

원 저

마우스 장기표면 봉한관 및 봉한소체의 발견 방법에 관한 연구

이병천*** · 이창훈* · 소경순*** · 강대인**** · 소광섭*

* 서울대학교 한의학 물리 연구실 · ** 서울대학교 기초과학지원 연구원 ·
*** 세명대학교 한의과대학 · **** 고운하늘한의원

Method to detect Bonghan duct and corpuscle on internal organs of mice

Byung-Cheon Lee*** · Changhoon Lee* · Kyung-Sun Soh*** · Dae-In Kang**** · Kwang-Sup Soh*

* Biomedical Physics Laboratory, School of Physics, Seoul National University

** Basic Science Institute, Seoul National University

*** College of Oriental Medicine, Semyung University

**** Beautiful Sky Oriental Medical Clinic, Seoul

Abstract

Through anatomical and histological investigations on the novel threadlike and corpuscular structures, Bonghan duct (BHD) and Bonghan corpuscles (BHC) of internal organs of rats and rabbits were extensively studied. In this article we introduce the refined method to observe the BHD and BHC on the internal organs of mice. This development is needed because immunohistochemical analysis and other modern biological techniques were mostly applicable only to mice but not to rats and rabbits.

We made uses of grazing effect of light as well as discriminating technique of BHD/C from fibrin and take the novel structures, BHD/C on mouse internal organ. The specimens taken were examined by hematoxyline and eosin (H & E) and revealed as novel structures.

Our method described herein to take BHD/C on mouse internal organs may contribute to the next step for BHD/C characterization of mouse, especially for stem cell related researches.

Key words : Bonghan Duct, Bonghan Corpuscle, Mouse, Internal Organ

I. 서 론

동양의학은 서구의 분석적, 환원적인 관점의 의학 차원이 아닌 통합적인 면으로 생명을 바라보아 왔다. 즉 사람의 생명은 원기의 생성 소멸에 좌우되며 이의 조절을 생명을 건강히 유지시키는 원리로 간주하였다. 이

러한 기의 순환 체계의 조절을 고래로부터 중국에서는 침, 뜸 및 한약제로 조절해 온 것이다. 그러나 이러한 기의 순환 조절제로서의 방법들은 근본적으로 기가 경혈, 경맥으로 이루어진 경락계를 타고 순환하고 있다는 전제를 하고 있다. 이러한 전제, 즉 침과 같은 외부 자극이 경락을 타고 흐르는 기의 흐름을 향진 조절할 수 있다는 믿음이 고래로부터 한의학의 근본적인 치료 원리로 인식되어 온 것이 사실이다.

그러나 이러한 경락을 실존적 해부학적 존재로서 접근하려 시도한 사람이 바로 1960년대 북한에서 활동한

* 교신저자 : 소광섭, 서울 관악구
서울대학교 물리학과 한의학 물리 연구실 151-747
(Tel : +82-2-880-7750 E-mail: kssoh@phy.snu.ac.kr)

김봉한이다. 그의 전기 생리학적 연구지식과 경험으로 제 1편의 논문에서 경혈과 비경혈의 전기생리학적 차이와 그 부위의 해부학적인 실체에 대해 소상히 밝혀내었다. 이를 시발로 그가 이끄는 경락 연구소는 그 후 몇 년에 걸친 집중적인 연구에 힘입어 4편의 중요한 연구 논문을 발표하였다. 이러한 총 5편의 연구 논문으로 경혈, 경락이 봉한소체와 이를 연결하는 봉한관으로 실제 해부학적으로 존재함을 입증하였다¹⁾.

그러나 불행히도 1960년대 이미 완성한 김봉한의 경락에 대한 실체 연구가 지난 40여년간 그 진실성이 의심되어 온 채 사라져 갔다. 이러한 역사적 배경을 지닌 봉한관에 대한 연구를 본 연구진은 혈관 내에 존재하는 봉한관에서부터 그 존재를 연구 증명하기 시작하였다²⁾. 이를 바탕으로 경락을 이루는 중요한 봉한관 중 소장, 대장 및 간 등의 내부 장기 표면에 장기의 막과 별개로 유리되어 있는 장기표면 봉한관이라는, 현대 해부학적 개념에는 빠져있는 경락의 존재를 토끼와 흰쥐에서 밝힌바 있으며 가장 최근에는 놀랍게도 투명한 토끼의 림프관내에도 내봉한관이 림프의 흐름 속에 떠서 존재하고 있음을 밝혀내었다³⁾.

이 중 장기 표면 봉한관 및 봉한소체는 흰쥐와 토끼에서 성공적으로 발견하여 연구용 시료 채취를 안정적으로 할 수 있게 되었다⁴⁾. 이렇게 장기 표면 봉한관 및 봉한소체는 상대적으로 큰 동물인 흰쥐와 토끼에서는 성공적이었으나 마우스인 경우에는 그 크기 면에서 다른 조직과 감별하여 구분해 내기가 극히 어렵다.

그러나 현대의 유전 정보가 인간과 마우스의 경우에만 완전히 해독되어 의학에 이용되고 있는 상황이고, 이 마우스의 유전자 연구결과를 바탕으로 줄기 세포를 이용한 세포 치료를 포함한 모든 새로운 의학의 발전에 마우스가 널리 실험되고 있는 것이 사실이다. 이러한 의학적 요구에 부응하여 본 연구진은 토끼와 흰쥐의 장기 표면에 존재하는 반투명한 봉한관 및 봉한소체의 발견 및 시료의 채취 기술을 다소 변형하여 마우스에 적용, 안정적으로 연구에 필요한 시료를 얻을 수 있는 방법을 여기서 기술하고자 한다.

II. 실험방법

1. 실험 동물

실험 동물로 사용된 마우스는 일본의 SLC 사의 동물을 납품 받아 암수 구별 없이 BDF 5주에서 10주 사이의 동물을 사용하였다. 실험 전까지 모든 음식과 물을 자유로이 공급하였으며 밤낮이 12시간의 주기로 일정하게 유지되는 공간에서 사육된 외견상 건강한 마우스를 사용하였다. 모든 실험은 동물 실험에 관한 국제 규정, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, 1996을 준수하였다.

2. 마우스의 장기표면의 봉한관 및 봉한소체의 발견 방법

마취를 위해 urethane 1.5 g/kg의 용량으로 복강 내 주사하였다. 이 때 최대한 조심스럽게 주사를 하여 장표면에 상처를 내지 않게 한다. 마취 후 마우스의 하복부를 핀셋으로 집어서 들고 일부를 절제하여 백선의 일부를 정확히 파악한 후 그 백선을 따라 복부를 절개하여 출혈을 최대한 방지하도록 한다. 간혹 복벽의 모세혈관이 터져 출혈이 생기면 거어즈로 그 부분의 혈액을 제거 후 지혈이 되면 백선을 다시 절개하여 간 바로 밑 부분에서 멈춘다. 심한 박동에 의해 장이 심하게 움직일 경우는 흉부의 일부까지 열고 바로 치사 시킨 후 실험을 진행시킬 수 있다.

이 후 복벽을 각각 포셉으로 잡고 네 개의 포셉을 미리 준비한 두께가 약 4 cm의 고무판 등에 걸침으로써 장표면을 안정적으로 노출시킨다. 약 40°C 로 예열한 생리 식염수를 관찰 도중에 장 표면의 건조를 막기 위해 간혹 몇 방울씩 도포한다.

장표면의 관찰을 위해 실체 현미경과 2개의 빔 조명기를 사용하였다. 백선을 절개해서 복부를 여는 과정에서 장표면과 복벽과의 빈 공간을 주의하며 시험하였다. 이때 장표면의 봉한관이 복벽으로 연결되는 것을 절개하는 과정 중에 관찰할 수도 있다.

장표면의 관찰 시에는 조명기의 빔 위치를 변화시키거나 반대로 빔은 그대로 두로 마취된 마우스의 등을 손가락(주로 왼쪽 검지)으로 살짝 들어 받침으로써 조명기의 빔의 방향과 보고자 하는 장기의 표면을 나란히 있게 하여 관찰 (grazing 효과)하면 더욱 장표면과의

분명한 위상의 차이로 수월하게 찾을 수 있다. 이 때 주의 할 점은 장 표면에 생리 식염수 등의 물이 많아도 찾기가 어렵고 너무 적어 장표면이 말라 버려도 극히 찾을 수가 없으며 조직 샘플로의 가치가 없어진다. 이러한 점을 유념하면서 마취된 마우스의 등을 검지 등의 손가락으로 받쳐서 장의 위치를 변화시키면서 장표면을 면밀히 관찰하면 유백색의 반투명한 실 같은 구조물을 발견할 수 있다. 이때 반드시 그 구조물이 실제 장표면을 싸고 있는 캡슐이나 장과 장사이의 막인 장간막이 접혀서 보이는 현상인 지를 감별하기 위하여 미세 포셉으로 실제 현미경하에서 집어보아야 한다. 집었을 때 장막은 그대로 인 채 반투명의 유백색 구조물이 들어 올려지면 장기 표면 봉한관의 발견의 첫 단계는 성공한 것이다. 이 후 이 구조물을 최대한 가볍게 장력을 주지 않고 추적해가면 연결된 다른 봉한관들을 찾아낼 수가 있다.

여기까지 성공하면 거의 새로운 조직학적 구조물로써의 장기표면 봉한관을 채취할 수 있으나 이 때 장막 및 장간막과의 감별과 함께 주의해야 할 사항으로는 절개 과정에서 간혹 생기는 (미숙련자인 경우 자주 발생할 수 있는) 출혈에 의해 형성된 섬유소가 형성된 경우이다. 이 섬유소와 장기 표면에 존재하는 봉한관의 감별은 어려울 수 있으나 몇 가지 차이점을 유념하면 조직학적 검사 이전에 실제 현미경 하에서도 감별이 가능하다. 우선 첫 번의 차이점은 섬유소는 그 생리적 기능상 필연적으로 적혈구를 그 내외부에 포함하게 되는데 이로 인해 선홍색을 띤 실처럼 보인다. 이러한 선홍색의 실과 같은 구조와 반투명의 유백색의 장기 표면 봉한관은 이러한 차이에서 출혈이 장표면에 생겼을 경우에도 감별이 가능한 것이다.

중중 장기표면 봉한관과 복부 절개시의 출혈에 의해 생성된 섬유소와 함께 붙어있다. 이때에도 상기의 섬유소와 봉한관의 외견상의 특징을 바탕으로 실제 현미경으로 관찰시 감별이 가능하며 확실한 객관적인 정보에 의한 감별은 조직학적인 검사를 통해 확증을 할 수 있다.

이제 확실히 찾은 장기표면 봉한관을 추적해 들어가면 분지를 내며 퍼져있는 것을 알 수 있으며 추적하는 도중에 만나는 두툼한 부분이 봉한소체인 것이다. 그러나 항상 봉한관이 먼저 발견되는 것은 아니며 그 반대로 봉한소체가 상기의 방법에 의해 먼저 발견되는 경우도 많다. 그 발견의 순서는 중요하지 않을 것이다.

이렇게 발견한 봉한관과 봉한소체의 채취는 그 분석하고자 하는 연구 방향에 따라 달라져야 한다. 즉 일반 연구를 위해서는 가능한 빨리 채취 후 10% neutral buffered formalin (NBF) 등의 고정액에 넣는다. TEM이나 SEM 등의 전자 현미경적인 연구를 위해서는 반드시 in situ에서 발견 즉시 TEM 고정액을 수차례 도포 후 시료를 채취한다. 본 연구에서는 전자의 방법으로 시료를 얻어 Hematoxline and Eosin (H&E) 염색으로 관찰하였다.

III. 결 과

조직학적 결과

Fig. 1은 상기의 방법을 이용하여 마우스 장기 표면에 떠서 존재하는 봉한관을 미세 포셉을 이용하여 들어 올리고 있는 모습이다. 장기 표면의 막과는 별개로 들어 올려지는 모습으로 조직학적 연구를 위한 첫 단계의 모습이다. 이렇게 마우스의 봉한관이 연결된 봉한소체를 얻어 10% neutral buffered formalin (NBF)로 고정 후 파라핀 블록을 만들어 종단면을 얻었다. 이를 Hematoxline and Eosin (H&E) 으로 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다 (Axiophot; Zeiss, Germany). Fig. 2A가 저배율의 봉한소체와 봉한관의 종단면 사진이다. 봉한소체로 들어 가고 있는 봉한관의 일부의 모습이 보인다.



Fig. 1 마우스 소장 표면에서의 실과 같은 반 투명한 봉한관을 채취하는 모습
미세 포셉으로 장기표면 봉한관을 들어 올리고 있다. 가는 화살표 3개는 봉한관, 길고 큰 화살표는 이와 나란히 연결된 봉한소체이다. Scale bar: 100 μ m

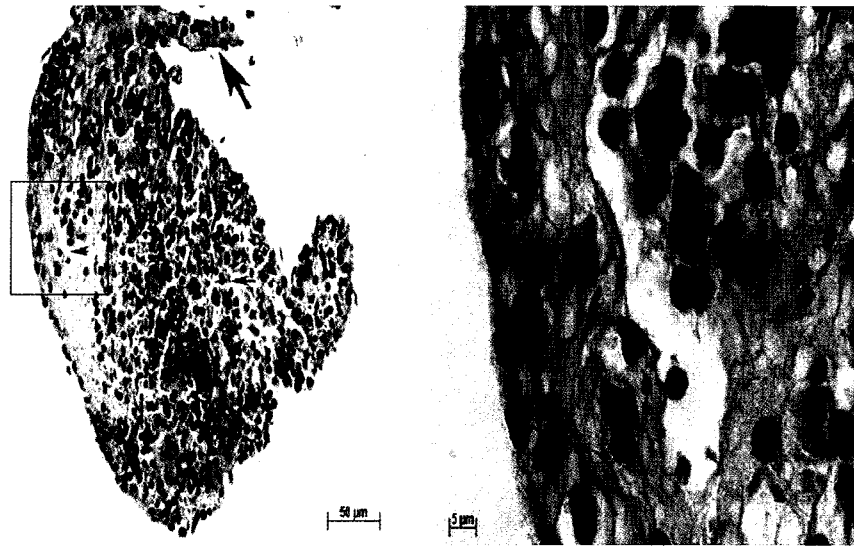


Fig. 2 마우스 장기 표면 봉한관과 봉한소체의 종단면의 헤마톡실린 에오신 염색 모습: (A), 두꺼운 화살표가 봉한관의 일부가 횡단된 것이다. 가는 화살표는 소체내의 동공을 표시한다. (B), (A)의 봉한소체 중 큰 동공인 부분인 사각형 부분을 확대한 사진.

다 (Fig. 2A). 지름이 약 $30\mu\text{m}$ 로 혈관이나 림프관과는 다르게 hematoxyline에 짙게 염색되는 호염기성 핵의 세포가 차있다. 그러한 세포를 포함하는 결합조직 또한 eosin보다 hematoxyline에 더욱 잘 염색된 것을 관찰할 수 있다. 이 봉한관과 연결되어 있는 마우스의 봉한소체의 직경은 단경이 약 $200\mu\text{m}$ 이고 장경이 $500\mu\text{m}$ 로 다양한 세포로 구성 되어있으며 이를 둘러싸고 있는 결합조직 막을 볼 수 있다. 적혈구와 hematoxyline에 짙게 염색된 림프양 세포가 많이 구성되어 있는 것이 관찰이 된다. 이러한 다양한 세포가 화살표 머리로 표시한 작고 큰 동공을 사이에 두고 산재되어있다.

보다 분명한 형태적 특징을 파악하기 위하여 Fig. 2A에서 일부 (사각형)를 더욱 고배율로 관찰하였다. 이 사진에서는 더욱 선명하게 많은 적혈구와 림프양 세포들을 관찰할 수가 있다. 최외각의 조직막도 볼 수 있다. 이 고배율사진은 이 림프양세포들이 hematoxyline에 진하게 염색되는 핵이 세포의 대부분을 차지하고 있는 것이 보인다.

IV. 토의 및 결론

60 년대의 과학사의 한 사건으로 잊혀져 갔던 경락의

실체 연구인 김봉한의 봉한학설이 본 연구진의 체계적인 연구에 의해 하나씩 그 실체가 드러나고 있다^{4),6),9)-11)}. 그 중 내장기 표면에 장막과는 별개로 존재하는 장기 표면 봉한관 (원저에는 내외 봉한관으로 명시)은 이미 토끼와 흰쥐에서 명확히 그 존재를 밝히고 조직학적인 특성을 포함하여 최근에는 면역 조직학적인 연구를 통해 더욱 더 세세한 봉한관의 특성을 규명하였다¹²⁾. 본 연구에서처럼 마우스라는 소 동물에서 새로운 조직을 발견 규명하기 위해서는 그 개념의 폭을 명확히 확대하여 원저에 충실하여 장표면 뿐 아니라 장과 장 사이나 이 논문의 방법에서 언급한 것처럼 장과 복벽 사이에도 간혹 발견되는 실 같은 줄도 장기표면 봉한관 즉 김봉한의 내외 봉한관인 것이다. 이렇게 광의적으로 장기표면 봉한관 및 소체를 파악하는 것이 봉한학설에 부합되며 본 연구의 주제인 마우스라는 소 동물에서 보다 광범위하게 장기표면 봉한관을 발견할 수 있을 것이다. 이러한 장기 표면 봉한관과 봉한소체의 발견 위치는 개체마다 다르며 그 개체도 건강 상태와 생리적인 변화에 따라 달라지는 것으로 사료 된다.

이러한 관점들은 본 연구에의 초점인 마우스에서의 장기 표면 봉한관 및 봉한소체의 발견에도 유념할 사항이다. 즉 같은 종의 마우스에서도 (여기서는 BDF) 개체마다 그 발달 정도가 다르게 나타나 실험을 안정적

참고문헌

으로 수행하는 데 어려움을 겪을 때가 많다. 그러나 본 연구진이 제시한 방법으로 숙달해 가면 복부에 있는 위, 간장 및 소 대장 등의 여러 내장기관과는 별개로 존재하는 (장표면에만 국한 하지 말고) 유백색의 실과 같은 존재인 장기표면 봉한관과 이와 연결되어 봉한관 보다 두터운 실처럼 보이거나 덩어리처럼 생긴 봉한소체를 찾을 수 있다.

이 논문의 방법에서 상세히 서술한 바에 유념하면 새로운 해부학적 조직을 발견할 수 있다. 그러나 장기 표면 봉한관 즉 원저의 내외 봉한관의 서술을 원저에서 면밀히 검토하면 이 봉한관 및 봉한소체가 결국에는 림프관 및 혈관에 림프액과 혈액에 떠서 존재하는 내 봉한관과 연결되거나 내장기관의 표면 막을 통과하여 그 내장기관내로 들어가서 내장기내에 존재하는 각 장기내 봉한관 및 봉한소체에 연결되어 분포하고 있다고 되어있다⁹. 이러한 원저의 명시를 감안하면 본 연구에서의 마우스 장기 표면 봉한관 및 봉한소체도 마치 일부는 장기표면에 유리되어 있고 그 일부는 장기의 막에 붙어 있는 것을 알 수 있는데 이러한 분포 또한 봉한학설의 서술과 일치하는 것이지 장 막이나 장 자체 속으로 사라져 버린다고 림프관 등의 일부로 오인하는 일이 없어야 한다.

이렇게 채취한 마우스 장기표면 봉한관 및 봉한소체에 대한 종단면을 Hematoxline and Eosin (H&E) 염색으로 관찰하였다 (Fig. 2A, B). 여기서 보이는 다양한 종류의 세포는 H&E 염색만으로는 그 기본적인 구조의 파악만 가능한 상태이며 향후의 연구는 본 연구방법을 활용하여 채취한 마우스의 장기 봉한관 및 봉한 소체에 대해 면역조직학 등 더욱 세부적인 과학적 연구를 통해 기능을 유추할 수 있는 연구를 수행하여야 할 것이다.

감사의 글:

이 연구는 국가지정 연구 사업 NRL (M1-0300-00-0324) 및 과학기술부의 Cavendish-KAIST 한,영 협력 사업의 지원으로 이루어졌다. 본 연구의 명확한 조직학 사진은 서울대학교 의과대학 병리학교실 조은숙씨 염색 기술로 이루어진 것으로 본 연구진은 이에 감사드립니다.

1. Kim BH. On the kyungrak system. J. Acad. Med. Sci. DPR Korea 1963 ; 1-41.
2. Cho SJ, Kim BS and Park YS. Thread-like structures in the aorta and coronary artery of swine. J. Int. Soc. Life. Inf. Sci. 2004 ; 22 : 609-611.
3. Jiang X, Kim HK, Shin HS, Lee BC, Choi C, Soh KS, Cheun BS, Baik KY and Soh KS, Method for observing intravascular Bonghan duct. Korean J. Orient. Prevent. Med. Soc. 2002 ; 6 : 162-166.
4. Lee BC, Baik KY, Johng HM, Nam TJ, Lee J, Sung B, Choi C, Park WH, Park ES, Park DH, Yoon YS and Soh KS, Acridine orange staining method to reveal the characteristic features of an intravascular threadlike structure. Anat. Rec. 2004 ; 278B : 27-30.
5. Lee BC, Yoo JS, Baik KY, Kim KW and Soh KS, Novel threadlike structures (Bonghan ducts) inside lymphatic vessels of rabbits visualized with a Janus Green B staining method. Anat. Rec. 2005 ; 286B : 1-7.
6. Johng HM, Shin HS, Yoo JS, Lee BC, Baik KY, Kim S and Soh KS,. Bonghan ducts on the surface of rat liver. J. Int. Soc. Life. Inf. Sci. 2004 ; 22 : 469-472.
7. Lee KJ, Kim S, Jung TE, Jin D, Kim DH and Kim HW, Unique duct system and the corpuscle-like structures found on the surface of the liver. J. Int. Soc. Life. Inf. Sci. 2004 ; 22 : 460-462.
8. Shin HS, Johng HM, Lee BC, Cho SI, Soh KS, Baik KY, Yoo JS and Soh KS, Feulgen reaction study of novel threadlike structures (Bonghan ducts) on the surface of mammalian organs. Anat. Rec. 2005 ; 284B : 35-40
9. Lee BC, Yoo JS, Park ES, Yoon YS, Shin HS and Soh KS, Histological features of Bonghan corpuscles on the surface of rabbit internal organs. J. Int. Soc. Life. Inf. Sci. 2005 ; 23 : 95-99.
10. Lee CH, Yoo JS, Kim HH, Kwon J and Soh KS, Observation of flow in organ-surface Bonghan duct using nanoparticles. Proceedings of the 23th Symposium of the Korean Society of Jungshin Science. 2005 ; 129-134.
11. Baik KY, Park ES, Lee BC, Shin HS, Choi C, Yi SH,

- Johng HM, Nam TJ, Soh KS, Nahm YS, Yoon YS, Lee IS, Ahn SY and Soh KS, Histological aspect of threadlike structure inside blood vessel. J. Int. Soc. Life. Inf. Sci. 2004 ; 22 : 473-476.
12. Hong, S, Yoo, JS, Lee, BC, Hong J, Kim KW, Kang H, Woo HJ and Soh KS, Immunohistochemical Study of Novel Threadlike Structures on Internal Organ Surfaces of Rats. Submitted.
13. 김봉한 (1965a) 경락 체계. 조선의학, 1965; 108: 5-38