

# Trypan blue 도포를 사용한 nude 마우스와 흰쥐에서 경혈자리 찾기와 DiI 추적 법

이병천<sup>1,2</sup>, 엄기훈<sup>1</sup>, 배경희<sup>1</sup>, 강대인<sup>2</sup>, 소광섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 서울대학교 한의학 물리 연구실, <sup>2</sup> (주) 약침학회, 약침의학 연구소

Received : 09. 07.08

Accepted : 09. 07.22

## Key Words:

acupuncture point,  
Trypan blue, 1,1'-dioc-  
tadecyl-3,3,3',3'- tetram-  
ethylindocarbocyanine  
perchlorate (DiI),  
Bonghan

## Visualization of potential acupuncture points in rat and nude mouse and DiI tracing method

Byung-Cheon Lee<sup>1,2</sup>, Ki-Hoon Uhm<sup>1</sup>, Kyoung-Hee Bae<sup>1</sup>,  
Dae-In Kang<sup>2</sup>, Kwang-Sup Soh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Physics Laboratory for Korean Medicine,  
Department of Physics and Astronomy, Seoul National University, Korea  
<sup>2</sup>Pharmacopuncture Med. Res. Center, Seoul, Korea

## ABSTRACT

**Objectives:** To find the potential acupuncture points by using Trypan blue staining on the skin of rat and Nude mouse.

**Methods:** 0.4% Trypan blue was applied to the skin of rat or Nude mouse previously treated by surfactant. Washing by warm saline was followed after enough application of trypan blue and surfactant. Frequency of Trypan blue application should be varied to the experimental animals' condition for visualizing significant spots.

**Results:** Blue spots appeared roughly in symmetry along kidney meridian or stomach meridian. Several spots outside of kidney or stomach meridian were also observed; however, the detail stereoscopic images of those blue spots were slightly different according to the position blue-colored. DiI signals were visualized along blood vessel after DiI injection into the Trypan blue-visualized blue spots.

**Conclusion:** Our method to visualize the potential acupuncture points as a blue spot on rat and Nude mouse skins may contribute to the next step for finding specific flowing channels among blue spots.

## I. 서론

한의학은 서구의 물질 중심의 의학에서 벗어난 생체 에너지 조절을 중요시하는 氣의학이다. 이 생체 에너지, 기가 체내에서 지나다니는 통로를 경맥이라고 하며 이 경맥이 모이는 장소가 경혈이라 명명하였다. 이 경혈에 자극을 가해 체내 氣 에너지를 조절하여 우리 몸을 예방 치료하는 시술이 침술 이자 뜸술 인 것이다. 이렇듯 경혈은 임상적으로 큰 의의를 가진다.

이 경혈이 특정한 해부학적 구조물인 일명 표층 봉한소체라는 조직이 존재한다는 주장을 북한의 김봉한에 의해 제기 되었다<sup>1,2)</sup>. 그러나 실제 임상에서는 이 경혈을 찾기 위해서 현재는 골도법에 의존하고 있다. 이 골도법과는 별도로 피부에 색소를 도포하여 경혈을 찾고자 하는 시도가 있었다. 그 시도 중에 대표적인 예가 북한의 김봉한과 일본의 후지와라의 연구다. 불행하게도 북한의 김봉한이

\*Corresponding author: Kwang-Sup Soh,  
Biomedical Physics Laboratory, School of Physics, Seoul National University, Korea  
Tel: +82-2-880-7750, Fax: +82-2-878-9172, E-mail: kssoh@phya.snu.ac.kr

연구한 피부 도포는 그가 만든 경락 과학이란 영화에 나오는 정도이며 그 영화 중에는 피부 도포에 사용한 염색약의 이름이 나오지 않는다고 한다. 이 영화에 자극을 받은 오사카 시립대의 후지와라는 Methylene blue 도포에 의해 토끼와 사람에서 혈 자리를 찾는 실험을 수행하였다<sup>3)</sup>.

김봉한의 봉한학설을 연구하기 위해 본 연구진은 생체의 가장 심부인 혈관 내와 림프관 내에서 시작하여, 장기 표면과 다시 심부인 뇌와 척수 중심부에 존재하는 봉한관 및 봉한소체의 존재를 보고한 바 있다<sup>4,5,6,7,8,9,10)</sup>. 최근에 이르러서야 본 연구진은 Trypan blue란 염료가 봉한관 및 봉한소체를 선택적으로 잘 염색하는 것을 발견하였다<sup>11,12)</sup>. 이 발견에 의거하여 피부에 Trypan blue를 도포하여 혈 자리와 유사한 곳에 염색이 되는 점을 털이 없는 누드 마우스와 반쯤 털을 제거한 흰쥐에서 발견하여 향후 연구를 위해 여기에 보고하고자 한다.

## II. 실험방법

### 1. 실험 동물

실험동물로 사용된 마우스는 누드 마우스 종: BALB/c-nu로 두얼 바이오텍에서 구매 사용하였고, 흰쥐는 중앙 실험동물의 Wistar ST 종을 중앙실험동물에서 구매하여 사용하였다. 암수, 구별 없이 사용하였다. 실험 전까지 모든 음식과 물을 자유로이 공급하였으며 밤낮이 12시간의 주기로 일정하게 유지되는 공간에서 사육된 외견상 건강한 동물을 사용하였다.

### 2. 흰쥐와 누드 마우스 피부의 경혈점의 가시화

본 실험에서 사용한 실험동물은 온도 25℃, 상대습도 60%의 사육실에서 12시간씩 밤낮주기를 갖도록 유지했고, 음식과 물은 자유롭게 접근할 수 있도록 공급되었다. 실험동물의 관리와 사용은 서울대학교 실험동물의 사용과 관리에 관한 안내서 및 국제적 법령과 정책(Guide for the care and of Laboratory Animals, Nation Academy Press, 1996)을 따랐다.

본 실험에서는 Zoletile 10mg/kg (Virbac Laboratories, France)을 흰쥐와 누드 마우스의 대퇴부 근육 내 주사

하여, 모든 수술절차를 전신 마취 하에서 실시하였다. 흰쥐가 깊이 마취가 되었을 때, 흰쥐의 복부의 털을 제모 하였다(누드마우스 경우는 이 단계가 필요 없다). 이 때 상처가 전혀 없어야 한다. 그러기 위해 제모 시에 완전히 제모하지 않고 중간 정도 제모 한다. 이후 충분한 양의 계면활성제를 이용하여 피부와 털의 이물질과 피부에서 분비되는 피지를 제거하였다. 이후 원적외선램프를 이용하여 따뜻한 온도를 유지한 채로 다시 비누 등의 계면 활성화제로 피지 등을 깨끗하게 제거 하였다. 이때 가능한 부드러운 면봉 등으로 문질러 주는 것이 좋다. 충분히 제거가 된 후에 0.4% Trypan blue를 전체 피부에 고르게 적가 하였다. 적가 후 피부를 얇은 비닐로 덮고 원적외선램프에서 5~10 분 둔다. 이후 곧바로 따뜻한 계면활성화제로 마사지를 해 주었다. 이 조작을 두 세 번 하는 데 실험자가 매 번 관찰을 해서 필요한 만큼만 하는 것이 중요하다.

최종적으로 푸른 점이 일렬이나, 대칭으로 나타나면 따뜻한 생리식염수로 충분히 씻어준다. 이후 액체가 흐르는 것을 관찰하기 위하여, 팁의 직경이 20~30 $\mu$ m인 미세유리관을 피부에 나타난 푸른 점 바로 아래 즉 진피 층에 찔러 넣었다. 이 미세유리관 안에는 인지질을 선택적으로 염색하는 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate(DiI)(10 $\mu$ M)가 주입되어있으며 이를 Micro Injector를 이용하여 매우 천천히 흘려보냈다(약 0.004  $\mu$ l/min). DiI 염료를 약 2시간 정도 주입 후에 주입한 부위의 피부를 절개하여 피하 층이 보이도록 안쪽을 드러낸 뒤, 형광 실체 현미경(MVX 10, Olympus)과 실체 현미경(SZX 12, Olympus)을 사용하여 염료가 흘러갔는지의 여부를 관찰하였다. 일정한 거리로 흘러간 조직을 채취하여 분석을 위해 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색 후 공초점 현미경(LSM 510, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰 하였다. 비교 분석을 위해 DiI 가 흘러간 시료와 림프관을 동시에 채취하여 330nM Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 phalloidin (Molecular Probe, USA)로 염색하여 actin fiber의 분포를 분석하였다.

이 실험을 위해 누드마우스 5마리와 흰쥐 5마리를 사용하였다. 그 외에도 지속적인 실험의 향상을 위해 다소 변형된 방법으로 추가 실험을 하였다.

### III. 결과

그림 1-1은 흰쥐와 누드 마우스에 있어 任脈 (CV), 足少陰腎經 (이하, 신 경맥, K line) 및 足陽明胃經 (이하, 위 경맥, ST line) 모식도. Trypan blue 도포 후 흰쥐에서 자주 발견 되는 점과 Nude mouse에서 자주 발견 되는 점의 대략적 위치이다. 대칭적으로 나타나며 분명한 푸른 점만을 취하는 것이 중요하다. 흰쥐에서 Trypan blue 도포 후 자주 발견 되는 점의 실제 사진 예를 그림 1-2에 나타내었다. 주로 신 경맥에 나란하다. 특히 좌, 우에서 대칭적으로 나타나는 것이 특이하다. 그림 1-3는 흰쥐에서 Trypan blue 도포 후 자주 발견 되는 점의 실제 사진 예, 명확한 세 개의 점이 위경과 일치 한다. 다만 작은 다른 점들도 나타났다. (물음표로 표시). 누드 마우스에서 Trypan blue 도포 후 자주 발견 되는 점의 실제 사진 예를 그림 1-4에 나타난 모습이다. 세 개의 점이 신 경맥 (K line)에 나란히 나타난다. 점선은 임맥 (CV), 둥근 점선은 제대의 위치이다. 또 하나의 점이 제대 옆에 나타난다.

DiI로 이 푸른 점에 주사를 한 후 어디로 흘러갔는지에 대한 실험 사진이 그림 2이다.

즉  $10\mu\text{M}$  DiI로 그림 1의 푸른 반점에 주사한 후의 형광 실체 사진 큰 둥근 점선은 DiI를 처음에 주사한 부위이다. 작은 삼각형은 형광이 보이지 않는 혈관을 나타내었다. 화살표로 표시한 부분의 밝은 형광이 DiI가 흘러간 구조물이다.

그림 3은 그림 2에서 DiI가 흘러간 구조물의 DAPI 염색에 의한 세포핵의 영상과 DiI의 형광사진을 합친 사진으로 핵이 간상으로 일정한 간격으로 배열되어 있다. DiI의 밝은 적색의 형광이 흘러가서 염색한 모습을 나타낸다.

DiI가 흘러간 구조물이 가진 조직학적 특성을 파악하기 위한 방법으로 그림 4-1에서처럼 actin fiber의 모습을 공초점 현미경으로 광학적 절단 ( $2.4\mu\text{m}$ ) 하여 각 단층을 촬영한 것이다. actin 섬유는 배열이 구조체 전반에 걸쳐 세로 방향으로 놓인 모습이다. 반면 림프관은 그림 4-2처럼 주로 가로로 배열된 세포의 actin이 보이며 일부는 세로로 배열된 모습도 함께 보인다.

### IV. 토의 및 결론

Trypan blue를 피부에 도포하는 간단한 방법으로 경혈점과 유사한 위치를 가시화 하는 데 성공하였다. 푸른 색으로 가시화 한 점에서 림프관과는 다른 구조체가 연결되어 있는 것 또한 이 연구에 의해 확인하였다.

Trypan blue가 장기표면에 존재하는 봉한계를 가시화 시킬 수 있음을 본 연구진이 발견하여 보고 한 바 있다<sup>4,5</sup>. 봉한계가 하나의 순환계로 존재한다면 같은 생화학적 특징을 가지리라 사료되어 Trypan blue를 피부에 적용하여 경혈자리를 찾는 실험을 하였다. 먼저 털이 없는 누드 마우스에서 가시화 한 실험을 수행하여 성공적인 결과를 얻었다. 이 성공을 기반으로 흰쥐에서 털을 반쯤만 제거하여 피부에는 전혀 상처를 주지 않은 상태에서 Trypan blue 도포에 의해 대칭적인 푸른 점을 발견하였다.

이 실험 결과에서 흥미로운 점은 가시화된 푸른 점이 주로 대칭적으로 나타나며 주로 신경맥과 위경맥 선을 따라 나타난다. Trypan blue 도포에 의해 가시화된 점들이 의의가 있다고 사료되는 중요한 이유가 대칭성에서 찾을 수 있다. 대칭성을 보이면서 신 경맥 (K line)과 위 경맥 (ST line)에서 주로 나타나는 면에서도 그 의의를 찾을 수 있다. 그러나 실제 실험에서는 그림 1-3에서 보는 것처럼 위 경맥선에 위치한 푸른 점이 나타나며 아울러 주위에 다른 점도 보인다. 이는 주 경맥에서 파생된 낙맥과 관련이 있지 않을 까 사료된다. 즉 유의미한 푸른 점은 대체적으로 좌우 대칭을 이루고 있고 선명하다. 또한 그 푸른 점의 간격을 파악하는 것 또한 중요하다.

또한 이 푸른 점이 어떤 조직과 주로 연결되어 있는지를 파악하기 위해 인지질을 선택적으로 염색하는 성질이 있는 DiI라는 추적 물질을 주사하는 실험을 하였다. 그 결과로 그림 2의 실체 현미경 사진처럼 DiI가 혈관 옆을 따라 진행하는 것을 볼 수 있다. 혈관과는 분명한 차이를 보이거나 림프관과 이 새로운 구조체는 실체 현미경상에서는 알 수 없다. 그래서 먼저 그림 3처럼 DAPI 핵 염색에 의해 핵의 모습과 배열을 파악하고 그림 4-2의 림프관의 actin 모습과 비교하여 actin의 모습이 다르다는 것을 밝혔다.

그러나 이 연구의 가장 큰 의의는 장기표면 봉합계를 염색하는 Trypan blue가 피부에서도 경혈자리를 찾을 수 있는 가능성을 열었다는 사실이다. 향후 본 연구를 시작으로 해야 할 중요 연구는 이 푸른 점의 조직학적 연구와 가시화된 푸른 점과 푸른 점 사이에는 어떤 구조체가 존재하여 연결하고 있는지를 파악하는 일일 것이다. 임상적으로는 산삼약침<sup>®</sup> 부평초약침<sup>®</sup>의 응용에서처럼 가시화된 푸른 점에 약침 등의 생리활성 물질을 주입하는 연구가 또 하나의 중요한 분야가 되리라 사료된다.

#### 감사의 글:

이 연구는 국가지정 연구 사업 NRL (No.R0A-2003-000-10371-0) 및 광주과학기술원의 "Systems Biology Infrastructure Establishment Grant"에 후원에 의해 이루어졌습니다.

## V. 참고문헌

1. 김봉한, 경락의 실태에 관한 연구 p5~p13, 조선 의학 제 9권 제 1호, 1962
2. 김봉한, 경락 계통에 관하여, p1~p35, 1963, 조선 의학 제 12호 (90).
3. 후지와라 외 1인, 생활의학연구회 편역, 일월서각, 경락의 대발견 p 94~96.
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. 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.
6. 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.
7. Johng HM, Yoo JS, Yoon TJ, Shin HS, Lee BC, Lee C, et al. Use of magnetic nanoparticles to visualize threadlike structures inside lymphatic vessels of rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007;4:77-82.
8. 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.
9. 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.
10. Lee BC, Kim, S. and Soh KS. Novel Anatomical Structures in the Brain and Spinal Cord of Rabbit that may belong to the Bonghan System of Potential Acupuncture Meridians. *J Acupunct Meridian Stud* 2008; 1(1):29-35.
11. Lee BC, Bae KH, Jhon GJ, Soh KS. 2009. Bonghan System as Mesenchymal Stem Cell Niches and Pathways of Macrophages in Adipose Tissues. *J Acupunct Meridian Stud* 2(1):79-82.
12. Lee BC, Kim KW, Soh KS. 2009. Visualizing the Network of Bonghan Ducts in the Omentum and Peritoneum by Using Trypan Blue. *J Acupunct Meridian Stud* 2(1)
13. Roh JD, Kim LH, Song BY, Yook TH. The Effects of distilled wild Ginseng Herbal Acupuncture on the Heart Rate Variability (HRV). *J.Kor.Pharm. Insti* 2008; 11(1): 55-69.
14. Cho SE, Kim BW, Kwon KR, Rhim TJ, Kim DH. The Effect of Spirodela Herba Pharmacopuncture on Adipocyte Metabolism. *J.Kor.Pharm. Insti* 2008; 11(1): 71-82.

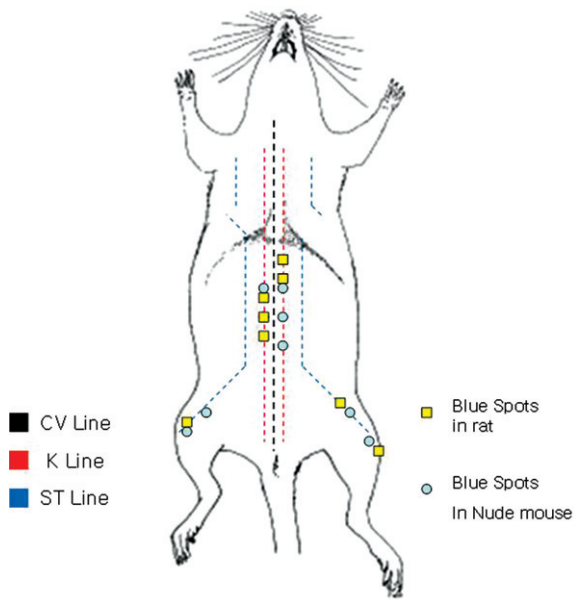


Fig. 1-1: An illustration of Conception Vessel Meridian (CV line), Kidney Meridian (K line) and Stomach Meridian (ST line). Square and circle spots show the representative blue spots visualized by Trypan blue application.

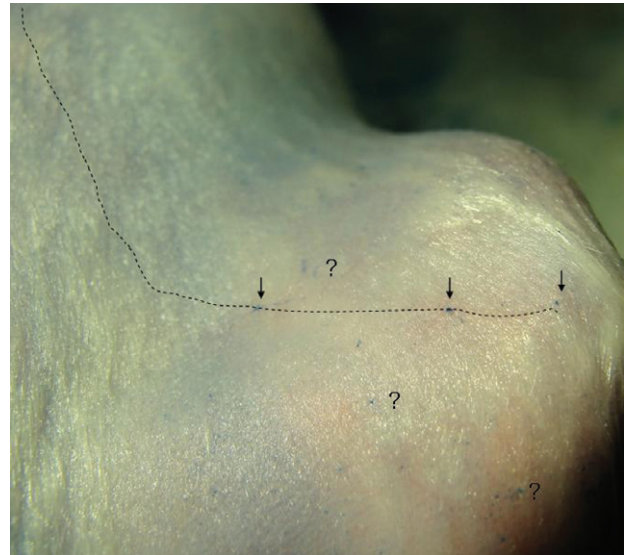


Fig. 1-3: One example of stereoscopic images shows that blue spots are stained by Trypan blue along stomach meridian. Some relatively small blue spots indicated by question mark were also visualized.

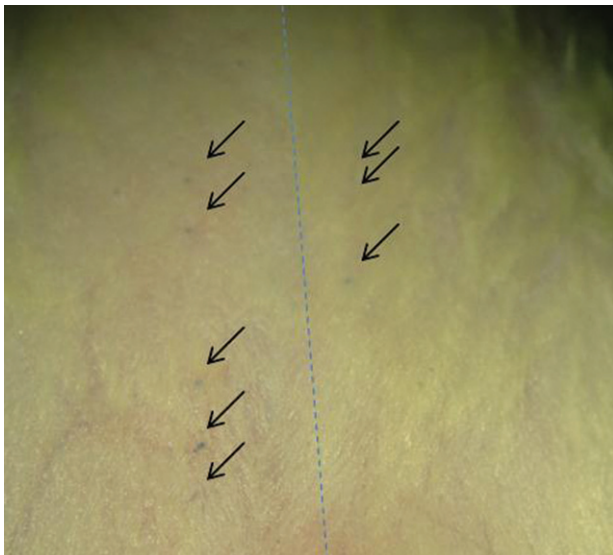


Fig. 1-2: Stereoscopic image of Trypan blue stained blue spots arrowed along kidney meridian on Rat abdominal skin. It is noticeable that there are some blue spots located in symmetry. Blue dotted line indicates conception vessel meridian.

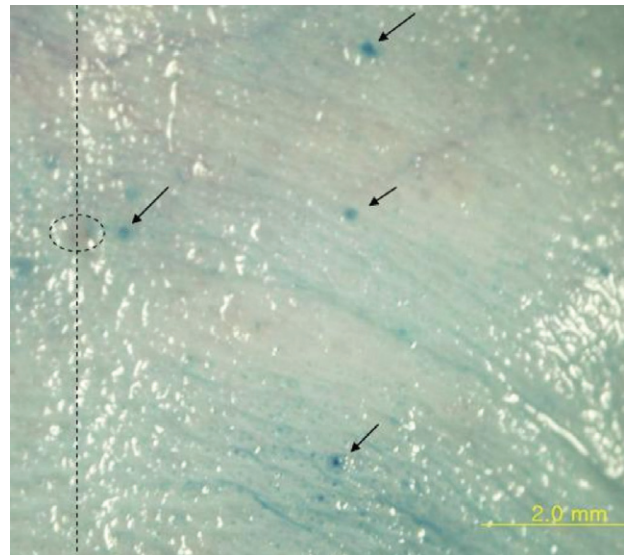


Fig. 1-4: One example of stereoscopic images of Trypan blue stained blue spots indicated by three arrows along kidney meridian (right dashed lines) on Nude mouse skin. Left dotted line means the position of conception vessel meridian (CV) and umbilicus is marked by dotted circle. Another blue spot arrowed is also shown next to umbilicus.



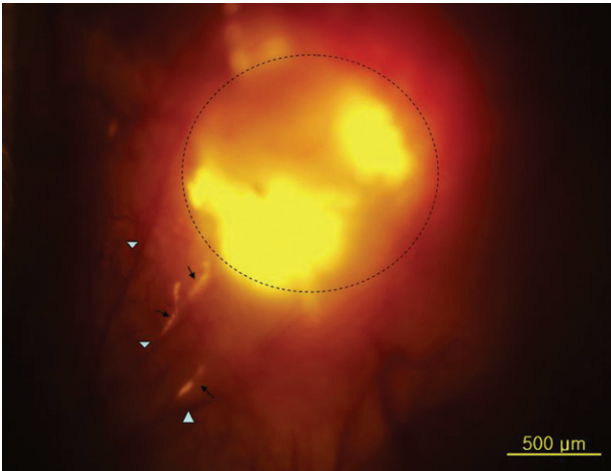


Fig. 2: Fluorescence stereoscopic image of Dil flowing after Dil injection into hypodermal layer. Bright red color circled by dots indicates the injection site for Dil and three white triangles indicate blood vessels. It is noticeable that there are Dil flowing arrowed along blood vessels.

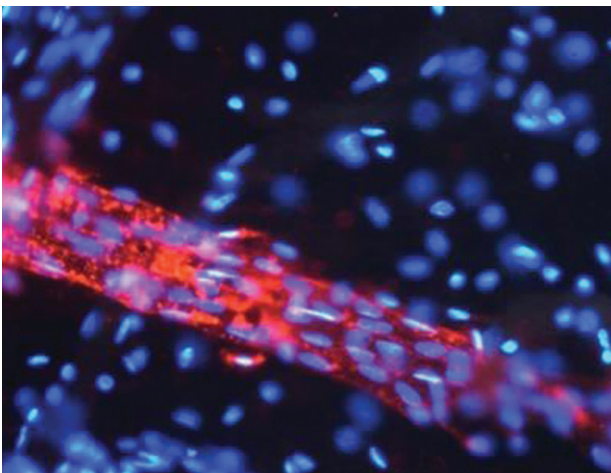


Fig. 3: Fluorescence microscopic image of the structure flowed by Dil as shown in figure 2. Nuclei were stained by DAPI, bright blue colored. Bright red fluorescence is signals of Dil which was flowed. Notice that this structure has regular pattern of rod-shaped nuclei.

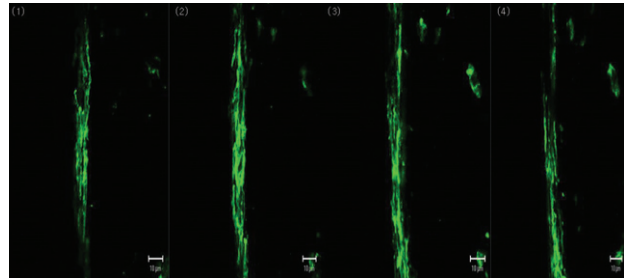


Fig. 4-1: Actin fiber's features of Dil flowed structure as shown in figure 2. Confocal laser scanning microscopy shows the actin fibers (green) are occupied homogeneously in Dil flowed structure. Notice that all actin fibers run longitudinally.

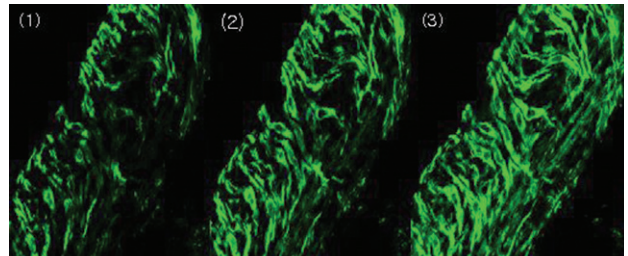


Fig. 4-2: Actin fiber's features of lymph vessel which was isolated around caudal vena cava. Confocal laser scanning microscopy shows that almost all actin fibers are arranged transversely.