경두개 전침과 발효황금 병행 투여가 흰쥐의 허혈성 뇌세포 손상에 미치는 효과

김민선^{1,2} · 구 호^{1,2} · 최명애^{1,2} · 문세진^{1,2} · 양승범³ · 김재효^{4,5}

¹원광대학교 의과대학 생리학교실, ²원광대학교 뇌과학연구소, ³원광보건대학교 의무부사관과,
⁴원광대학교 한의과대학 경혈학교실, ⁵원광대학교 한국전통의학연구소

Combination of Transcranial Electro-Acupuncture and Fermented *Scutellaria baicalensis* Ameliorates Motor Recovery and Cortical Neural Excitability Following Focal Stroke in Rats

Min Sun Kim^{1,2}, Ho Koo^{1,2}, Myung Ae Choi^{1,2}, Se Jin Moon^{1,2}, Seung Bum Yang³, Jae-Hyo Kim^{4,5}

¹Department of Physiology, Wonkwang University School of Medicine,

²Brain Science Institute at Wonkwang University,

³Department of Medical Non-commissioned Officer, Wonkwang Health Science University,

⁴Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Wonkwang University,

⁵Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Objectives : Non-invasive transcranial electrical stimulation is one of therapeutic interventions to change in neural excitability of the cortex. Transcranial electro-acupuncture (TEA) can modulate brain functions through changes in cortical excitability as a model of non-invasive transcranial electrical stimulation. Some composites of fermented *Scutellaria baicalensis* (FSB) can activate intercellular signaling pathways for activation of brain-derived neurotrophic factor that is critical for formation of neural plasticity in stroke patients. This study was aimed at evaluation of combinatory treatment of TEA and FSB on behavior recovery and cortical neural excitability in rodent focal stroke model. **Methods :** Focal ischemic stroke was induced by photothrombotic injury to the motor cortex of adult rats. Application of TEA with 20 Hz and 200 μ A in combination with daily oral treatment of FBS was given to stroke animals for 3 weeks. Motor recovery was evaluated by rotating bean test and ladder working test. Electrical activity of cortical pyramidal neurons of stroke model was evaluated by using multi-channel extracellular recording technique and thallium autometallography. **Results :** Compared with control stroke group who did not receive any treatment, Combination of TEA and FSB treatment resulted in more rapid recovery of forelimb movement following focal stroke. This combination treatment also elicited increase in spontaneous firing rate of putative pyramidal neurons. Furthermore expression of metabolic marker for neural excitability was upregulated in peri-infract area under thallium autometallography. **Conclusions :** These results suggest that combination treatment of TEA and FSB can be a possible remedy for motor recovery in focal stroke.

Key words : focal stroke, fermented *Scutellaria baicalensis*, transcranial electro-acupuncture, pyramidal neurons, neural excitability, thallium autometallography

Received November 23, 2018, Revised December 5, 2018, Accepted December 6, 2018

Corresponding author: **Jae-Hyo Kim**

Department of Meridian & Acupoint, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

Tel: +82-63-850-6446, Fax: +82-63-857-6458, E-mail: medicdog@wku.ac.kr

This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D Program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (HI17C0478000017).

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

두침(scalp acupuncture)은 두피침이라 불리는 치료법으로 한 의학의 경락이론 및 침구요법의 기초 위에서 신경과학의 대뇌피질 기능정위의 이론을 연결하여 머리 피부의 상응하는 부위에 자침을 하여 치료하는 침법이다. 그에 따라 두침은 대뇌피질 기능적 영역에 상응하는 부위를 자극구로 설정하여 운동구, 감각구, 언어구, 평형구, 생식구 등으로 구분하고 있다. 두침은 인체 각부위의 통증 질환, 뇌졸중, 파킨슨병, 치매, 주의집중 장애 등의 다양한 중추신경계 질환의 치료와 증상완화에 유의한 효과를 나타내고 있다¹⁾.

뇌졸중(중풍)으로 진단받고 입원 치료 중인 29명의 환자에서 일반 자침치료만 시술한 경우와 자침치료와 두침치료를 병행한 경우를 비교한 경우에서 두 집단 모두 유의한 치료효과를 보인 반면 치료군 간에 치료효과의 차이는 관찰되지 않았다²⁾. 뇌졸중 환자에 대한 치료에서 야마모토 신 두침(Yamamoto New scalp acupuncture, YNSA) 방식으로 두침자극을 가하였을 때 운동영역과 전운동영역에 대뇌피질의 흥분성이 관찰되었다³⁾. 두침 중 두정구 영역의 하나인 백회(GV20)를 중심으로 하는 전침자극이나 두침이 뇌졸중에 매우 뚜렷한 치료 및 회복효과를 나타내었다. Wang 등⁴⁾은 허혈성 뇌졸중에 대한 많은 실험연구에 대한 체계적 논문 분석 및 메타분석을 수행한 결과에서 백회를 중심으로 하는 두침치료가 뇌경색을 줄이고, 신경학적 기능을 개선하였으며, 나이가 신경세포의 손상을 예방하는 효과가 뚜렷하였다. 이와 관련해 두침자극이 중추신경계로 전달되는 과정은 얼굴과 머리에서 유래한 감각자극이 삼차신경을 따라 교뇌(pons)를 통해 삼차신경핵, 시상과 두정엽을 포함한 대뇌피질로 연결되는 삼차시상경로로 전달된다고 알려져 있다^{5,6)}.

한편 경두개 자극기술(transcranial stimulation)은 다양한 방식으로 개발되고 있는데, 초기 단계에는 경두개자극자극(TMS, transcranial magnetic stimulation)의 비침습적 방식으로 머리뼈를 통해서 대뇌피질에 효율적인 국소자극을 주기 위한 목적으로 개발되었다. 자극의 원리는 머리 피부 위에 높은 전류를 흐르게 하면 전류 흐름 주변에 펄스자장이 형성되고 이 자장에 의해서 머리 피부에서 2~3 cm 범위 내 존재하는 대뇌피질 영역에 유도전류가 야기되어 신경세포를 흥분시키는 기술이다.

이와 함께 자기장 대신에 직류 및 교류전류를 머리 피부와 머리뼈로 침투시켜 대뇌피질의 신경세포 흥분성을 변화시키는 경두개 전기자극술(transcranial electrical stimulation)도 개발되어 있다. 이중 경두개 교류자극(transcranial alternating current stimulation)은 다양한 주파수의 사인파형을 2 mA 이내의 최대전류

로 대뇌피질의 신경세포의 주기적 흥분성의 변화에 영향을 미치며 인지 및 기억 등 뇌 기능의 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다^{7,8)}. 또한 경두개를 경유하는 전기자극기술은 다양한 방식으로 활용범위가 넓어지고 있다. 본 연구에서는 두침의 원리를 결합하여 경두개 전침기술(transcranial electro-acupuncture)이 개발이 이뤄지고 있다(경두개 전침 자극 시스템, 특허출원: 10-2018-0122663). 이는 두침자극이 단순히 머리 피부에 존재하는 감각신경 노선을 통해 중추신경을 자극하게 된다는 한계와 단점을 보완하는 것이다.

경두개자극자극(TMS)을 결합한 두침의 효과를 증강하는 연구와 다양한 결론을 볼 수 있다. 예를 들어 일차운동피질 영역에 대한 반복 경두개 자기자극과 전정(GV21)과 현리(GB6)에 대한 두침자극은 각각 흰쥐의 허혈성 뇌졸중으로 인한 운동장애를 회복하는 효과를 나타냈지만, 두 자극을 병행하였을 때 회복의 시너지 효과는 관찰되지 않았다⁹⁾. 그러나 다른 연구 결과에서는 뇌졸중의 재활 치료에서 저주파 경두개자극자극을 결합한 두침이 단순한 두침치료에 비하여 대뇌 운동피질의 회복을 더욱 촉진하고 이로 인해 편마비로 인한 운동기능 실조의 재활치료 효과가 높았다¹⁰⁾. 최근 경두개자극은 자기뿐만 아니라 직류나 교류전류를 이용한 전기자극 방식을 활용하기도 한다. 그리하여 다수의 동물실험연구에서 경두개 전기자극이 뇌졸중 실험모델에서 운동기능의 회복을 촉진시킬 뿐만 아니라 대뇌피질의 혈류량을 증가시키고 신경가소성과 관련되어 단백질의 발현 증가와 더불어 신경세포의 생성(neurogenesis)을 초래함이 보고되었다⁷⁾.

신경세포는 다양한 원인에 의해 외상성, 허혈성, 퇴행성 손상을 받을 경우 세포자멸사(apoptosis)를 통해 비가역적인 기능적 손상을 초래하게 된다. 이 때문에 뇌허혈, 출혈 또는 퇴행성 뇌질환에서 신경세포의 자멸사를 억제하거나 신경세포를 보호하는 한약제제에 대한 연구와 관심이 늘고 있다. 그 중 황금(黃芩, *Scutellaria baicalensis*)는 항산화효과 뿐만 아니라 뇌허혈에 대한 신경방어효과와 함께 세포자멸사를 억제하는 연구 결과가 주목 받고 있다. 특히 황금의 baicalein, baicalin, oroxylin, wogonin 성분을 통해 신경세포의 손상을 보호하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 황금의 약리적 효능을 높이기 위하여 다양한 발효법이 응용되고 있는데, 발효된 황금(fermented *Scutellaria baicalensis*, FSA)은 baicalein, wogonin, oroxylin의 성분이 더욱 증가되며, 효능의 증가는 발효과정에서 황금의 주요성분들 중 Baicalin이 baicalein으로, wogonin이 wogonin으로 전환되어 baicalein 및 wogonin 농도의 증가에 기인하는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 특히 baicalein은 뇌혈관장벽을 보다 쉽게 통과하며 뇌에서 다양한 생리활성 작용을 보인다. Baicalein과 oroxylin은 신경가소성에 관여하는 brain-derived

neurotrophic factor (BDNF)에 생성에 관여하는 것으로 보고되었다¹³⁾.

일반적으로 한의학 의료영역에서 치료는 침구치료와 약물치료를 목적과 작용에 맞춰 병행하는 것이 일반적인 방식이며, 그에 따라 치료효과의 시너지를 추구한다. 뇌졸중에서 한약과 침구치료의 병행이 치료 효과에서 시너지를 보여줄 것이라 기대할 수 있다. 그러나 아직까지 이와 같은 병행치료에 대한 기초 선행연구를 찾아보기 어렵다.

이에 본 연구는 두침영역에 경두개전기자극을 가하면서 신경가소성의 촉진을 유도할 수 있는 발효황금 경구투여를 병행하는 조건에서 치료효과 여부를 확인하고자 하였다. 이를 위해 흰쥐에서 다리의 감각운동영역 대뇌피질에 상응하는 두침 부위에 경두개전침과 발효황금 경구투여를 병행치료함으로써 국소적 뇌경색으로 야기된 신경세포 손상과 저하된 운동기능이 회복되는 과정을 관찰하였다. 또한 전기생리학적 기법과 thallium autometallography 기법을 사용하여 대뇌 피질의 신경세포의 흥분성의 변화를 관찰하였다.

실험방법

1. 실험동물

실험동물로 체중 250 g의 성숙한 Sprague-Dawley계 수컷 쥐(Samtako, Osan, Korea)를 사용하였다(n=53). 실험 7일 전부터 실험실 환경에 적응시켜 환경변화에 따른 영향을 최소화하였다. 모든 동물실험은 원광대학교 실험동물관리위원회 규정에 의거하여 시행하였다. 사육실 평균온도는 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 55%로 유지하였으며 12시간 간격으로 명암을 조절하여 07:00부터 19:00까지 조명을 제공하였고 물(membrane filtered purified water) 섭취는 제한하지 않았다.

실험동물군은 다음과 같이 3개로 구분하였다. ① 허혈을 위한 시술과정을 모두 진행하였으나 허혈을 유발하지 않은 sham군(sham, n=15), ② 대뇌피질에 허혈을 가한 허혈손상군(ISC, n=15), ③ 허혈 손상 후 경두개 전침(TEA)과 발효황금을 경구 투여(FSB) 병행치료군(TEA-FSB, n=15).

2. 광화학적 뇌경색에 의한 뇌 손상 유도(photothrombotic brain infarction; PTI)

대뇌 운동피질에 국소 허혈성 뇌손상을 유발하기 위하여 광화학적 혈전 생성에 의한 폐쇄성 뇌경색을 유발하였다. 실험동물을

ketamine (100 mg/kg)으로 마취후 정위두부고정장치(David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA)에 양와위 상태에서 머리를 고정하였으며, 되먹임 온도조절 방식(Homeothermic blanket system, Harvard Apparatus Ltd, Holliston, MA, USA)을 이용하여 체온을 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지한다. 머리의 정중선을 3.5 cm 절개 하여 두피를 양쪽으로 벌린 후 골막을 박리하여 두개골을 노출시킨 다음 좌측 대뇌 반구에 직경 4 mm의 광섬유 말단 조사부를 전정(bregma)으로부터 전방 1.5 mm, 측방 3.0 mm 점에 위치하도록 밀착 고정한다. 후 열 발생이 없는 할로겐 광원백색광(150 W, Illuminator-Halogen FOK-150X/150R, Fiber Optic Co, Cheonan, Korea)를 사용하여 강도가 1.0 W/cm^2 인 백색광을 조사하였다. 허혈 손상 부위는 Paxinos와 Watson¹⁴⁾에 의한 백서의 뇌지도에서 일차 운동피질 부위를 선정하였다. 빛 조사 시작 2분 후 빛의 조사상태에서 Rose bengal dye(20 mg/kg, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Missouri, USA)를 꼬리 정맥을 통하여 2분에 걸쳐 천천히 주입하였고 이후 28분 동안 빛 조사를 지속하여 광화학적 뇌경색을 유발하였다. 수술이 끝난 후 수술부위를 봉합, 소독하고 소염제를 주사하였다.

3. 발효황금 추출물의 제조 및 투여

발효황금의 제작 및 추출은 양 등¹⁵⁾의 방법으로 진행하였다. 간단하게 서술하면 분쇄된 건조 황금을 효모균(Saccharomyces cerevisiae) 및 매실효소 배양액에 24시간 동안 침지하고, 발효용기에 넣고 $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 에서 3일간 발효시켰다. 이후 위와 같은 방법을 2회 이상 실시하여 총 3차 발효하였다. 계속하여 발효용기 내에서 $40 \sim 50^\circ\text{C}$ 에서 $50 \sim 60\%$ 의 습도를 유지하면서 대류열을 이용한 습식가열과 대류열 순환방식을 3일 동안 번갈아 시행하여 숙성단계를 진행하였다. 숙성단계를 거친 후 $35 \sim 45^\circ\text{C}$ 에서 3일 동안 건조하여 발효황금을 제조하였다. 이후 추출 과정은 세척이 끝난 발효황금을 추출기에 넣고 50% 에탄올을 가하여 $80 \sim 90^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 1차 추출하고, 다시 30% 에탄올을 가하여 동일온도에서 12시간 동안 2차 추출한 후, 여기에 정제수를 사용하여 동일온도에서 12시간 동안 3차 추출하였다. 여과과정은 추출액을 단계적으로 여과기에 넣어 $70 \sim 80^\circ\text{C}$ 에서 감압 여과하였다. 여과된 추출액을 농축기에 넣고 500~700 mmHg 감압을 유지하면서 60°C 에서 농축하여 고형분 65% 이상의 농축액을 얻었다. 이후 멸균 처리 후 분무 건조하였다. 허혈 손상 시술 후 3일째부터 매일 한차례 일정한 시간인 오전 10시경에 제조된 발효황금 추출물을 100 mg/kg 용량으로 경구로 3주간 투여하였다.

4. 경두개전침자극과 두침(scalp acupuncture & transcranial electro-acupuncture)

1) **경두개전침**: 경두개전침 및 FSB 병행치료군(n=15)에서 두침 자극을 위하여 본 연구실에서 개발된 실험동물용 경두개전침자극 시스템(transcranial electro-acupuncture stimulation system)을 사용하였다(특허출원: 10-2018-0122663). 본 실험에서 사용한 경두개전침 자극시스템을 간략하게 설명하면, 1) 전침 전극부, 2) 전기자극기 및, 3) 전원으로 구성되며, 미세전류의 사인파가 두개골을 경유하여 대뇌피질의 흥분성에 영향을 주는 장치이다(Fig. 1). 이를 위하여 2개의 소형 자극용 전극을 머리뼈에 부착해 고정할 수 있는 장치와 마이크로프로세서와 소형 전원을 사용하여 정전류 방식으로 자극 파라미터를 20 Hz 사인 교류파, 200 μ A의 전류세기로 설정하였다.

또한 전기자극기의 마이크로프로세서를 이용하여 허혈손상 3일째부터 매일 1회 20분 동안 자극하며 이를 2주 이상 지속할 수 있도록 하였다. 이때 사용한 자극 파라미터는 20 Hz의 경두개자극으로 대뇌피질을 흥분시키고, 50 μ A 이상의 전류세기가 흰쥐의 머리뼈를 통과하여 피질의 흥분성에 영향을 미칠 수 있다는 선행연구의 결과를 근거로 하였다¹⁶⁾. 또한 1회 20분으로 자극시간을 설정하였는데, 기존 연구에서 사람을 대상으로 적용되는 경두개자극법에서 많이 사용하는 자극시간이다¹⁷⁾.

2) **두침부위**: 허혈손상 후 전침전극부에 부착되어 있는 자극전극은 2개의 스테인레스 강철선(두께 1 mm, 길이 3 mm, 간격 4 mm)을 사용하였다. 2개의 전극은 전기전도성을 향상시키기 위하여 전도성 젤을 도포한 다음 순간접착제와 acrylic resin을 사용하여 머

리뼈에 고정하였는데 이때 다리의 감각운동영역에 전류가 인가될 수 있도록 1개의 전극은 전정(bregma)으로부터 전방 1.5 mm에 위치하였다. 다른 1개의 전극은 전정(bregma)으로부터 후방 2.5 mm 지점에 위치시켰다. 이 부위는 WHO/WPRO에서 정한 ‘두피 침혈명칭 국제표준’에 따라 두정구(頭頂區) 정방 I선(MS8)과 정방 II선(MS9)에 해당된다. 정방 I선은 백회(百會)와 전정(前頂)을 잇는 직선(정중선, MS5)에서 가쪽 1.5촌에 위치하며通天(通天)에서 뒤쪽으로 1.5촌에 이르는 영역이다. 정방 II선은 정중선(MS5)에서 가쪽 2.25촌에 위치하면 정영(正營)에서 승령(承靈)에 이르는 1.5촌의 영역이다. 그리고 전기자극기를 전침전극부에 부착한 다음 dental cement를 사용하여 다시 한 번 자극기를 도포하여 누수가 되지 않도록 하였다. 이때 전기자극기를 고정 후 dental cement를 도포하기 전에서 전기자극기의 전원을 켜(ON) 상태로 하여 전기자극기가 작동하도록 하였다. 한편 테플론 피복 강철선(직경 0.3 mm, WPI, Sarasota, FL, USA)을 사용하여 전기자극기에 연결된 전원 배터리(직경 12 mm)는 뒷목부위 피부 밑에 삽입 고정하였다. 이때 인체에 무해한 실리콘(Mastersil 153Med, Masterbond, Hackensack, NJ, USA)로 배터리를 도포하여 장기간 생체내 삽입하여 작동할 수 있도록 하였다. 또한 2주 이상 전기자극이 가능하도록 100 mA/h의 용량을 갖는 2개의 배터리(3 V lithium battery)를 병렬 연결하여 뒷목 부위 피부 밑에 삽입하였다(Fig. 1).

5. 행동검사

1) **회전봉 운동능력 검사(rotating beam performance test)**: 일반적으로 많이 사용하는 로타로드 운동능력 검사(Rota rod per-

Fig. 1. Implantation and stimulation of transcranial electroacupuncture (TEA) device.

(A) Schematic diagram showing location of stimulation electrodes for TEA stimulation. Two stimulation electrodes with 3 mm of length were fixed on the skull covering sensorimotor cortex ipsilateral to focal ischemia. (B) Custom-made implantable TEA device with 12 mm of diameter consists of stimulating electrode, battery, the stimulator that has micro controller to automatically set stimulation frequency and time. (C) Schematic diagram showing implantation of TEA device. Both stimulating electrodes and stimulator were fixed on the skull and then battery was located under skin of neck region.

formance test)의 변형된 형태로 본 연구실에서 제작한 Rota rod를 사용하여 균형 및 협응력을 평가하였다. 본 연구에 이용된 Rota rod 기구는 길이 1 m, 직경 3 cm의 회전봉(beam)을 1 m 높이에 설치하고 스텝핑 모터를 사용하여 회전봉의 회전시간과 회전수를 제어하였다. 이때 회전 시간은 최대 2분, 회전수는 최대 15 RPM으로 설정하였다.

모든 실험동물은 허혈손상을 위한 수술 전 7~9일 째부터 매일 오전 오후에 각 1회씩 회전봉에서 운동을 실시하여 15 RPM에서 2분간 지속적으로 걷을 수 있도록 하였다. 이때 훈련도중 1 m 높이의 회전봉에서 걷지 못하고 낙상하는 경우가 있어서 바닥에 스폰지 매트를 깔아 실험동물이 신체적 손상이 가지 않도록 하였다. 이러한 운동 훈련을 통하여 시술 전날까지 15 RPM의 회전봉에서 2분간 지속적 운동하지 못하고 낙상하는 실험동물은 본 실험에서 제외하였다.

시술 후 3일째부터 회전봉에서 운동능력은 15 RPM의 회전봉에서 운동능력 저하로 낙상하는 데 걸리는 시간으로 평가하였으며, 2회 실시하여 평균값을 산출하였다. 한편, 각 실험동물은 2일 간격으로 회전봉 운동검사를 실시하였다.

2) 수평 사다리 걷기 검사(Horizontal ladder walking task): MacLellan 등¹⁸⁾의 실험방법을 일부 수정하여 본 연구실에서 자체 제작한 수평사다리를 사용하였다. 수평 사다리는 두 개의 투명 아크릴판(길이 1 m, 높이 15 cm, 두께 5 mm, 판 사이 간격 7 cm)에 두께 2 mm 강철봉(길이 10 cm)을 불규칙적 간격으로 삽입하여 제작하였다. 이때 강철봉 사다리 사이 간격은 0, 2, 4 cm로 불규칙하게 만들었다.

모든 실험동물은 허혈손상 7일 전부터 회전봉 운동 훈련이 끝나고 매일 수평 사다리 걷기 훈련을 실시하였다. 허혈 손상 1일 전에 사다리를 걷는 동작을 액션캠(action cam, SONY, Japan)으로 촬영하였다. 이러한 사다리를 걷는 동작을 3회 실시하였다. 이후 1명의 관찰자로 하여금 사다리를 걷는 동안 우측 상지가 잘못 짚어 미끄러지는 빈도(forelimb fault)를 측정하게 하였다. Fault 점수는 다음과 같은 식으로 환산하였다.

Foot fault score(%)=[contralateral forelimb fault/contralateral forelimb steps]×100

6. 다채널 세포의 전기생리학적 기록법

1) 테트로드 전극제작: 대뇌피질의 신경세포의 활동전위인 spike를 기록하기 위한 테트로드 전극 제작을 위해 Polyamide로 코팅된 전극(A-M system, Carlsborg, WA, USA)을 5 cm길이 간격으로 4가닥으로 겹쳐 제작하였다. 4가닥의 니크롬선을 고정된 다음

30회 회전하여 4가닥 니크롬 전극을 서로 강하게 꼬아 전극들이 서로 잘 접착되도록 하였다. 소형 열풍기를 이용하여 꼬인 4 가닥의 전극에 정도의 열을 가하여 전극들이 서로 접착되도록 하였다. 테트로드를 자체 제작한 PCB전극 프로브에 고정하고 테트로드의 일측 니크롬 전극 끝 부분의 피복을 벗긴 다음 PCB전극 프로브의 전극 연결부에 납땜하여 고정하였다. 신경세포가 접촉하는 반대측 테트로드 끝단을 미세강철가위로 절단한 후 10% 금(gold) 용액(Neuralynx, Bozeman, MT, USA)에 삽입하고(electrical stimulator, A310 WPI, Sarasota, FL, USA)에 전극프로브를 연결한 다음 미세전류 2 μ A를 2~10초간 통전하여 테트로드의 니크롬선 끝단을 금으로 도금하여 니크롬 전극의 저항값을 낮추었다. 임피스기록계(IMP-2A, Bak Electronics Inc, Umatilla, FL, USA)를 이용하여 도금된 개별 니크롬 전극의 저항이 300~500 k Ω 사이의 전극을 사용하였다.

2) 다채널 세포의 전기생리기법 기록: 실험동물을 전신 마취 시행 후 뇌정위술장치(Narishige Co., Tokyo, Japan)에 실험동물의 머리뼈를 고정시킨 후 머리 피부를 절개하고 머리뼈를 노출시켰다. 전동미세드릴을 사용하여 머리뼈를 절단한 다음 경막을 절개하여 대뇌피질을 노출시켰다. 수술현미경하에서 전동 미세전동조작기(Narishige Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 테트로드 전극을 다리 감각운동영역(hindlimb sensorimotor area; AP: -2.0 mm, L: -2.0 mm, Depth: -1.0~-1.5 mm from bregma)에 삽입하였다. 16채널의 신호증폭기(RHA2000 amplifier chips, Intan Tech, LA, CA, USA)을 사용하여 테트로드 전극에서 기록되는 신경 세포들의 활동전위를 증폭하였으며 증폭된 신호는 A/D 변환기(USB interface board, Intan Tech, LA, CA, USA)를 통하여 컴퓨터에 전달되었다. 컴퓨터의 A/D 변환기 제어 프로그램을 사용하여 증폭된 전기신호를 300~3000 Hz의 주파수 대역으로 필터하여 spike 파형의 전기적 신호만 검출하였다. 검출된 spike 신호는 다시 다른 유형의 A/D 변환기(CED 1401, CED Co., Cambridge, UK)를 경유하여 spike의 기록 및 분석이 가능한 프로그램(Spike 2, version 6, CED Co., Cambridge, UK)에 저장하였다. 이때 spike 기록시 A/D 변환기의 샘플링 속도를 25 kHz로 설정하여 왜곡이 일어나지 않도록 하였다. Spike를 구분하기 위하여 기저 노이즈 수준의 배 높이의 역치값에서 spike를 기록하였다.

3) 테트로드 전극의 위치 확인: 테트로드 전극의 위치를 확인하기 위하여 실험이 끝난 후 전기조직손상장치(direct constant current lesion maker, Grass Instrument, Quincy, MA, USA)를 사용하여 테트로드 전극을 통하여 100 μ A의 양극 직류전류를 20초 동안 통전하여 뇌조직을 손상시켜 전극의 위치를 표시하였다. 실험

동물을 깊게 마취시킨 후 심장을 통해 4% paraformaldehyde 조직 고정액으로 관류시켜 뇌를 고정한 다음 적출하였다. 적출한 뇌는 다시 조직고정액에 24시간 동안 추가 고정한 다음 20% sucrose 용액에 2~3일 동안 보관하였다. 동결조직절단기(HM525 NX Cryostat, ThermoFisher Sci, Waltham, MA, USA)를 사용하여 뇌 조직을 40 μ m 두께로 관상 절편을 만들고 cresyl violet으로 염색한 후 현미경(BX41, Olympus, Tokyo, Japan)을 통해 전극의 유입 경로와 피질에서 전기손상 부위를 확인하였다.

4) Spikes의 자료분석: 테트로드 전극에서 동시에 기록된 4개의 spike를 같은 형태로 분류하기 위하여 Spike 2 프로그램의 template-matching spike sorting 알고리즘을 사용하였다. 이때 spike의 구분은 spike 진폭이 기저 노이즈 수준(S/N ratio)의 3배 이상 크기를 보이는 spike만을 선택하였다. 또한 spike 선택을 위해 spike의 시간 범위는 spike 발생 전 0.3 ms에서 spike 후 1.0 ms로 총 1.3 ms의 구간에서 선택한 후에, 4개의 전극에서 검출되는 spike의 유사도에 따라 2~3개의 spike로 구분하였다. 분류된 spike들은 Spike2 프로그램에 내장된 Principal Component Analysis (PCA) 알고리즘과 방법을 사용하여 통계적으로 spike들이 일정한 형태의 spike로 분류하였다. 이후 각 단일 spike를 분리한 다음 전기생리학적 특성화 분석을 실시하였다. 각 spike의 전기생리학적 특성화는 spike 파형의 valley to peak time과 half-valley time을 산출하여 이들 시간과의 상관성을 통하여 spike 파형의 시간 범위를 분석하였다. 분류된 신경들의 발화 패턴을 분석하기 위해서 1 ms 간격 사이즈의 Inter-Spike Interval와 autocorrelation을 분석하였고 이를 통하여 분류된 신경 신호의 발화 특성을 비교하였다.

7. Thallium autometallography

각 실험군에서 무작위로 선택된 5마리의 뇌조직에서 thallium autometallography 염색을 실시하였다. 본 연구의 thallium autometallography 염색은 위한 Goldschmidt 등¹⁹⁾이 제시한 방법에 따라 진행되었다. 간단히 상술하면 운동검사 후 실험동물을 urethane으로 전신 마취후 0.05% TIDDC 용액(1 ml)을 수술 현미경 하에서 한쪽 넙다리정맥으로 주입하였다. 주입 15분후에 다량 마취약으로 전신마취하여 실험동물을 희생시킨 다음, 0.325% Na₂S 용액과 0.16% Na₂S+3% glutaraldehyde 혼합액으로 심장관류하여 뇌를 고정한 다음 수술 현미경하에서 두개골로부터 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌를 30% sucrose 용액에 2일간 방치한 다음 동결조직절단기(HM525 NX Cryostat, ThermoFisher Sci, Waltham, MA, USA)를 사용하여 뇌조직을 25 μ m 두께로 관상 절편하여 뇌절편

을 제작하고 슬라이드 글라스에 부착하였다. 뇌 절편을 0.1 N 염산 용으로 30분간 반응하고 증류수로 세척 후 건조하였다. 50% Gum arabic+0.1M citric buffer+hydroquinone(0.03 g/ml)+silver lactate(0.005 g/ml)으로 구성된 발색액을 뇌 절편에 처리하여 암실에서 2시간 반응시켰다. 이후 증류수로 발색액을 세척하고 슬라이드를 충분히 건조시켰다. 슬라이드 글라스에 부착된 뇌절편을 단계적 ethanol 처리와 xylene 처리 후 Canada balsam 이용하여 커버글래스로 뇌절편을 덮고 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 thallium 염색 정도를 관찰하고 그 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

대뇌의 다리 감각운동영역에서 신경세포들의 thallium 염색 정도를 정량적으로 분석하기 위하여 자동영상분석프로그램(Image J, Madison, Wisconsin, USA)을 사용하였다. Thallium 염색을 통해 감각운동 영역의 신경세포층에서 layer IV와 V의 존재하는 피라미드세포의 thallium 염색 정도를 정량적으로 비교 분석하였다. 이를 위하여 다리 감각운동영역의 layer IV와 V층에서 일정 영역(길이 500 μ m×폭 200 μ m)에서 thallium 염색의 gray scale값을 산출하였다. 한편 실험조건의 차이에 따른 실험동물 사이에 뇌절편의 thallium 염색 정도가 약간의 차이를 보였다. 이러한 실험동물간의 염색강도의 차이를 교정하기 위하여 뇌절편내에서 대뇌피질 이외의 다른 영역 즉, 허혈손상을 가하지 않은 우측 선조체(striatum)에서 thallium 염색의 gray scale값을 산출하였다. 본 연구에서 우측 선조체를 선택한 이유는 선조체에서 thallium 염색이 매우 강하였고, 우측 대뇌피질의 허혈손상에 신경세포의 흥분성에 거의 영향을 받지 않았다. 따라서 다음과 같은 공식을 사용하여 각 실험동물의 뇌절편의 다리 감각운동영역에서 thallium 염색을 정량적으로 표현하였다.

다리감각운동영역의 thallium량(%)=[average gray scale value of layer IV~V/gray scale of striatum]×100.

8. 통계 분석

Mann-Whitney U test와 일원 배치 반복측정 분산분석(one way analysis of variance with repeated measure, ANOVA)을 사용하여 확인하였으며, Tukey 방식으로 사후 검증을 실시하고 실험군간의 통계적 유의성은 p 값이 0.05 이하로 간주하였다.

실험결과

1. 영구적 중대뇌동맥 폐색 모델 제작

53마리의 쥐들 중에 46마리의 성공한 동물 모델을 얻었으며 수

술 3일째 행동검사를 통하여 성공여부를 확인하였다. 46마리 중 1마리가 시술 5일째 사망하였으며 나머지는 뇌 허혈손상 21일째까지 모두 생존하였다.

2. 행동학적 평가

1) **Horizontal ladder 검사:** 각 실험군에서 뇌 허혈손상을 유발하기 전에 1주일 동안의 사다리 건너를 훈련을 실시하여 통하여 horizontal ladder 검사에서 사다리를 건너는 동안 우측 상지의 실수율을 측정하였다.

뇌 허혈손상을 유발하기 전에 허혈손상군(ISC)과 경두개전침 및 발효황금 병행치료군(TEA-FSB)에서 오른쪽 앞다리의 실수율은 평균 $5.5 \pm 4.9\%$ 수준으로 유의한 차이는 없었다. 한편 허혈손상 후 모든 실험동물에서 손상 초기에 실수율이 증가하였고 시간의 경과에 따라서 회복되었다. ISC군의 실수율 변화는 허혈손상 3일째에 $42.7 \pm 1.5\%$, 7일째에 $33.5 \pm 9.2\%$, 14일째에 $25.8 \pm 10.1\%$, 21일째에 $16.1 \pm 7.6\%$ 을 보였다. TEA-FSB군의 실수율의 변화는 허혈손상 3일째에 $43.8 \pm 11.5\%$, 7일째에 $31.3 \pm 9.1\%$, 14일째에 $17.8 \pm 7.9\%$, 21일째에 $11.37 \pm 4.8\%$ 을 보였다. 각 검사 시간에서 두 실험군의 실수율을 통계학적으로 비교하였을 때 허혈손상 14일째 TEA-FSB군이 ISC군보다 실수율이 유의하게 감소하였다(Fig. 2) ($p > 0.05$).

2) **회전봉 운동 검사(rotating beam performance test):** 모든 실험동물은 뇌허혈손상 유발 전 1주일 동안 회전봉(15RMP)에서 2분 이상 운동검사 훈련을 하였고, 뇌졸중 유발 3일 후부터 2일 간격으로 회전봉 운동검사를 실시하였다.

회전봉 운동검사에서 뇌 허혈손상 유발 3일 후 ISC군에서 낙상까지 운동시간은 5.1 ± 2.3 초이며 TEA-FSB군은 7.1 ± 1.8 초로 두 실험군 사이에 유의한 차이는 없었다. 허혈 손상 7일째에 TEA-FSB군에서 운동력이 약간 증가하였으나 두 실험군에서 운동시간에 유의한 차이는 없었다. 그러나 허혈손상 14일 후 ISC군에서 낙상까지 운동시간은 88.3 ± 9.4 초였고 TEA-FSB군은 110.3 ± 7.9 초로 두 실험군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 그러나 허혈손상 21일 후 두 실험군 사이에 운동시간에 유의한 차이가 없었으며 허혈손상 전의 운동능력으로 회복되었다(Fig. 3). 한편 sham군에서 수술 후 3, 7, 14, 21일째에 horizontal ladder 검사 및 회전봉 운동검사에 운동기능의 저하는 관찰되지 않았다.

3. 하지 감각피질영역에서 잠재적 피라미드 신경세포의 자발 발화성

테트로드 전극을 이용한 다채널 세포외 기록법을 이용하여 다리 감각운동피질영역(hindlimb sensorimotor)에서 단일 신경세포의 spike 파형을 기록하였는데 4개의 전극에서 서로 다른 형태의 spike 파형이 관찰되었다. 하나의 신경세포의 활동전위에 동시에 4개의 기록 전극에서 기록되는데 이때 신경세포의 위치가 4개의 기록전극과 거리적 차이가 있어서 spike 형태가 다르게 기록되었다(Fig. 4). 한편 PCA알고리즘과 K-mean 방법을 사용하여 통계적으로 spike들을 일정한 형태의 spike로 분류했을 때 1개 테트로드 전극에서 2~4개의 spike가 통계적으로 유의하게 분류되었다.

허혈손상을 가하지 않은 sham군($n=5$)에서 50개의 단일 spike를 파형에서 valley-to-peak time과 half-valley time을 산출하였

Fig. 2. Effect of combination of TEA and fermented *Scutellaria baicalensis* (FSB) extract treatment on forelimb foot fault on horizontal ladder walking task following focal ischemic (ISC) stroke.

(A) Upper photograph shows normal walking on horizontal ladder before stroke. Lower one, rat receiving stroke shows forelimb fault (arrow) during the ladder walking. (B) Comparison of time-dependent changes in forelimb faults from 3 experimental groups. A forelimb foot fault was defined as a complete miss or slip from the rung. Foot fault score was calculated by percent ratio of contralateral forelimb fault to contralateral forelimb steps. ISC, ischemia group; Pre, pre-operation. Values are mean $\pm$ S.D. from 7 rats of each group. *Denote significant difference between ISC group and TEA+FSB group ($*p < 0.05$).

Fig. 3. Effect of combination of TEA with FSB treatment on motor recovery on rotating beam performance test following focal ischemic stroke.

(A) Photograph shows walking on rotating beam. (B) Comparison of time-dependent changes in motor recovery from 3 experimental groups. Motor recovery of rat at this test was evaluated by total walking time on rotating beam with 15 rpm of rotating speed within 120 sec. Other notations are the same as in previous figure.

Fig. 4. Electrophysiological characterization of spikes recorded from the hindlimb sensorimotor cortex adjacent to ischemic injury.

(A) Typical 4 different wave forms and typical distributions of firing pattern from interspike interval histogram and autocorrelogram from putative interneurons and putative pyramidal neurons, respectively. (B) Comparison of two spikes with different time duration of half valley width and of valley to peak width. (C) Plot of valley-to-peak time by the number of neurons. Neurons appeared to form clusters above and below 0.5 ms valley-to-peak time, consistent with others (Barthó et al., 2004). Spike with more 0.5 ms valley-to-peak time was considered as putative pyramidal neuron in the cortex.

다. 이때 spike의 half-valley time은 0.15 ms~0.62 ms으로 평균 값은 0.35 ms 였다. valley-to-peak time은 0.3 ms~1.15 ms에 분포하며 평균값은 0.19 ms였다. 이때, 2개의 spike를 제외한

대부분의 spike의 valley-to-peak time은 0.6 ms~0.85 ms에 분포하였다. 한편 trough-to-peak 기간과 half-valley 기간과의 상관성에서 trough-to-peak time이 길수록 half-valley 기간도 길어

졌다. 따라서 Barthó 등²⁰⁾의 신경세포 분류법에 의하여 0.5 ms 이상을 보이는 spike를 잠재적 피라미드 신경세포(putative pyramidal neurons)로 간주하였으며 50개의 spike 중 96% spike가 잠재적 피라미드세포에 해당되었다. 0.5 ms 이내의 spike를 잠재적 중간신경세포(putative interneuron)으로 간주하였다. Spike의 auto-correlogram에서 잠재적 피라미드 신경세포는 불규칙적 발화 현상을 보였으나 잠재적 중간신경세포는 규칙적 발화 현상을 보였으며 명확한 차이를 보였다. 이들 신경세포의 자발 발화율(spontaneous firing rate)는 1.2~20 Hz을 보였으며 평균값은 10.2 ± 3.5 Hz을 보였다. 한편 이후 허혈손상 후 다리 감각운동피질 영역에서 신경세포의 흥분도 측정은 잠재적 피라미드세포를 대상으로 진행하였다.

행동검사에서 유의한 차이를 보였던 허혈손상 13~15일째 각 실험군(n=5)에서 감각운동피질영역에서 25개의 잠재적 피라미드세포를 대상으로 자발 발화율을 측정하여 분석하였다. 허혈손상군(ISC)의 감각운동피질영역에서 피라미드 신경세포의 자발 발화율의 분포는 1.2~14.5 Hz를 보였으며 이때 평균값은 6.7 ± 4.5 Hz였다. 이에 반하여 TEA-FSB군의 자발 발화율의 분포는 1.2~18.1 Hz를 보였으며 평균값은 8.7 ± 3.8 Hz(n=25)였다.

한편 ANOVA 검사에서 sham, ISC과 TEA-FSB 실험군 사이에 자발 발화율이 유의한 차이($p < 0.01$)을 보였다. 사후검증에서 sham군의 자발 발화율과 비교하여 ISC군의 자발 발화율이 유의하게 감소하였으나($p < 0.01$), TEA-FSB군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 ISC군과 TEA-FSB군을 비교하였을 때 TEA-FSB군에서 ISC군보다 자발 발화율의 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 5, 6).

Fig. 5. Representative multi-unit recordings showing changes in spontaneous firing activities of putative pyramidal neurons in the hindlimb sensorimotor cortex adjacent to ischemic injury from 3 experimental groups about 2 weeks following the surgery.

Compared with sham operated animal, rat with focal ischemic stroke show lower activity of spontaneous firing of putative pyramidal neurons. Whereas, the combination of TEA with FSB treatment increased spontaneous firing activities of cortical neurons in peri-infarct area.

4. Thallium automethallography 염색을 통한 감각피질영역의 신경세포 흥분도

각 실험군(n=5)에서 운동검사 직후에 실험동물을 마취하여 0.05% TIDDC 용액을 한쪽 넙다리정맥으로 주입하였다. 그리고 10분 후에 실험동물을 희생하여 thallium 염색을 실시하였다(Fig. 7).

Sham군의 다리 감각운동영역에서 신경세포층의 구분에서 따라 thallium 염색이 다르게 관찰되었다. 피질의 가장 바깥층인 layer I에서는 thallium 염색이 거의 이루어지지 않았으며 layer II와 III에서는 일부 신경세포에서 thallium 염색이 되었으나 세포층 전반적으로 암갈색의 염색을 보였다. 한편 layer IV와 V에서는 신경세포들의 thallium 염색이 뚜렷하였다. 이때 신경세포체 뿐만 아니라 수상돌기에서도 뚜렷하게 염색되었다. 그리고 세포체의 크기가 크고 수상돌기의 형태로 피라미드세포로 분류되었다. 또한 layer VI에서는 세포의 크기가 작은 세포들의 세포체에서 주로 염색되었으

Fig. 6. Bar histogram depicting changes in firing rate of putative pyramidal neurons of 3 experimental groups. Values are mean $\pm$ S.D. from 25 neurons in each group.

Firing rate of putative pyramidal neurons of TEA+FSB group was higher than that of ISC group but there was no statistically difference between two groups.

Fig. 7. Representative photographs showing regional distributions of thallium(Tl^{+}) - positive cells in hindlimb sensorimotor cortex(S1HL) of 3 experimental groups.

Compared with sham-operated animal, animal with ischemic(ISC) stroke showed lower staining intensity for Tl^{+} in the cortex. In contrast to, combination of TEA with FSB treatment increased staining intensity for Tl^{+} in the cortex.

Fig. 8. Bar histogram depicting image analysis of Tl^{+} uptake in the layer IV~V of the hindlimb sensorimotor cortex of 3 experimental groups.

Percent of Tl^{+} uptake was calculated by percent ratio of average gray scale value of the layer IV~V to that of the striatum. Values are mean ± S.D. of 5 rats in each group. There was a significant difference of the intensity of Tl^{+} uptake between ISC group and TEA-FSB group (** $p < 0.01$).

나 수상돌기에서 thallium 염색이 뚜렷하지 않았다. 본 연구에서는 일정한 면적의 다리 감각운동영역의 layer IV와 V에 존재하는 피라미드세포의 thallium 염색 정도를 비교 분석하였다(Fig. 8). 그리고

선조체의 thallium 염색 정도에 대한 layer IV와 V의 피라미드세포의 염색정도를 상대적으로 비교분석하였을 때, sham군의 탈륨염색 정도는 $94.5 \pm 6.1\%$, ISC군은 $64.2 \pm 8.9\%$, TEA-FSB군은 $87.3 \pm 7.9\%$ 를 보였다. ANOVA 검사에서 각 실험군 사이에 유의한 차이가 있었으며($p < 0.01$), Tukey 사후 검사에서 sham군과 ISC군, ISC군과 TEA-FSB군 간에 유의한 차이를 보였다. 그러나 sham군과 TEA-FSB군 사이에는 유의한 차이는 없었다. 따라서 TEA-FSB 병행치료가 대뇌피질 허혈손상 후 신경세포의 흥분성의 증가에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

고 찰

본 연구결과를 종합하면 경두개전침 및 발효황금 병행치료가 뇌졸중 유발 후 운동기능의 회복을 촉진하며, 동시에 허혈손상 주변의 대뇌 피질의 신경세포의 흥분성을 증가시키는 효과를 보였다. 본 실험은 horizontal ladder 검사 및 회전봉 운동검사에서 허혈손

상 후 14일이 경과하는 때부터 뇌허혈손상군과 비교하여 경두개전침 및 발효황금 경구투여 병행치료군에서 운동기능의 회복이 유의하게 관찰되었다. 그러나 손상 21일 후 운동기능의 회복이 병행치료군에서 허혈손상군보다 증가되었으나 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 경두개전침 및 발효황금 경구투여 병행치료가 뇌졸중 초기에 운동기능의 빠른 회복을 촉진시킬 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 허혈손상 13~15일째 감각운동피질영역에서 잠재적 피라미드 신경세포의 자발 발화율을 측정하여 분석하였다. 이때 실험군 사이에 자발 발화율이 유의한 차이를 보였고 sham군의 자발 발화율과 비교하여 허혈손상군(ISC)의 자발 발화율이 유의하게 감소하였으나, 경두개전침 및 발효황금 병행치료군(TEA-FSB)에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 허혈손상군과 병행치료군을 비교하였을 때 허혈손상군보다 자발 발화율의 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

본 실험에서는 흰쥐의 대뇌피질 중 팔다리를 지배하는 감각운동영역에 국소적 뇌색을 야기하였는데, 손상부위가 정수리점(bregma)을 기준으로 다리의 감각운동피질영역이고, 경두개전침 자극이 다리의 감각운동피질영역에 해당하는 머리뼈 영역에 가하였다는 점에서 경두개전침자극이 가한 부위를 두침 영역으로 보면 정방 I선과 정방 II선에 해당하게 된다.

두침요법은 1950년 말에 시작된 침구치료법으로 머리위 피부에서 대뇌피질의 기능영역을 연계하여 자극하는 방법이다. 임상에서는 뇌질환을 비롯하여 진정, 진통 및 운동이나 감각장애의 개선에 이용되고 있다. 1983년 중국 침구학회는 '두피침자극부위 국제표준화'를 제안하였고, 1984년에 WHO/WPRD(WHO 서태평양 지역사무국) 회의에서 '두피침혈명칭 국제표준'으로 동의를 얻게 되었으며, 1989년에 WHO가 주최하는 '침구경혈부위 국제표준화'의 회의에서 공식 승인되었다¹⁾. WHO/WPRO가 정한 국제표준두침은 대뇌피질의 기능영역을 근거로 머리 피부 영역을 구분하여 액구(전두구), 두정구, 측두구, 침구(후두구)의 4개 영역에 14개의 선으로 구성되어 있다. 이 중 두정구(頭頂區)는 정중선(MS5, 두정선), 정방 I선(MS8, 두정 I선)과 정방 II선(MS9, 두정 II선)으로 구성되어 있다. 정중선은 백회(百會)와 전정(前頂)을 잇는 직선의 독맥 영역이며, 정방 I선은 정중선에서 가쪽 1.5촌에 위치하며 통천(通天)에서 뒤쪽으로 1.5촌에 이르는 족태양경 영역이다. 정방 II선은 정중선(MS5)에서 가쪽 2.25촌에 위치하는 정영(正營)에서 승령(承靈)에 이르는 1.5촌의 족소양경 영역이다. 정중선의 기준이 되는 전정(前頂)은 머리뼈의 시상봉합(sagittal suture)와 관상봉합(coronal suture)가 만나는 정수리점(bregma)에 부합한다.

일반적으로 뇌졸중에 대한 두침치료는 감각과 운동기능의 개선

과 뇌기능의 회복을 목표로 한다. 운동기능 개선을 위해 정섭전사선(MS6), 정방 I선(MS8), 정방 II선(MS9)을 자극하며, 감각기능 개선을 위해 정섭후사선(MS7)을 자극하고, 뇌기능 활성화를 위해 정중선(MS5)를 자극하는 것을 메뉴얼로 정하고 있다⁶⁾. 참고로 두침에서 정한 정섭전사선(頂顳前斜線)은 머리마루 측면에 위치하며 전정혈에서 현리혈까지 이은 선을 말한다. 이 연장선을 5등분하여 머리마루쪽 1/5는 하지마비를 치료하고, 가운데 2/3는 상지마비를 치료하고, 아래 2/5는 중추성 안면마비, 운동성 실어증, 뇌동맥경화 등을 치료한다. 정섭후사선(頂顳後斜線)은 정섭전사선과 평행하게 백회혈에서 곡빈혈까지 이은 선을 지칭한다. 이 연장선을 5등분하여 머리마루쪽 1/5는 하지 감각이상, 중간 2/5는 상지 감각이상, 아래 2/5는 얼굴부위 감각이상을 치료한다.

신경생리학 측면에서 두침은 얼굴과 머리에 분포하는 5번째 뇌신경인 삼차신경계를 자극하여 삼차신경로(trigeminothalamic tract)를 경유하여 대뇌피질의 체성 감각영역에 침자극을 전달하는 것으로 해석할 수 있다⁵⁾. 또한 정상 성인에서 팔다리 경혈에 대한 자침자극과 두침자극에 따른 체성감각피질의 활성화 변화를 관찰한 연구를 보면, 팔과 다리의 경혈(상양, 수삼리, 태충, 족삼리)에 자침한 경우 반대측 전두엽(frontal lobe), 중심앞이랑(precentral gyrus)과 양측의 두정엽, 중심뒤이랑(postcentral gyrus)와 일차체성감각피질(BA2)에서 활성화가 높았으며, 두침자극(감각구의 팔다리에 해당하는 4곳; 사신충, 승령, 천충, 각손)에서는 중심이랑(central gyrus)을 중심으로 활성화가 반대측의 중심뒤이랑과 중심앞이랑, 일차체성감각피질(BA3), 일차운동피질, 전두엽, 두정엽에서 팔다리 경혈 자침에 비해 활성화가 높았다⁶⁾. 이는 두침자극이 체성감각 및 체성운동의 대뇌피질까지 폭넓게 영향을 줄 수 있다는 점을 보여준다.

실제 여러 동물실험 및 임상연구에서 두침은 중추신경 장애를 개선하며, 뇌졸중의 초기에 신경 기능을 개선하는 효과를 보여주고 있다. 임상연구에 대한 메타분석 결과, 약물이나 재활 단독 치료에 비하여 두침과 함께 병행 치료가 된 경우에서 유의적으로 양호한 효과가 있음이 밝혀졌다. 다만 두침만을 이용한 단독치료에서는 다른 치료에 비하여 뚜렷한 효과를 아직 보여주진 못하였다²¹⁾. 그 결과에는 여러 요인으로 해석되고 있지만 현재 두침을 기존의 뇌졸중 치료법에 대한 부가적인 역할로서 한계를 고려해 약물치료를 포함해 다양한 치료기술과 병행하는 방식으로 질환치료에 두침의 활용을 제시하는 것이 합리적이다.

뇌졸중 모델에서 신경세포의 전기적 흥분성의 변화에 대한 연구가 많이 이루어지지 않은 실정이며, 다만 뇌졸중 유발 1주 이내에서 대뇌피질의 흥분성의 변화에 대한 소수연구가 진행되었다. 흰쥐의

감각운동영역의 고온손상 모델에서 손상 1일째부터 손상 인접부의 많은 신경세포들의 동시다발적 흥분에 의해 발생하는 local field potential의 저주파 특성의 강화와 함께 단일 신경세포들의 자발 발화율이 증가하는 경향을 보였다. 이러한 손상 인접부 대뇌 피질의 전기생리학적 변화는 축사 성장(sprouting)에 영향을 줄 수 있다는 연구결과를 발표하였다²²⁾. Zhang 등²³⁾은 중대뇌동맥(middle cerebra artery) 폐쇄 동물의 허혈손상 인접부(penumbra)에서 신경세포의 자발 발화율이 허혈손상 1일 이내에 유의하게 감소하였으며 시간이 경과되어 증가되는 되었다. 그러나 허혈손상 7일째에 허혈손상 전과 비교하여 신경세포의 자발 발화율이 유의한 감소를 보였다. 한편 중대뇌동맥(middle cerebra artery) 폐쇄 동물의 시상핵의 단일신경세포에서도 자발 발화율이 허혈손상 1주 이내에서 감소하였다가 시간이 경과되면서 증가되는 양상을 보였다²⁴⁾. 그러나 이는 허혈 손상 초기에 손상 주변부 대뇌피질의 신경세포의 흥분도에서 Carmichael 등의 결과와 다른 양상을 보였는데 이는 허혈손상 방법, 허혈손상이 일어나는 부위, 기록 부위 및 마취 등 다른 실험환경에 기인하는 것으로 추론하였다. 다만 본 실험결과와 선행 연구결과를 비교하면 허혈손상 주변부 대뇌피질의 신경세포의 흥분성이 허혈손상에 의해 변화하고 이러한 변화가 2주 이상 지속됨을 알 수 있다. 또한 신경세포의 흥분성의 변화와 증상의 회복에 밀접한 연관이 있음을 암시한다.

한편 Hakon 등²⁵⁾에 따르면 생쥐 뇌졸중 모델에서 풍요로운 환경(enriched environment)에 노출되었을 때, 손상 2주째에 영상학적 측정법에서 대뇌 피질의 활동성을 증가되며, 이때 대뇌의 감각운동영역에서 억제성 신경인 GABA성 중간뉴런의 수적 감소를 보였다. 이는 다양한 말초 감각신경의 자극이 대뇌 피질의 흥분성을 증가시키고 이는 운동기능의 회복에 도움을 주는 실험적 증거이다. 한편 자발적 운동 및 풍요로운 환경이 뇌졸중 모델의 대뇌피질에서 BDNF 단백질 발현을 위한 세포내 신호전달계의 활성화를 유도하여 신경가소성을 향상시키는 것으로 알려져 있다^{26,27)}. 이때 흥분성 신경전달물질인 glutamate 분비의 증가로 인한 신경세포의 전기적 흥분성의 증가가 BDNF의 발현에 중요한 역할을 한다²⁸⁾.

Yoon 등²⁹⁾은 1주간의 지속적인 자극이 뇌졸중의 증상회복을 더욱 향상시키는 것으로 보아 반복적 경두개 자극이 증상회복 관련 대뇌피질의 신경가소성을 향상시킴을 보고하였다. 한편 Kim 등³⁰⁾은 정상흰쥐에서 7일간의 반복적 경두개전기자극이 BDNF mRNA 발현증가와 BDNF 단백질에 의해 활성화되는 CREB, ARC 및 cFos mRNA의 발현이 증가됨을 보고하였다. 이와 함께 경두개 전기가 대뇌피질의 흥분성 증가시킬 수 있다는 많은 임상연구들이 보고되었다³¹⁾. 또한 본 연구에서 허혈손상을 가하지 않은 정상 흰쥐를

대상으로 20Hz의 경두개전기자극을 20분간 시행하였을 때 감각운동영역의 피라미드 신경세포에서 자발 발화율이 증가됨을 관찰하였다(not published). 따라서 경두개 전기가 대뇌 피질의 신경세포의 흥분성을 증가시키수 있고, 이러한 증가가 BDNF와 같은 단백질의 발현 변화를 유도하고 이에 따라서 BDNF 의존성 세포내 신호전달계의 활성화를 유도할 수 있음을 암시한다.

Thallium autometallography 기법은 thallium 이온이 1가 양이온으로써 K^+ 이온과 같이 작용할 수 있어 신경세포의 $Na^+ - K^+$ pump에서 K^+ 이온과 경쟁적으로 세포밖에서 세포안으로 이동할 수 있다. 따라서 신경세포의 전기적 활동성의 증가로 인한 $Na^+ - K^+$ pump의 활동성이 증가하면 thallium 이온의 세포내 유입이 증가하여 세포내에 thallium의 농도가 증가된다. 따라서 세포내 thallium의 농도는 신경세포의 흥분성과 비례함으로 thallium autometallography 기법을 이용하여 신경세포내 thallium이온의 농도를 관찰함으로써 신경세포의 전기적 흥분성 변화를 세포수준에서 영상화하는 기술이다³²⁾. 본 실험 결과에서 thallium autometallography 염색에서 일정한 면적의 다리 감각운동영역에서 layer IV와 V에 존재하는 피라미드세포의 thallium 염색 정도를 비교 분석하였다. 염색정도를 상대적으로 비교분석하였을 때 sham군의 layer IV와 V의 피라미드세포들의 탈륨염색 정도는 sham군과 ISC군, ISC군과 TEA-FSB군 간에도 유의한 차이는 보였다. 결론적으로 경두개전침 및 발효황금 경구투여 병행치료가 대뇌피질 허혈손상 후 신경세포의 흥분성의 증가에 영향을 미치는 것을 보여주는 보다 확실한 근거라 할 수 있다.

황금에는 30여종의 유효성분이 함유되어 있는데, 그 중에서 baicalein, wogonin, oroxylin A, baicalin, wogonoside, oroxyloside의 주요 성분을 구성하며 가장 많은 성분은 baicalin이다. 이들 6개의 성분이 뇌혈관 장벽을 모두 통과하는 것으로 알려져 있다. 황금 추출물을 생쥐에 경구로 먹었을 때, 뇌에 황금의 유효성분들이 많이 분포하는 순서는 oroxylin > baicalein > oroxyloside > baicalin > wogonin > wogonoside으로 알려져 있다¹¹⁾. 또한 황금과 발효황금을 비교할 때 발효황금에서 baicalein, wogonin, oroxylin의 성분이 더욱 증가한다¹²⁾. Baicalein이 baicalin이 보다 효과적으로 신경세포의 독성예방 능력이 더욱 크며, 뇌졸중 실험모델에서 황금 추출액 및 황금의 유효성분들이 급성기에 신경세포의 사멸 방지, 염증예방 등에 효과가 있어 허혈성 손상을 감소시킨다³²⁾. 따라서 상기 결과를 종합하면 본 연구와 같이 황금을 발효했을 때 뇌에 축적되는 형태의 유효성분들이 더욱 증가됨을 의미하고 이들에 의한 약효가 더욱 높게 나타날 수 있음을 의미한다. Oroxylin과 baicalein은 in vitro 및 in vivo 실험에서 CREB 신호전달계를 활

성화 시켜 BDNF 및 NGF의 발현을 강력하게 증가시키며 이에 따라 신경세포의 분화 및 발생, 축삭성장을 촉진할 수 있어 퇴행성 뇌질환에 효과를 보였다¹³⁾. 또한 wogonin은 신경세포 전구체의 분화 촉진을 통한 뇌 가소성에 영향을 미친다³³⁾. 황금(黃芩)의 신경세포 보호작용 효과와 관련하여, 척수손상 실험동물에서 황금의 투여는 Bax 발현을 억제하고, Bcl-2 발현을 촉진하는 결과를 보여줬다³⁴⁾. Bax는 Bcl-2와 함께 세포자멸사를 조절하는 인자로 알려져 있는데, Bax가 과도하게 발현될 경우에는 세포자멸사는 촉진된다. 또한 Bcl-2는 세포자멸사를 억제하여 세포의 생존을 촉진하는 역할을 하는데, Bcl-2의 작용은 Bax와 결합함으로써 Bax로 인해 유도되는 세포자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있다^{35,36)}.

국내에서도 뇌졸중 치료를 위하여 경두개자극기술을 두침자극과 융합하여 연구를 찾아볼 수 있다. 2014년부터 전남대와 동신대가 공동으로 한·양방융합 치료기술 개발로 진행한 반복경두개전기자극(rTMS)과 두침을 융합하여 뇌졸중 치료를 위한 임상연구가 진행되었다³⁷⁾. 이 임상연구에서는 뇌졸중 환자에게 정섭전사선(MS6)과 정섭후사선(MS7)에 두침자극을 하면서 동시에 반대편 운동영역 피질에 반복경두개자극자극을 가하는 방식으로 융합하고자 하였다. 이와 달리 본 연구에서는 뇌졸중이 야기된 손상된 대뇌피질영역에 해당하는 두침영역을 직접적으로 경두개자극을 가하는 방식으로 두침과 경두개자극기술을 융합하였다. 나이가 경두개자극자극방식과 달리 교류전류를 활용함으로써 기존의 전침자극과 유사성을 높이면서 경두개를 통해 직접적으로 대뇌피질의 신경세포에 영향을 주도록 하였다. 본 실험에서 이러한 자극방식은 실제로 손상된 신경세포의 발화율과 흥분성을 높이는 결과를 보여주었다.

그리고 다양한 두침의 효과를 경두개자극기술과 결합하거나 약물치료와 병행하는 임상과 연구결과를 통해 치료효과를 극대화 할 수 있는데³⁸⁾, Sim 등³⁹⁾은 뇌졸중 모델에서 경두개전기자극과 함께 소풍탕을 병행치료 하였을 때 운동기능의 회복, GDNF(glial derived neurotrophic factor) 단백질 발현 및 피질신경세포의 신경가소성 향상이 단독 치료보다 병행치료에서 더욱 유의하게 증가됨을 보고 하였다. 이는 경두개전기자극의 효과와 소풍탕이란 약물의 효능이 합쳐져 치료효과를 더욱 향상시켰음을 의미하며 뇌졸중 치료시 상호 보완적 치료가 요구됨을 의미한다. 이러한 치료는 마치 한의약 임상에서 뇌졸중 환자의 치료시 침과 약을 같이 병행하는 방식과 동일한 것이다.

따라서 다양한 선행 연구를 포함해 본 실험 결과를 고려할 때, 경두개전침자극과 발효황금의 병행치료가 뇌졸중의 운동기능 회복 및 대뇌피질의 흥분성의 증가에 상승작용을 했을 것으로 사료된다. 다만 본 연구에서는 경두개전침 또는 발효황금의 단순 치료효과를

서로 비교하지 하지 않았기 때문에 추가 연구를 통한 개별적 치료의 비교 연구가 필요한 상황이다. 특히 각각의 치료법에 관련된 선행 연구결과를 고려할 때, 이들 치료법이 대뇌 피질의 흥분성 변화 및 신경가소성에 미치는 영향이 뚜렷하기 때문에 각각의 치료법에서 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다. 나아가 BDNF 신호전달계 관련 분자생물학적 추가 연구를 통하여 경두개전침과 발효황금의 작용기전을 각각 규명하는 일이 필요하다.

결론

흰쥐의 중대뇌동맥 폐색으로 유발된 대뇌 허혈손상에서 MS8과 MS9 두침부위의 경두개전침자극과 발효황금 경구투여의 병행 치료를 하였을 때, 다음과 같은 회복 결과를 관찰하였다.

1. 운동능력의 실수율이 대뇌 허혈손상 후 시간의 경과에 따라 크게 증가하는 반면 경두개전침과 발효황금 경구투여 병행치료는 실수율을 유의하게 감소시켰다.

2. 대뇌 허혈손상으로 인해 감소된 운동능력은 병행치료군에서 유의하게 회복되었다.

3. 감각운동피질영역의 피라미드 신경세포의 자발 발화율은 허혈손상군(6.7 ± 4.5 Hz)에 비하여 병행치료군에서 발화율(8.7 ± 3.8 Hz)이 증가하였다.

4. Thallium automethallography 염색을 통한 감각운동피질영역의 신경세포 흥분도를 관찰한 결과, 허혈손상군($64.2 \pm 8.9\%$)에 비하여 병행치료군($87.3 \pm 7.9\%$)에서 흥분도가 증가하는 경향을 보였다.

이상의 연구결과를 종합하면, 대뇌 허혈손상에서 MS8과 MS9 두침부위의 경두개전침과 발효황금 경구투여를 병행치료하는 것이 손상된 뇌신경세포의 흥분성을 높이고, 저하된 운동능력을 회복시키는 데 유효하였다. 다만, 이와 같은 연구 결과에서가 경두개전침 효과와 발효황금의 약리적 효과를 구별하기 위한 추가적인 연구를 통해 시너지 효과의 수준을 파악하는 것이 필요하다.

감사의 글

This study was supported by the Traditional Korean Medicine R&D Program funded by the Ministry of Health & Welfare through the Korea Health Industry Development Institute (HI17C0478000017).

References

1. Wang Xiaoming. Atlas of clinical anatomy and scalp acupuncture lines. Paju : Koonja. 2016 : 1-164.
2. Ha Chi-Hong, Han Sang-Gyun, Cho Myung-Rae, Ryu Choong-Ryul, Lee Byung-Ryul. A clinical study on 29 cases with stroke treated by common acupuncture therapy and scalp acupuncture. The Journal of Korean Acupuncture and Moxibustion Society. 2001 ; 18(3) : 82-90.
3. Schockert T, Schnitker R, Boroojerdi B, Smith IQ, Yamamoto T, Vietzhe K, et al. Cortical activation by Yamamoto new scalp acupuncture in the treatment of patients with a stroke: a sham-controlled study using functional MRI. *Acu Med.* 2010 ; 28(4) : 212-214. <https://doi.org/10.1136/aim.2010.002683>
4. Wang WE, Xie CL, Zheng GQ. A systematic review and meta-analysis of Baihui (GV20)-based scalp acupuncture in experimental ischemic stroke. *Sci Rep.* 2014; 4: 3981. <https://doi.org/10.1038/srep03981>
5. Zhang ZJ, Wang XM, McAlonan GM. Neural acupuncture unit: a new concept for interpreting effects and mechanisms of acupuncture. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012 ; Article ID 429412 : 1-23. <https://doi.org/10.1155/2012/429412>
6. Park J, Gwak J, Cho S et al. Effects of head acupuncture versus upper and lower limbs acupuncture on signal activation of blood oxygen level dependent (BOLD) fMRI on the brain and somatosensory cortex. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2008 ; 25(5) : 151-165.
7. Boonzaier J, van Tilborg GAF, Neggers SFW, Dijkhuizen RM. Noninvasive Brain Stimulation to Enhance Functional Recovery After Stroke: Studies in Animal Models. *Neurorehabil Neural Repair.* 2018 ; 32(11) : 927-940. <https://doi.org/10.1177/1545968318804425>
8. Reed T, Cohen Kadosh R. Transcranial electrical stimulation (tES) mechanisms and its effects on cortical excitability and connectivity. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2018; 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0181-4>
9. Jo AR. The effect of combined repetitive-transcranial magnetic stimulation and scalp acupuncture on neuromotor function in ischemic stroke rat model. Chonnam National University. Master's Thesis. 2016 : 1-44.
10. Zhao N, Zhang J, Qiu M et al. Scalp acupuncture plus low-frequency rTMS promotes repair of brain white matter tracts in stroke patients: A DTI study. 1. *J Integr Neurosci.* 2018 ; 17(1) : 61-69. <https://doi.org/10.3233/jin-170043>
11. Fong SYK, Li C, Ho YC, Li R, Wang Q, Wong YC, et al. Brain Uptake of Bioactive Flavones in *Scutellariae Radix* and Its Relationship to Anxiolytic Effect in Mice. *Mol Pharm.* 2017 ; 14(9) : 2908-2916. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00029>
12. Xu C, Ji GE. Bioconversion of flavones during fermentation in milk containing *Scutellaria baicalensis* extract by *Lactobacillus brevis*. *J Microbiol Biotechnol.* 2013 ; 23(10) : 1422-1427. <https://doi.org/10.4014/jmb.1305.05001>
13. Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. 1. *Drug Des Devel Ther.* 2015 ; 10 : 23-42. <https://doi.org/10.2147/dddt.s96936>
14. Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press. 2007.
15. Yang JH, Kim MS, Gong BM, Cybermedic Co. Method of preparing combined extract powder of fermented *Scutellariae Radix* and *Gastrodiae Rhizoma* from compounding solution of micro-organism and natural enzyme. 2016: Patent No. 10-1734022-0000.
16. Voroslakos M, Takeuchi Y, Brinyiczki K, Zombori T, Oliva A, Fernández-Ruiz A, et al. Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nat Commun.* 2018 ; 9(1) : 483. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02928-3>
17. Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol.* 2003 ; 553(Pt 1) : 293-301. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049916>
18. Maclellan CL, Grams J, Adams K, Colbourne F. Combined use of a cytoprotectant and rehabilitation therapy after severe intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* 2005 ; 1063(1) : 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.09.027>
19. Goldschmidt J, Wanger T, Engelhorn A, Friedrich H, Happel M, Ilango A, et al. High-resolution mapping of neuronal activity using the lipophilic thallium chelate complex TIDDC: protocol and validation of the method. *Neuroimage.* 2010 ; 49(1) :

- 303-315. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.08.012>
20. Barthó P, Hirase H, Monconduit L, Zugaro M, Harris KD, Buzsáki G. Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *J Neurophysiol.* 2004 ; 92(1) : 600-608. <https://doi.org/10.1152/jn.01170.2003>
21. Lee SJ. Scalp acupuncture for stroke recovery: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Pusan National University. Doctor of Philosophy's Thesis. 2016 : 1-47.
22. Carmichael ST, Chesselet MF. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *J Neurosci.* 2002 ; 22(14) : 6062-6070. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-14-06062.2002>
23. Zhang X, Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Measurement of neuronal activity of individual neurons after stroke in the rat using a microwire electrode array. *Journal of Neuroscience Methods.* 2007 ; 162(1-2) : 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.12.012>
24. Tokuno T, Kataoka K, Asai T, Chichibu S, Kuroda R, Ioku M, et al. Functional changes in thalamic relay neurons after focal cerebral infarct: a study of unit recordings from VPL neurons after MCA occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992 ; 12(6) : 954-61. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1992.132>
25. Hakon J, Quattromani MJ, Sjölund C, Tomasevic G, Carey L, Lee JM, et al. Multisensory stimulation improves functional recovery and resting-state functional connectivity in the mouse brain after stroke. *NeuroImage: Clinical.* 2018 ; 17 : 717-730. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.11.022>
26. Zhao LR, Risedal A, Wojcik A, Hejzlar J, Johansson BB, Kokaia Z. Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke. *Neuroscience Letters.* 2001 ; 305(3) : 169-172. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)01837-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)01837-7)
27. Sun J, Ke Z, Yip SP, Hu XL, Zheng XX, Tong KY. Gradually increased training intensity benefits rehabilitation outcome after stroke by BDNF upregulation and stress suppression. *BioMed Res Int.* 2014 ; 2014 : 925762. <https://doi.org/10.1155/2014/925762>
28. Clarkson AN, Overman JJ, Zhong S, Mueller R, Lynch G, Carmichael ST. AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke. *J Neurosci.* 2011 ; 31(10) : 3766-3775. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5780-10.2011>
29. Yoon KJ, Oh BM, Kim DY. Functional improvement and neuroplastic effects of anodal transcranial direct current stimulation (tDCS) delivered 1 day vs. 1 week after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2012 ; 1452 : 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.062>
30. Kim MS, Koo H, Han SW, Paulus W, Nitsche MA, Kim YH, et al. Repeated anodal transcranial direct current stimulation induces neural plasticity-associated gene expression in the rat cortex and hippocampus. *Restor Neurol Neurosci.* 2017 ; 35(2) : 137-146. <https://doi.org/10.3233/rmn-160689>
31. Henrich-Noack P, Sergeeva EG, Sabel BA. Non-invasive electrical brain stimulation: from acute to late-stage treatment of central nervous system damage. *Neural Regen Res.* 2017 ; 12(10) : 1590-1594. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.217322>
32. Liang W, Huang X, Chen W. The Effects of Baicalin and Baicalein on Cerebral Ischemia: A Review. *Aging Dis.* 2017 ; 8(6) : 850-867. <https://doi.org/10.14336/ad.2017.0829>
33. Gasiorowski K, Lamer-Zarawska E, Leszek J, Parvathaneni K, Yendluri BB, Błach-Olszewska Z, et al. Flavones from root of *Scutellaria baicalensis* Georgi: drugs of the future in neurodegeneration? *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2011 ; 10(2) : 184-191. <https://doi.org/10.2174/187152711794480384>
34. Bahn HJ, Jo JJ, Kim BH, et al. Effects of *Scutellariae Radix* on neuronal apoptosis of spinal cord contusion injury in rats. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation.* 2011 ; 21(4) : 13-22.
35. Chen J, Zhu RL, Nakayama M. Expression of the apoptosis-effector gene, BAX is upregulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem.* 1996 ; 67 : 64-71.
36. Gillardon F, Wickert H, Zimmermann M. Up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 is associated with kainate-induced apoptosis in mouse brain. *Neurosci Lett.* 1995 ; 192 : 85-88. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11619-8](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11619-8)
37. Han JY, Kim JH, Park JH, Song MY, Song MK, Kim DJ, et al. Scalp acupuncture and electromagnetic convergence stimulation for patients with cerebral infarction: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2016 ; 17 : 490. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1490-1>

- .org/10.1186/s13063-016-1611-y
38. Wang G, Yu C, Li C, Tu S. Observations on the influence of skull acupuncture plus medication on serum MDA in acute cerebral infarction patients. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion. 2009 ; 3 : 135-137.
39. Sim KC, Kim GD, Kim KY, Chung HW, Kim GY. Effect of Sopung-tang and tDCS on motor function recovery and GDNF expression in photothrombotic brain infarction induced rat model. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2012 ; 26(6) : 894-901.