積在外來物周圍形成莢囊，通常發生在血球數目較少的雙翅目昆蟲(Poinar and Lentenegger, 1971; Götz, 1986; Lackie, 1988)。有關體液性的因子包括溶菌酵素(lysozyme)、抗菌蛋白(antibacterial protein)、外源凝集素(lectin)、天蠶素(cecropins)、防衛素(defesins)及 agglutinins 等(Lauth et al., 1998; Paskewitz and Gorman, 1999)。

昆蟲血球具有血液凝集、傷口癒合、細胞性防禦、形成結締組織、分泌抗菌因子及輸送脂質與蛋白質等功能(Arnold, 1974; Brehélin, 1982; Dunn, 1986; Pech et al., 1995)。不同種類之昆蟲，其血球種類及特性亦不相同，一般可分為七種(Clements, 1992):

(1)原血球(prohemocytes, PR): 圓形或卵圓形，體積小，通常具有平滑的外形，細胞

質具有強嗜鹼性及少數包涵體，一般認為原血球是一種幹細胞(stem cell)，可分化形成其它的血球。

(2)漿血球(plasmatocytes, PL)：細胞大小變化大，可伸出偽足，細胞膜具有許多胞飲套(pinocytotic invaginations)，細胞質具有嗜鹼性，含有許多內質網、粒線體、高基氏體及溶小體，有時也會出現顆粒，此血球不易與原血球及顆粒血球區別，一般認為漿血球是一種免疫防禦細胞。

(3)顆粒血球(granulocytes, GR)：球形，形態變化不定，體積有大有小，細胞核較小，細胞質有許多顆粒，細胞膜有時會有突起，此血球容易破裂，一般認為與防禦作用有關。

(4)凝集血球(coagulocytes, CO)：細胞有大有小，容易破碎，細胞核有時會被瀦泡(cisternae)包圍，細胞質有時含有顆粒，是一種免疫防禦的細胞。

(5)球狀血球(spherulocytes, SP)：球形，細胞質具有空泡狀的包含體。

(6)偽食血球(Oenocytoid, OE)：圓形或卵圓形，為大型血球，細胞表面平滑，細胞核偏離中心，細胞質含許多微小管

(microtubes)，內質網、粒線體及高基氏體。細胞內含有原酚氧化酵素

(prophenoloxidase, pro-PO)。(7)脂血球(adipohemocytes)：球形，細胞有大有小，含許多脂質、包涵體及顆粒，不易與滋養細胞(trophocytes)區別，蟲體受傷時會破裂進入胸腔中。

抗微生物蛋白質屬於體液性免疫的一部份，可以對抗細菌或黴菌之侵染。侵染的微生物啟動傳導訊號，使脂肪體，血球，中腸及上皮細胞產生的抗微生物蛋白質達到最高點，此抗微生物蛋白質可以殺死或防止微生物產生。雖然抗細菌及抗黴菌途徑間的關係及抗寄生蟲的反應仍不清楚，然而有證據顯示這些途徑有重疊且抗微生物蛋白質對寄生蟲在蚊蟲體內之生長及發育有不利的影響(Paskewitz and Gorman, 1999)。誘發性抗細菌蛋白質主要有天蠶素，防衛素，富含比咯氨酸蛋白(proline-rich proteins)及富含甘氨酸蛋白(glycine-rich proteins)四大類 (Hetru et al., 1998)。天蠶素及防衛素已在蚊蟲中被鑑定出來，這些蛋白質主要是蚊蟲受免疫刺激後由脂肪體產生，也可能由血球、中腸或其它組織衍生。關於抗微生物蛋白質的誘發，目前較清楚的是 Rel transcription factors 這一類的蛋白質，此類蛋白質存在未被刺激的細胞質中與抑制蛋白質結

合，一旦被活化，此類蛋白質與抑制蛋白質會分離，此類蛋白質會移至細胞核與抗微生物蛋白質基因的 promoter 及 enhancer 結合，使抗微生物蛋白質的基因活化(Paskewitz and Gorman, 1999)。

二、研究動機及目的

寄生蟲只能在某些特定的宿主中發育，而縮小包膜條蟲可以昆蟲做為中間宿主，本研究經由口自然餵食蟲卵以瞭解蟑螂是否可做為縮小包膜條蟲的中間宿主，讓蟲卵在蟲體內發育為幼蟲。另外蟑螂能生存於垃圾堆、糞坑、牧場等髒亂的環境，本身卻不致病，甚至將病原體傳播給人，究竟蟑螂是以何種免疫機制對抗外來物？本研究以人為注射縮小包膜條蟲卵，進而觀察蟑螂是否能抑制侵入的蟲卵。我們的目的是比較自然感染與人為注射感染蟲卵的蟑螂與此寄生蟲間之關係。未來希望能從蟑螂體內找到抗病因子，運用於寄生蟲病的預防及治療。

參、研究方法及進行之步驟

一、供試昆蟲

本試驗所用之美洲蟑螂採自台中市建國市場，在中山醫學大學寄生蟲試驗室飼育，以其子代感染縮小包膜條蟲卵。

二、病源

縮小包膜條蟲在中山醫學大學寄生蟲試驗室培養，以米蟲(*Tribolium ferugineum*)當作中間宿主，老鼠為終宿主，蟲卵由寄生於老鼠體內成蟲之生殖節片中取得以感染蟑螂。

三、外物入侵之防禦試驗

以磨碎之老鼠飼料混合縮小包膜條蟲卵餵食美洲蟑螂成蟲，觀察縮小包膜條蟲在蟑螂體內的分佈及發育過程。另外以人為的方式將縮小包膜條蟲卵注入蟑螂胸腔中，觀察蟑螂血球對蟲卵產生之免疫反應，以比較自然感染及注射感染蟑螂宿主所產生反應之異同。

四、光學顯微鏡觀察

美洲蟑螂感染縮小包膜條蟲卵後，分別在1分鐘，10分鐘，30分鐘，1小時，3小時，6小時，12小時，24小時，48小時解剖蟑螂，以光學顯微鏡觀察腸道及體腔中之蟲卵是否會發育為六鉤幼蟲(oncosphere)進而發育為囊尾幼蟲(cysticercoid)，或對蟲卵產生免疫反應。

五、掃描式電子顯微鏡樣品之處理

美洲蟑螂感染縮小包膜條蟲卵後，分別在1分鐘, 3小時, 6小時, 24小時解剖蟑螂，樣品以2.5% glutaraldehyde in 0.15M PBS buffer, pH 7.3 的前固定液，固定樣品，再經四氧化鉻(1% osmium tetroxide)進行後固定，經序列酒精脫水；經臨界點乾燥(critical point dry)後，將樣品以雙面膠帶黏貼於試料台(stub)，以IB-2 型離子被覆器(ion coator; Hitachi, Ltd.)鍍金3-5分鐘，再以掃描式電子顯微鏡觀察縮小包膜條蟲在蟑螂體內的分佈。

六、超薄切片樣品之處理

美洲蟑螂感染縮小包膜條蟲卵後，分別在1分鐘, 3小時, 6小時, 24小時解剖蟑螂，取出包囊的蟲卵樣品以2.5% glutaraldehyde in 0.15M PBS buffer, pH 7.3 的固定液，固定樣品隔夜，再經四氧化鉻(1% osmium tetroxide)進行後固定，經序列酒精脫水及環氧丙烷置換，最後包埋於 Spurr's 樹脂，在68°C烘箱中聚合24小時，以 Reichert

Ultracut S (Leica)切片機，用鑽石刀(6°)進行厚度80nm的切片，以2% uranyl acetate 染15分鐘及1% lead citrate 染8分鐘，即可以 Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡於70kV下觀察及照相。

七、Zymography

將美洲蟑螂血液淋巴以 gelatin substrate zymography 來分析所有的蛋白分解酶。膠體的配製法(gel preparation)與 SDS-PAGE 相同，不同的是 separating gel 中加入0.1%的 gelatin。電泳後，取下 gel，加入100 ml washing buffer(2.5% Triton X-100 in ddH₂O) 清洗 gel。在室溫下搖動30分鐘，換 washing buffer 再洗一次，倒掉 washing buffer，gel 以 ddH₂O 清洗一次。加入200ml reaction buffer (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM CaCl₂, 0.01%NaN₃)，在37°C作用18小時以上。以 stain solution (0.25% Coomassie Blue R250, in 50%MeOH, 10%Acetic acid) 染 gel 1小時。以 destain solution (20% methanol, 10% acetic acid) 退去染液，取膠片以密度掃描儀量化分析結果。

八、蛋白抑制劑的分析:

取 30 μ l 美洲蟑螂血液淋巴 sample loading 至 0.1% gelatin-8% SDS-PAGE (Bio-Rad Mini-Protean II)。進行電泳分析: 150 V、60 min。經過電泳後的凝膠，每個 lane 切成小片後加入 50ml 含 2.5% Triton X-100 的 washing buffer 在室溫下洗 30min，在換一次 washing buffer 洗 30min。將每條凝膠分別放入各種不同 pH 值的 reaction buffer(內含 10 mM CaCl₂)中，在 37°C 下反應 15 小時以上。反應後之凝膠，再染色和脫色，取膠片以密度掃描儀量化結果主要差別為 reaction buffer 內分別加入不同的蛋白酶抑制劑。取膠片以密度掃描儀量化結果。所使用的抑制劑依其所抑制的蛋白酵素的類型分為下列數種:

metalloprotease inhibitor	1,10-phenanthroline, EDTA
Thermolysin-like metalloproteinase inhibitor	phosphoramidon
serine protease inhibitor	4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, AEBSF
cysteine protease	Z-phe-ala-FMK and E-64

inhibitor	
aspartyl protease inhibitor	pepstatin
serine and cysteine protease inhibitor	leupeptin

肆、結果

光學顯微鏡的結果顯示縮小包膜條蟲蟲卵注入美洲蟑螂體腔後 1 分鐘，10 分鐘，30 分鐘，1 h，3 h，6 h，12 h，24 h，48 h 解剖蟑螂取出蟲卵，結果顯示包囊作用起始於血球接觸到蟲卵表面，接著許多血球聚集形成包囊。其中在 1 分鐘，3 小時，6 小時及 24 小時包囊有較明顯的差異(圖一)。

電子顯微鏡的觀察針對 1 分鐘，3 小時，6 小時及 24 小時的包囊做微細構造的探討。結果顯示注射蟲卵 1 分鐘，漿血球開始接觸到蟲卵表面。在 3 小時，一些鬆散的黑化細胞聚集形成包囊。在 6 小時，細胞聚集的更緊密。在 24 小時，包囊完全形成，由多層扁平細胞組成，卵形成厚的包囊

且顯示黑化的特徵。SEM 的結果顯示許多血球聚集在蟲卵表面(圖二)。

Zymography 的結果顯示，注射蟲卵 6 小時及 24 小時檢測到分子量大約 65 kDa 的 gelatinase bands，在 6 小時此酵素活性明顯增加，在 24 小時此酵素活性達到最高(圖三)。

酵素抑制試驗結果顯示，分子量 65 kDa 的 gelatinase bands 可被 leupeptin 抑制，而 EDTA、PMSF 及 phenanthroline 並不影響此酵素活性(圖四)。

伍、討論

包囊作用依昆蟲的種類不同而有些不同，一般而言包囊作用發生在 24 小時內，在靠近外來物的內層有黑色素沉積，外層由多層的細胞組成，用以限制外來物的生長及運動，造成外來物死亡(Grimstone et al., 1967; Norton and Vinson, 1977; Poinar et al., 1968; Schmit and Ratcliffe, 1977)。本研究結果顯示注射蟲卵 1 分鐘，漿血球開始接觸到蟲卵表面。在 3 小時，一些鬆散的黑化

細胞聚集形成包囊。在 6 小時，細胞聚集的更緊密。在 24 小時，包囊完全形成，由多層扁平細胞組成，卵形成厚的包囊且顯示黑化的特徵。顯示漿血球在蟑螂對縮小包膜條蟲卵的包囊作用扮演重要的角色。

短小包膜條蟲受精卵經腹腔注入

Leucophaea maderae 的血腔中會發育為擬囊幼蟲(cysticeroid) (Pesson et al., 1978)。Locust *Schistocerca gregaria* 無法對縮小包膜條蟲的幼蟲進行包囊作用，而蟑螂則可以進行此作用(Lackie, 1976)；縮小包膜條蟲的六鈎幼蟲(oncosphere)在這兩種昆蟲亦得到類似的結果(Lackie, 1980)。本試驗結果顯示許多蟑螂血球聚集到蟲卵表面形成包囊。

Tryselius 和 Hultmark (1997) 的研究顯示果蠅(*Drosophila melanogaster*) 的 cysteine proteinase 1 在免疫的功能上扮演重要的角色。本研究酵素抑制試驗結果顯示，分子量 65 kDa 的 gelatinase bands 可被 cysteine proteinase 抑制劑 leupeptin 抑制，而二價陽離子螯合劑 EDTA、serine proteinase 抑制劑 PMSF 及 metalloproteinase 抑制劑

phenanthroline 並不影響此酵素活性。因此確認此 65 kDa 的 gelatinase 為 cysteine proteinase 類的酵素。此酵素的活性與包囊作用的形成呈正相關，此結果顯示分子量 65 kDa 的 cysteine proteinase 可能與蟑螂對縮小包膜條蟲蟲卵的包囊作用相關。

陸、參考文獻

- Arnold, J. W. 1974.** The hemocytes of insects. In *The Physiology of Insect*. (Rockstein, M., ed.), pp. 201-254. Academic Press.
- Bogitsh, B. J. and T. C. Cheng. 1998.** Intestinal tapeworms. In *Human Parasitology*. Pp. 273-290. Academic Press.
- Brehélin, M. 1982.** Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell Tissue Res.* 221: 607-615.
- Butt, T. M., A. E. Hajek, and R. A. Humber. 1996.** Gypsy moth immune defenses in response to hyphae bodies and natural protoplasts of entomophthorean fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 278-285.
- Clements, A. N. 1992.** The circulatory system. In *The Biology of Mosquitoes*. pp. 195-205. Chapman & Hall.
- Crossley, A. C. 1979.** Biochemical and ultrastructural aspects of synthesis, storage, and secretion in hemocytes. In *Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques*. (Gupta A. P. ed.), pp. 423-474.
- Dunn, P. E. 1986.** Biochemical aspects of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 31: 321-339.
- Götz, P. 1986.** Encapsulation in arthropods. In *Immunity in Invertebrates*. (Brehélin, M., ed.), pp. 153-170. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Grimstone, A. V., Rotheram, S., Salt, G. 1967.** An electron microscope study of capsule formation by insect blood cells. *J. Cell Sci.* 2, 281-192.
- Gupta, A. P. 1986.** Arthropod immunocytes: identification, structure, functions, and analogies to the functions of vertebrate B- and T-lymphocytes. In *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*, (Gupta, A. P., ed.), pp. 3-59. John Wiley & Sons.

- Hetru, C., D. Hoffmann, and P. Bulet.**
1998. Antimicrobial peptides from insects. Molecular mechanisms of immune responses in insects, (Brey, P. T. and D. Hultmark, eds.), pp. 40-66. Chapman and Hall, London.
- Lackie, A. M. 1988.** Immune mechanisms in insects. *Parasitol. Today*. 4: 98-105.
- Lauth, X., A. Nesin, J. P. Briand, J. P. Roussel, and C. Hetru. 1998.** Isolation, characterization and chemical synthesis of a new insect defensin from *Chironomus plumosus* (Diptera). *Insect Biochem Molec. Biol.* 28: 1059-1066.
- Mallis, A. 1990.** Handbook of Pest control, 7th edition, pp. 1152. MacNair Dorland.
- Markell, E. K., M. voge, and D. T. John. 1986.** The cestodes. In *Medical Parasitology*, (Venable, B., ed.), pp. 185-213.
- Mimiollu M. M. and I. Sahin. 1976.** A parasitological study of cockroaches (Blattidae). *Mikrobiyol Bul.* 10: 17-25.
- Norton, W. N., and Vinson, S. B. 1977.** Encapsulation of a parasitoid egg within its habitual host: An ultrastructural investigation. *J. Invertebr. Pathol.* 30, 55-67.
- Paskewitz S. M. and M. J. Gorman. 1999.** Mosquito immunity and malaria parasites. *Am. Entomol.* 45: 80-94.
- Pech, L. L., D. Trudeau, and M. R. Strand. 1995.** Effects of basement membranes on the behavior of hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae): development of an *in vitro* encapsulation assay. *J. Insect Physiol.* 41: 801-807.
- Poinar, G. O. Jr., Leutenegger, R., Gotz, P. 1968.** Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule in *Diabrotica* (Coleoptera) in response to a parasitic nematode (Mermithidae). *J. Ultrastruct Res.* 25, 293-306.
- Poinar Jr., G. O. and R. Leutenegger. 1971.** Ultrastructural investigation of the melanization process in *Culex pipiens* (Culicidae) in response to a nematode. *J. Ultrastruct. Res.* 36: 149-158.
- Ratcliffe, N. A. 1993.** Cellular defense responses of insects: unresolved problems. In *Parasites and Pathogens of Insects*.

(Beckage, N. E., S. N. Thompson. and B.
A. Federici, eds.), pp. 267-304. Academic
Press, Inc.

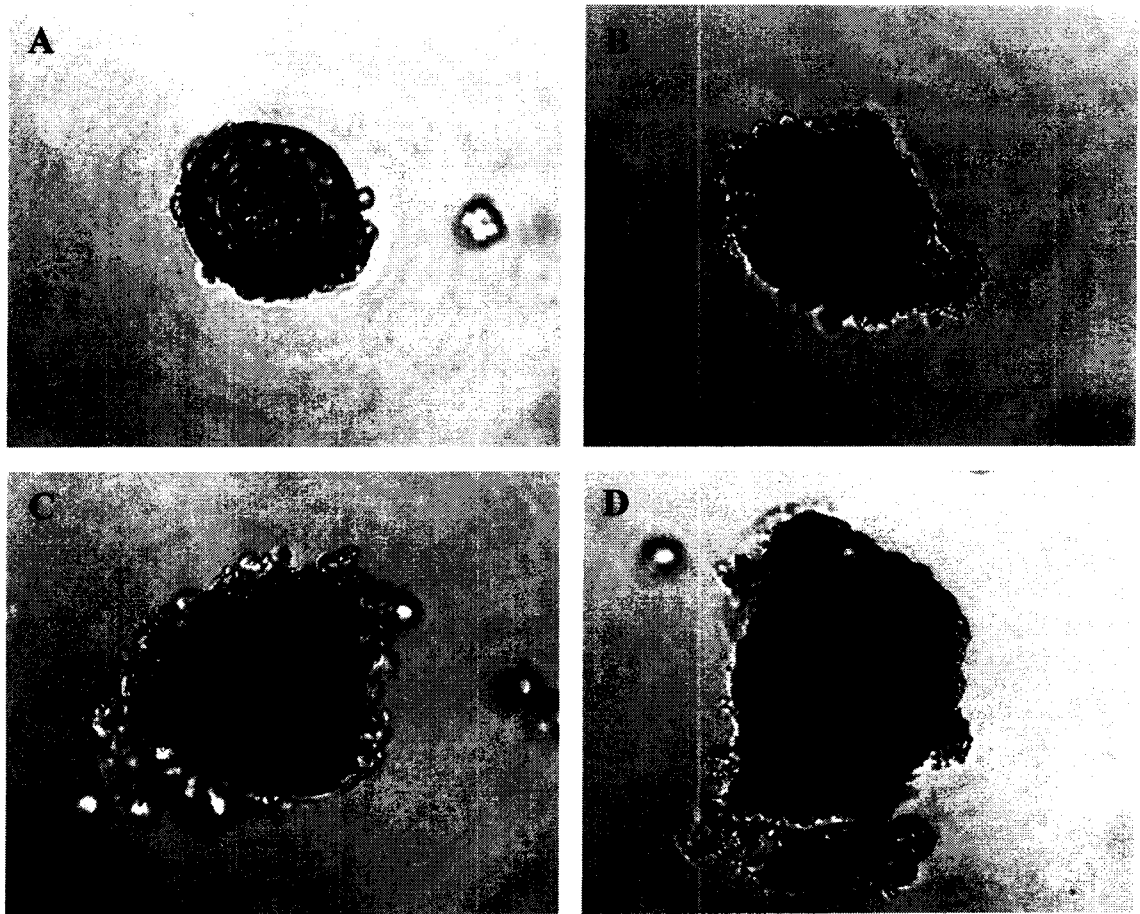
Schmit, A. R., and Ratcliffe, N. A. 1977.

The encapsulation of foreign tissue
implants in *Galleria mellonella* larvae. J.
Insect Physiol. 23, 175-184.

Wallace, G. D. 1972. Experimental

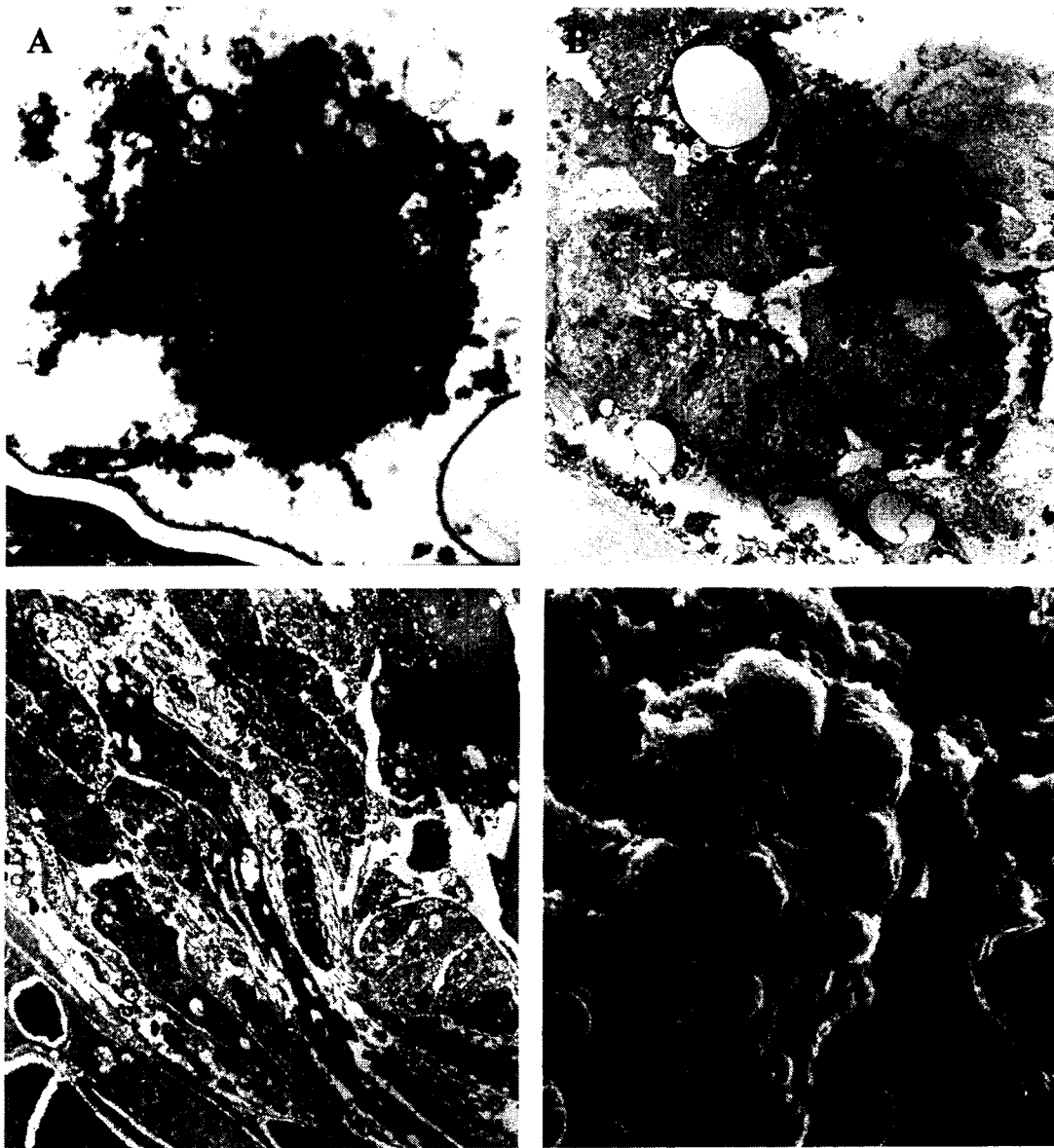
transmission of *Toxoplasma gondi* by
cockroaches. J. Infect. Dis. 126: 545-547.

FIG. 1



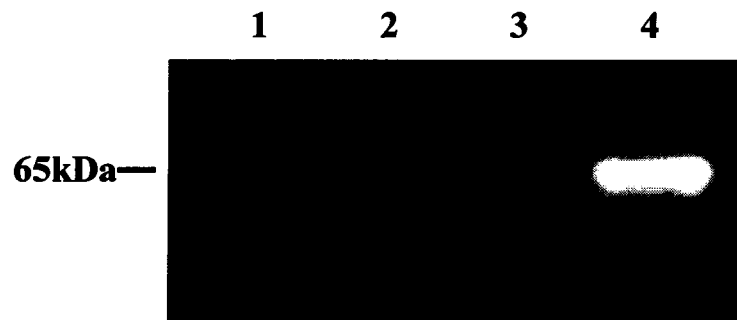
Light micrographs of capsules around *H. diminuta* eggs in *P. americana*. Hemocytes loosely associated with egg at 1 min PI. B. A few hemocytes aggregated in egg surface at 3 h PI. C. Hemocytes tightly adherent to egg surface at 6 h. D. Hemocytes completely encloses the egg at 24 h PI. Original magnification X400.

FIG. 2



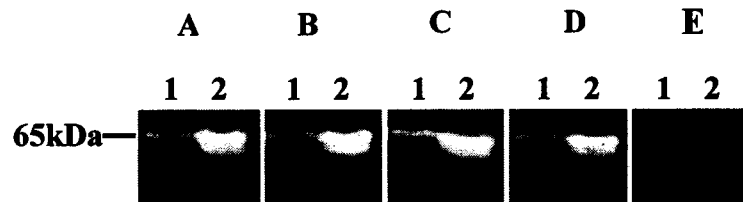
Electron micrographs of hemocytic capsules. A. Plasmotocytes began to attach onto the egg at 1 min PI, X6000. B. 6 h capsule, cells tightly adherent to egg surface, and to each other by discrete contact zones (arrows), X3000. C. 24 h capsule, highly flattened hemocytes (H), which make up bulk of capsule, X3000. D. SEM of 24 h capsule: hemocytes completely encloses the egg, X3000.

FIG. 3



Detection of gelatinase activity by gelatin zymography in cockroach injected with *H. diminuta*. A uninfected cockroach (lane 1), immune-activated cockroach at 3 h PI (lane 2), at 6 h PI (lane 3), and at 24 h PI (lane 4). The sizes of the molecular weight markers are shown to the left and indicate the 65 kDa proteins.

FIG. 4



Effect of different inhibitors on proteinase activities of of cockroach hemolymph with proteinase inhibitors on gelatin zymography. (A) without inhibitor control. (B) incubated in buffer containing a catalytic-site MMP inhibitor. (C) incubated in buffer containing a serine protease inhibitor. (D) incubated in buffer containing the metalloprotease inhibitor 1,10-phenanthroline. (E) incubated in buffer containing a cysteine protease inhibitor. Lane 1 represented immune-activated cockroach at 6 h PI; lane 2 represented immune-activated cockroach at 24 h PI. The sizes of the molecular weight marker are shown to the left and indicate the 65 kDa protein.