동의신경정신과 학회지 제21권 제1호(2010년 03월)
J. of Oriental Neuropsychiatry 2010;21(1):59-69

뇌허혈 유발 후 전침자극이 전뇌세포사 중 Bax와 Caspase-3 발현 변화에 미치는 영향 연구

최정현, 민경옥*, 김순희*, 김동일†, 이상빈, 안호정‡, 김지성§, 최완석‖, 김보경**, 송치원††

남서울대학교 물리치료과, 용인대학교 물리치료학과*, 동국대학교한방병원 부인학과†, 대원대학 물리치료학과‡
수원여자대학 물리치료학과§, 포항대학 물리치료학과‖, 군장대학 물리치료학과**, 식품의약품안전평가원 행정지원과††

A Study on the Effects of the Electro-Acupuncture(EA) Stimulation after Global Ischemia(GI) on Changes in Bax and Caspase-3 Expression among Forebrain Apoptosis

Jung-Hyun Choi, Kyoung-Ok Min*, Soon-Hee Kim*, Dong-Il Kim†, Sang-Bin Lee, Ho-Jung An‡, Ji-Sung Kim§, Wan-Suk Choi‖, Bo-Kyoung Kim**, Chi-Won Song††

Dept. of Physical Therapy, Nam-Seoul Univ of Korea, Dept. of Physical Therapy, Yong-In Univ of Korea*
Dept. of Oriental Medicine Graduate School of Dongguk Univ. Seoul†
Dept. of Physical Therapy, Dae-Won Univ College of Korea‡, Dept. of Physical Therapy, Suwon Women's College of Korea§
Dept. of Physical Therapy, Po-Hang College of Korea‖, Dept. of Physical Therapy, Gun-Jang College of Korea**
Div. of General Service, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Korea††

Abstract

Objectives :
The study aims to look into how the application of EA(Electro-acupuncture) in the initial step of ischemic brain injury affects the changes in Bax and Caspase-3 expression among forebrain apoptosis.

Methods :
It caused GI by using common carotid artery occlusion and conducted the test by dividing into the no applied EA group after 6 hours and 12 hours, the LI 4 EA group that applied EA to LI 4, and GV 20 EA group that was applied to GV 20. After that, the following results were obtained by comparing Bax and Caspase-3 expression, which were apoptosis-related factors, with its application time through immunohistochemical staining after extracting brain of each group.

Results :
According to each group's Bax expression by the application time, the order of expression increase after 6 hours is shown to be the no applied EA group, LI 4 group, and GV 20 group. The stimulation after 12 hours was most lowly expressed in the GV 20 group, and the no applied EA group and LI 4 group showed similar level.

Conclusions :
EA stimulation in the initial step after ischemia seems to affect positively Bax and Caspase-3 expression that are index of forebrain apoptosis.

Key Words :
Global ischemia, Electrical acupuncture, Bax, Caspase-3

투고 : 2010. 1. 20. 수정 : 2010. 3. 9. 채택 : 2010. 3. 9.
교신저자 : 송치원, 서울시 은평구 녹번동 통일로 194번지 식품의약품안전평가원 행정지원과
Tel) 02-380-1884, Fax) 02-355-6035, E-mail) songcw@kfda.go.kr

Ⅰ. 서 론

뇌혈관 질환으로 발생하는 뇌졸중(stroke)은 악성종양 및 심장질환과 더불어 성인에서 흔한 장애를 유발하는 것으로 알려져 있으며, 그로 인해 임상적으로 의식수준의 변화와 감각, 운동, 인지, 지각, 언어기능의 손상을 포함하여 다양한 손상이 나타난다[1]. 이러한 손상을 최소화 하고자 손상 후 회복과정에서 많은 치료들이 이루어지고 있는데, 대뇌 허혈 후 회복 과정은 복잡하고 관여하는 유전자들에 의해서 조절되어진다. 허혈 후 나타나는 향신경성 요소(neurotrophic factor)와 신경전달물질(neurotransmitter)체계는 이러한 회복과정과 관련이 있다[2].

근래의 한의학에서는 뇌 혈액순환 개선, 중추신경에서의 신경조절기능(neuromodulatory function)의 개선, 뇌경색 재활치료등과 같은 중추신경계의 손상치료에 전침(eletroacupuncture, 이하 EA)을 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다[3-5]. 최근에는 객관적인 분석과 평가를 통하여 뇌졸중 등 중추신경질환에 대한 침치료의 효능을 검증하는 연구가 활발하게 진행되고 있는데 몇몇 부정적인 연구[6-8]를 제외한 대부분의 연구[9-13]들이 뇌졸중에 대한 침치료의 효능에 대해서 긍정적으로 보고하고 있다. 일반적으로 뇌졸중에는 百會(GV20), 水溝(GV26), 合谷(LI4), 三陰交(SP6), 足三里(ST36) 등이 흔히사용되고 있으며, 이들 침점들은 신경보호 효과를 가지고 있다[14]. EA는 경혈점에 자침하여 침에 전류를 통하여 기계적 자극과 전기적 자극을 결합시킨 치료법으로써 1825년 프랑스의 Salandiere가 최초로 전기를 이용하여 통풍과 신경계통질환을 치료한 결과를 발표한 이래 최근에 임상에서 다양하게 응용되고 있으며[15], 전류의 파형, 주파수, 전압, 통전시간에 따라 다양한 치료효과를 보이는 것으로 알려져 있다[16] 이와 같이 경혈점에 EA를 이용한 연구들에서 뇌 손상에 대한 신경 보호작용과 뇌기능 회복에 도움을 준다고 보고하였지만, 그 보호 기전에 대해서는 충분히 알려져 있지 않다[17.18].

BCL-2 유전자군은 다양한 생리학적, 병리학적 상태에서 예정된 세포의 죽음을 조절하는 특별한 단백질들을 전사하는데, 그들의 정확한 역할에 대해서는 아직 논란이 있지만 세포자멸사를 촉진시키는 군(Bax, Bak, Bcl-xS)과 억제시키는 군(Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL)으로 분류되어지고 있다[19,20]. 이러한 Bcl-2 유전자군들의 복합적이고 상보적인 조절에 의해서 허혈 후 사립체 막의 통로가 열리고 세포질내로 cytochrome c가 유리되면서 진행되는 Caspase-3의 활성화는 DNA 분절화에 선행되는 것이 알려져 있는데 이에 따라 뇌허혈 후 진행되는 세포자멸사는 Caspase와 연관된 경로와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되어지고 있다[21,22]. 이처럼 세포자멸사를 일으키는 여러 인자 중에 하나인 Casapse는 내인성경로(intrinsic pathway)와 외인성경로(extrinsic pathway) 그리고 Caspase independent AIF(apoptosis inducing factor) 경로를 통해서 활성화 된다[23].

Caspase 1과 2의 prodomain은 특정한 정보와 신호들을 핵에 전달하는 역할을 하고 있는데, Caspase 1, 2와 3의 mRNA들은 뇌 허혈과 외상성 뇌손상이 발생하면 발현이 증가한다고 알려져 있다[24-26]. 따라서 뇌손상 후 Caspase 활동을 조절함으로써 부분적인 뇌 허혈로 인한 손상을 줄일 수 있다[27].

본 연구에서는 허혈성 뇌손상 초기단계에서의 EA적용이 전뇌세포자멸사(Forebrain apoptosis)를 유발하는 인자들 중 Bax와 Caspase-3의 발현 변화에 미치는 영향을 관찰하여 허혈 후 전뇌신경 세포자멸사에 어떠한 영향을 미치는지 알아

보고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험방법 및 절차

1) 실험동물

1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 체중 300g 내외의 8주령 특정 병원체 부재(specific pathogen free, SPF) SD 랫드(Sprague Dawley rat) 수컷 24 마리를 사용하였다(오리엔트바이오(주), 경기도 가평 소재).

2) 온목동맥폐색(common carotid artery occlusion) 모델

온목동맥(common carotid artery)폐색모델은 기존에 보고된 온목동맥결찰로 뇌허혈를 유발하여 사용하였다[28]. 랫드를 3% isoflurane (중외제약, 한국)으로 마취 상태를 유지하면서, 목 정중선에서 왼쪽 2 ㎝ 부분을 정중 절개한 후 미주신경 등을 분리하고 온목동맥을 노출시킨다. 그 후 온목동맥을 비 흡수성 봉합사로 완전히 결찰하여 5분간 유지한 후 봉합사를 제거하여 혈액이 재관류(reperfusion) 할 수 있게 한다. 폐색시간을 기준으로 6, 12시간으로 구분하여 실험을 수행하였다.

3) 실험군의 구분

본 실험에서는 온목동맥폐색에 뇌허혈(global ishemia)을 유발하고 EA자극을 적용하지 않은 EA 무처치군과 뇌허혈를 유발시킨 뒤 6시간 후 EA를 각각 合谷(LI 4)과 百會(GV 20)에 시행한 合谷 EA군과 百會 EA군으로 나누어 실험을 하였다. EA 무처치군과 EA군들은 온목동맥폐색 후 각각 4마리씩 6시간, 12시간 동안 혈액을 재관류 시킨 뒤 조직을 관찰하였다. EA 무처치군은 6시간 후 30분간 3% isoflurane을 이용한 마취만 시킨 후에 회복시킬 것이고, EA군들은 마취 유도와 함께 30분간 EA를 시행하였다.

(1) EA 무처치군(Non EA, n=8)

뇌허혈 유발 후 5시간 30분이 경과한 뒤 마취만을 시행한 후 폐색시간 기준 6시간(n=4), 12시간(n=4) 후 뇌를 적출하였다.

(2) 合谷 EA군(LI4, n=8)

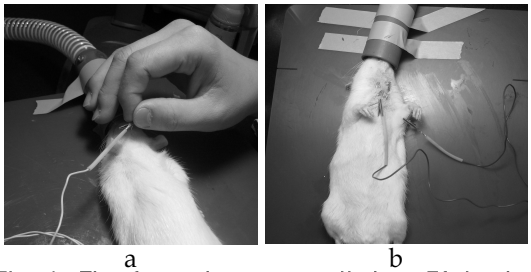
뇌허혈 유발 후 5시간 30분이 경과한 뒤 마취상태에서 30분 동안 合谷(LI4)부위에 EA을 시행하였으며, 폐색시간 기준 6시간(n=4), 12시간(n=4) 후 뇌를 적출하였다

(3) 百會 EA군(GV20, n=8)

뇌허혈 유발 후 5시간 30분이 경과한 뒤 마취상태에서 30분 동안 百會(GV20)부위에 EA을 시행하였으며, 폐색시간 기준 6시간(n=4), 12시간(n=4) 후 뇌를 적출하였다

4) 전침자극(Electro-acupuncture, EA)

EA 자극은 3% isoflurane을 이용하여 마취상태를 유도한 뒤 SD 랫드의 좌·우측에 첫 번째 지절과 2번째지절이 갈라지는 뼈사이에 있는 合谷과 유사한 곳과 두정골(parietal bone) 가장가운데 있는 百會와 유사한 곳을 선정하고[29] EA자극기(PG6, ITO, JAPAN, 5/20 Hz, 1~3 mA)를 이용하여 30분간[30] 지속적으로 EA자극을 시행하였다(Fig. 1).



a b

Fig. 1. The facts that are applied at EA in the GV20 and LI4 (a. GV20, b. LI4).

5) 면역조직화학적 검사법(immunohistochemistry method)

온목동맥폐색에 의한 뇌허혈유발 모델 랫드의 뇌에서 전뇌(forebrain)부분을 선택하여 면역조직화학적 검사법을 실시하였다. 4% paraformaldehyde에 고정된 뇌를 동결절편 하고, free-floating 법으로 실시하였으며, vectastatin ABC Kit(Vector, USA)를 사용하였다. 박절된 조직을 0.1 M PBS로 5분간 3회 수세한 후 1% H_2O_2로 blocking (peroxidase blocking, 0.1 M PBS)시킨 뒤 2% normal goat serum에서 30분간 실온에 방치하고. 일차항체는 anti-Bax, anti-Caspase-3 사용하고, 일차항체를 4℃에서 3일간 반응시킨 뒤 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세하였다. 그 후 이차항체(biotinylated antibody)를 1일간 4℃에서 반응시켰다. 이후에 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세하고, avidin-biotin Peroxidase (HRP) complex를 3시간 동안 상온에서 반응시킨 후 0.1 M PBS에 5분간 3회 수세한 후 DAB (Sigma, USA) 발색 후 3% gelatin 용액으로 조직을 slide에 올린 후 dry oven에 2시간 정도 건조하였고, 탈수와 투명과정을 거쳐 permount(Fisher, USA)용액으로 봉입시켰다.

2. 통계학적 분석

수집된 모든 자료는 부호화 후 컴퓨터를 이용한 통계처리 프로그램(SPSS 17.0/PC)으로 분석하였으며, 2단계에 걸쳐서 분석을 실시하였다.

제 1 단계는 연구 대상의 특성별 분포를 알아보기 위해 기술통계 (Descriptive Statistics)를 이용하여 빈도 (Frequency)와 평균과 표준편차를 구하였다.

제 2 단계는 허혈 유발 후 6, 12시간 뒤 EA 무처치군, 合谷 EA군, 百會 EA군간의 차이 분석을 위해 유의수준 α=0.05 범위에서 Kruskal Wallis 검정을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 6시간 후 Bax와 Caspase-3의 변화

각 군에 대한 Bax와 Caspase-3의 반응세포 수를 비교 분석한 결과, Bax의 발현은 百會 EA군, 合谷 EA군, EA EA 무처치군순으로 증가되는 것이 관찰되었다. Caspase-3는 EA 무처치군,合谷 EA군, 百會 EA군 순으로 증가된 것이 관찰되었다. 하지만, 각 군간의 발현수치는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table I, Fig. 2).

Tabel Ⅰ. Results Analysis of Bax and Caspase-3 Immunohistochemistry Methods for Each Group(6 hours after global ischemia)

Item	Group	N	Scores (Rank Sums)	χ^2	df	comparison‖
Bax	Non EA†	4	8.88	5.037	0.081	·
	LI4 EA‡	4	3.38			·
	GV20 EA§	4	7.25			·
Caspase-3	Non EA	4	9.00	3.192	0.203	·
	LI4 EA	4	4.63			·
	GV20 EA	4	5.88			·

$p < 0.001$

†Non EA : no EA applied group.

‡LI4 EA : EA applied at LI4 acupoint group.

§GV20 EA : EA applied at GV20 acupoint group.

‖Levels is high group higher of experimental mean value.

Table Ⅱ. The Number of Bax and Caspase-3 Reactive Cells in Each Area(6 hours after global ischemia)

Items	N	Non-EA	LI4 EA	GV20 EA
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
Bax	4	21.75±2.22	19.50±1.29	17.75±0.96
Caspase-3	4	47.30±3.74	45.25±1.71	42.25±2.63

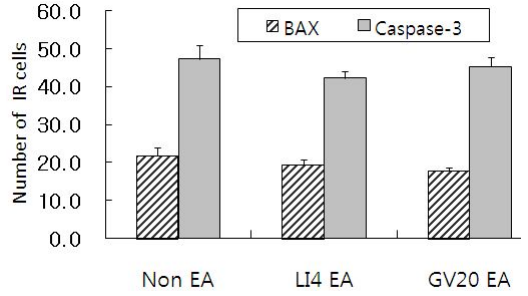


Fig. 2. Comparison of Bax and Caspase-3 reactive cells in each group(6 hours after global ischemia).

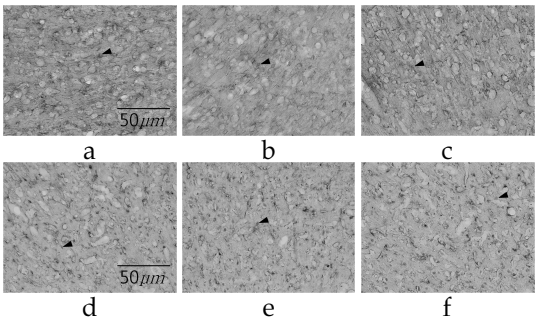


Fig. 3. Bax and Caspase-3 reaction in the forebrain (6 hours after global ischemia). Arrowheads indicate positive cells.
(a) Non EA(Bax, X 200), (b) LI4 EA(Bax,X 200), (c) GV20 EA(Bax,X 200), (d) Non EA(Caspase-3, X 200), (e) LI4 EA(Caspase-3, X 200), (f) GV20 EA(Caspase-3, X 200).

2. 12시간 후 Bax와 Caspase-3의 변화

12시간 이 후 각 군에 대한 Bax와 Caspase-3의 반응세포 수를 비교 분석한 결과, Bax 발현은 EA 무처치군에서 가장 많이 관찰되었으며 合谷 EA군과 百會 EA군에서는 비슷한 수준으로 관찰되었다. Caspase-3 발현은 百會 EA군에서 가장 적게 발현이 되었고, EA 무처치군과 合谷 EA군에서는 비슷한 수준으로 관찰이 되었다. 또한, 각 군간의 발현수치는 통계적으로 유의한 차이($p<0.05$, $p<0.001$)를 보였다(Table Ⅲ, Fig. 4).

Table Ⅲ. Results Analysis of Bax and Caspase-3 Immunohistochemistry Methods for Each Group(12 hours after global ischemia)

Item	Group	N	Scores (Rank Sums)	χ^2	df	comparison‖
Bax	Non EA‡	4	16.69	8.876	0.012*	2
	LI4 EA§	4	14.19			2
	GV20 EA‖	4	6.63			1
Caspase-3	Non EA	4	15.25	15.644	0.000†	2
	LI4 EA	4	17.69			2
	GV20 EA	4	4.56			1

*p<0.05, †p<0.001
‡Non EA : no EA applied group
§LI4 EA : EA applied at LI4 acupoint group
‖GV20 EA : EA applied at GV20 acupoint group
¶Levels is high group higher of experimental mean value.

Table Ⅳ. The Number of Bax and Caspase-3 Reactive Cells in Each Area(12 hours after global ischemia)

Item	N	Non-EA	LI4 EA	GV20 EA
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
Bax	4	43.72±3.51	33.50±3.70	33.71±4.17
Caspase-3	4	78.88±4.70	70.25±4.67	65.23±5.57

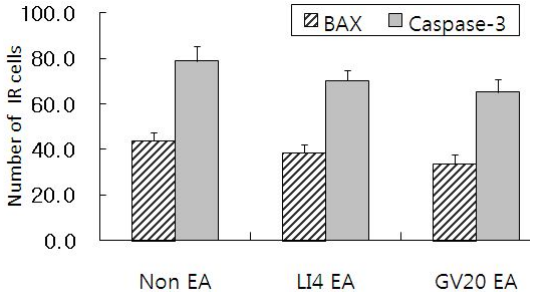


Fig. 4. Comparison of Bax and Caspase-3 reactive cells in each group(12 hours after global ischemia).

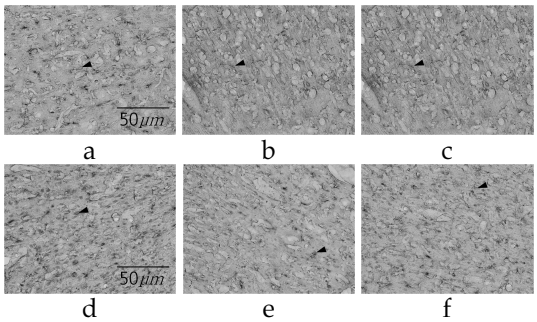


Fig. 5. Bax and Caspase-3 reaction in the forebrain (12 hours after global ischemia).
Arrowheads indicate positive cells.
(a) Non EA(Bax, X 200), (b) LI4 EA(Bax,X 200), (c) GV20 EA(Bax,X 200), (d) Non EA(Caspase-3, X 200), (e) LI4 EA(Caspase-3, X 200), (f) GV20 EA(Caspase-3, X 200).

Ⅳ. 고 찰

세포자멸사(apoptosis)와 세포괴사(necrosis)는 형태적, 생리학적 특징으로 구분되는데, 세포자멸사는 국소적으로 발생하는 programed cell death 과정으로 천천히 진행되고 새로운 유전자 발현이 필요하며 에너지를 요구하는 능동적인 과정이다[31]. 생리적 또는 병리적 상태에서 programmed cell death를 조절하는 BCL-2 유전자 군에 의해 발현되는 대표적인 단백질인 BCL-2는 세포의 생존을 촉진하는 반면, Bax는 세포사멸을 촉진하는 것으로 알려져 있다[19]. Chen[32] 등은 흰쥐 국소 대뇌 허혈 모형에서 허혈손상이 뇌경색을 일으키지 못할 정도(sublethal)일 때는 허혈이 유발된 부위의 신경세포에서 Bax와 Bcl-2의 발현이 증가하고, 뇌경색을 유발할 정도(lethal)의 허혈성 손상시에는 경색부위의 혈관 내피세포와 평활근에서 Bax와 Bcl-2가 발현된다고 보고하였다.

조연희[33]는 대뇌 허혈에 의한 뇌 세포사에서 세포자멸사가 관계있는 몇몇 유전자의 발현에 대해서 관찰하였는데, BCL-2 mRNA의 발현은 허혈 후 8시간까지 증가된 상태를 유지하다가 24시간에 대조 수준으로 회복되었다고 하였고, 김[34]는 국소허혈(Focal ischemia) 후 6시간 이후에 Bax의 발현이 가장 많이 증가되었다고 하였으며, 48시간 이후에 현저하게 감소하였다고 하였다. 그러나 Takemura[35] 등은 뇌허혈(global ischemia) 유발 후 4시간 이후부터 Bax의 발현이 급속하게 늘어난다고 보고하였고, Cregan[36]등은 허혈 후 Bax와 Caspase와 같은 AIF(apoptosis-inducing factor)의 발현은 서로 연관되어 나타나는데 초기 Bax의 발현이후에 시간 연속상에 있는 세포자멸사 인자인 Caspase가 발현되면서 세포자멸사가 나타난다고 하였다. 본 연구에서는 6시간과 12시간 후의 Bax의 발현을 관찰하였는데 6시간이후에서 Bax의 발현을 살펴보면, EA 무처치군에서 가장 많은 발현양상을 보였지만, EA를 적용한 合谷 EA군, 百會 EA군과 비교해서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지는 않았다.

Yang 등[37]은 뇌출혈 후 선조체(striatum)과 해마 치상회(dentate gyrus hippocampus)에서의 Caspase-3 발현이 足三里(ST36)의 침적용에 의해서 감소된 것을 관찰하였고, 따라서 EA적용이 뇌출혈에 의한 신경 세포사 기전에 신경보호 효과를 나타냈다고 할 수 있고, 뇌졸중(stroke)이후에 중추신경회복에 침이 도움이 될 수 있다고 제안하였다. Cheng 등[38]은 침이 다양한 장애로부터 기능적인 회복을 증대시키기 위해 사용된다고 보고하였으며, 일과성 전뇌허혈 유발 후 gerbils의 해마 치상회에서의 세포자멸사와 새로운 세포 증식에 대한 침의 효과에 관한 연구에서 침이 세포자멸사와 새로운 세포 증식을 약 70% 억제하였는데, 이러한 결과는 침 치료가 허혈에 의해 유도된 세포자멸사를 경감시켜 허혈성 뇌 손상을 회복시키는 치료적 효과를 가져왔

다고 보고하였다.

Caspase-3는 허혈 재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)기간에 촉진된다고 알려져 있다[39]. Cho 등[40]의 연구에서도 足三里의 EA 적용이 뇌출혈 후 선조체의 세포자멸사적 신경세포사(apoptotic neuronal cell death)를 줄여준다고 하였다.

본 연구에서는 세포자멸사적 신경 세포사를 확인하기위해서 Caspase-3의 발현수치를 확인하였는데, 허혈 유발 후 6시간에서 Caspase 3의 발현양상은 EA 무처치군에서 가장 많은 발현양상을 보였지만 Bax의 발현과 유사하게 EA를 적용한 그룹과의 비교에서 통계적으로 유의하게 나타나지는 않았다. 이러한 결과는, EA 적용 직후에 변화를 관찰하였기 때문에 짧은 시간내에 EA가 Bax와 Caspase 3의 발현에 영향을 주지 못했기 때문이라고 사료된다. 그리고 12시간 이후에 Caspase-3의 발현수치도 EA 무처치군에서 가장 많은 발현이 나타났는데, 이와 비교해서 전침자극을 준 合谷 EA군에서는 EA 무처치군보다 통계적으로 낮은 발현이 관찰되었다($p<0.001$). 이러한 결과는 EA자극으로 인해서 세포자멸사와 관련있는 Bax와 Caspase-3의 발현이 감소한 것이라 사료된다[41,42]. Ma 등[43]의 실험에서는 허혈 후 해마(hipppcampus)에서의 Caspase-3의 발현에 영향을 주는 Caspase-9의 변화를 관찰하였는데 三陰交(SP 6), 豐隆(ST40), 百會, 水溝(GV26)에 20분간(1-3 mA, 15 Hz) EA 적용 그룹에서 해마에서의 Caspase-9의 발현이 유의하게($p<0.01$)게 줄어들었다고 보고하였다. 따라서 경혈점에 대한 EA 적용이 신경생태학(neuroethology) 증상을 개선시킬 수 있다고 제안하였는데, 본 연구에서도 百會에 자극한 百會 EA군에서 12시간 이후에 Caspase-3의 발현이 가장 적게 관찰된 것으로 미루어 전뇌손상세포의 세포자멸사를 지연 또는 감소시켜줄 것이라고 사료된다. 또한, MCAO 유발 후 百會와 水溝에 EA(1 hr, 3 mA, 20/3 Hz)를 적용하여 Caspase의 감소를 관찰한 Wang[44] 등의 연구에서도 EA적용으로 인해서 Caspase의 발현을 조절할 수 있다는 것을 보여주고 있다. 이와 같이 허혈 유발 후 초기단계에서의 전뇌세포사의 지표가 되는 Bax와 Caspase-3의 발현이 EA자극을 적용한 군에서 발현감소 또는 지연이 관찰된 것으로 미루어 EA자극이 세포자멸사를 줄이는데 긍정적인 영향을 미친것이라 사료된다. 그러나 본 연구에서는 세포사 기전 중 세포자멸사부분만을 가지고 연구하였기 때문에 다른 세포기전에 나타나는 요인들과 같이 연구하는 것이 필요하겠고, 발현된 단백질들의 정확한 발현정도를 관찰하기 위해서 단백질 정량 분석을 하지 못한 것이 제한점으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 허혈성 뇌손상 초기단계에서의 EA적용이 전뇌세포사 중 Bax와 Caspase-3의 발현변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포사 인자를 면역조직화학적 검사법으로 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 허혈 후 6시간 후의 Bax와 Caspase-3 발현정도는 百會 EA군에서 가장 적게 관찰되었지만, 통계적으로 유의하게 차이는 나타나지 않았다($p<0.05$).
2. 허혈 후 12시간 후의 Bax와 Caspase 발현은 百會 EA군에서 가장 적은 발현이 관찰되었다($p<0.001$).

이상의 내용으로 미루어 허혈로 인한 전뇌세포 손상 초기에 손상정도와 크기를 감소시켜줄 수 있는 치료 방법을 연구하는 기초자료로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. O'Sullivan SB, Thomas JS. Physical Rehabilitation. Assesment and Treatment (4th). Philadelphia 2005:589-97.
2. Paul TA, Philip KL, Chung YH. Immediate Early Gene Expression in Response to Cerebral Ischemia. Storke. 1996;27:1682-7.
3. Cho ZH, Chung SC, Jones JP, Park JB, Park H, Lee HJ, Wong EK, Min BI. New findings of the correlation between acupoints and corresponding brain cortices using functional MRI. Proc Natl Acad Sci, 1998;USA95:2670-3.
4. Jang MH, Shin MC, Koo GS, Lee CY, Kim EH, Kim CJ. Acupuncture decreases nitric oxide synthase expression in periaqueductal gray area of rats with streptozotocin-induced diabetes. Neurosci Lett. 2003;337:155-8.
5. Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, Chung JH, Seo JC, Kang JE, Lee HJ, Yim SV, Kim CJ. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ishcemia in gerbils. Neurosci Lett. 2001;297:21-4.
6. Sze FK, Wong E, Yi X, Woo J. Does acupuncture have additional value to standard poststroke motor rehabilitation? Stroke. 2002;33:186-94.
7. Johansson BB, Haker E, von Arbin M, Britton M, Långström G, Terént A, Ursing D, Asplund K. Acupuncture and transcutaneous nerve stimulation in stroke rehabilitation: a randomized, controlled trial. Stroke. 2001;2:707-13.
8. Gosman-Hedström G, Claesson L, Klingenstierna U, Carlsson J, Olausson B, Frizell M, Fagerberg B, Blomstrand C. Effects of acupuncture treatment on daily life activities and quality of life: a controlled, prospective, and randomized study of acute stroke patients. Stroke. 1998; 29(10):2100-8.
9. Johansson K, Lindgren I, Widner H, Wiklund I, Johansson BB. Can sensory stimulation improve the functional outcome in stroke patients?. Neurology. 1993 Nov;43(11):2189-92.
10. Magnusson M, Johansson K, Johansson BB. Sensory stimulation promotes normalization of postural control after stroke. Stroke. 1994;25:1176-80.
11. Jellinger KA. Principles and application of acupuncture in neurology. Wien Med Wochenschr. 2000;150:278-85.
12. Si QM, Wu GC, Cao XD. Effects of electroacupuncture on acute cerebral infarction. Acupunct Electrother Res. 1998;23:117-24.
13. NIH consensus conference : acupuncture. JAMA. 1998;280:1518-24.
14. Wei GW, Huang YL, Wu GC, Cao XD. Regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor expression by electroacupuncture after transient focal ischemia. Acupunct Electrother Res. 2000; 25:81-90.
15. Stillings D. A survey of the history of electrical stimulation for pain to 1900. Med Instrum. 1975;9:255-9.
16. 김재규. 전침치료의 이론과 임상. 서울:서원당.

1993;14-7, 24-6.
17. Pang J, Itano Y, Sumitani K, Negi T, Miyamoto O. Electroacupuncture attenuates both glutamate release and hyperemia after transient ischemia in gerbils. Am J Chin. Med. 2003;31(2):295-303.
18. Frank KS, Eric W, Kevin KH, Joseph L, Jean W. Does Acupuncture Improve Motor Recovery After Stroke?. Storke. 2002;33:2604-19.
19. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, Wang HG, Sato T, Krajewski S, Aimé-Sempé C, Bodrug S, Kitada S, Hanada M. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. J Cell Biochem. 1996 ;60(1):23-32.
20. LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. Am J Pathol. 1993;142(3):743-53.
21. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of Caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. J Neurosci. 1998; 18(13):4914-28.
22. Niwa M, Hara A, Iwai T, Wang S, Hotta K, Mori H, Uematsu T. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. Neurosci Lett. 2001;300:103-6.
23. Asahi M, Hoshimaru M, Uemura Y, Tokime T, Kojima M, Ohtsuka T, Matsuura N, Aoki T, Shibahara K, Kikuchi H. Expression of interleukin-1 beta converting enzyme gene family and BCL-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:11-8.
24. Graham SH, Chen J. Programmed cell death cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2001;21:99-109.
25. Gillardon F, Bottiger B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA. Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. Mol Brain Res. 1997;50:16-22.
26. Kinoshita M, Tomimoto H, Kinoshita A, Kumar S, Noda M. Up-regulation of the Nedd2 gene encoding an ICE/ Ced-3-like cysteine protease in the gerbil brain after transient global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:507-14.
27. Yakovlev AG, Wang G, Stoica BA, Boulares AH, Spoonde AY, Yoshihara K. Smulson ME. A role of the Ca2+/ Mg2+-dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by poly(ADP-ribose) polymerase. J Biological Chemistry. 2000;275:21302-8.
28. Kuge Y, Minematsu K, Hasegawa Y, Yamaguchi T, Mori H, Matsuura H, Hashimoto N, Miyake Y. Positron emission tomography for quantitative determination of glucose metabolism in normal and ischemic brains in rats: an insoluble problem by the Harderian glands. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17(1):116-20.
29. 고형균. 흰쥐에서의 골도분촌에 의한 상응혈위. 대한침구학회. 1999;16:115-122.
30. Gan P, Cheng JS, Ng YK, Ling EA. Role of GABA in electro-acupuncture therapy

on cerebral ischemia induced by occlusion of the middle cerebral artery in rats. Neurosci Lett. 2005;383(3) :317-21.

31. Haeberlein SL. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death. Neurochem Res. 2004;29:521-30.
32. Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP. BCL-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. Neuroreport. 1995;26;6(2):394-8.
33. 조연희. 흰쥐 대뇌국소허혈시 BCL-2, Bax 및 ICE 유전자 발현의 변동. 전남대학교 의학대학원석사. 1998.
34. 김순화. 침전극 저주파 자극이 중대뇌동맥 폐쇄된 흰쥐에서 Bax, COX-2, IL-1a, IL-6 발현에 미치는 영향. 한서대학교 대학원박사. 2005.
35. Takemura G, Ohno M, Fujiwara H. Ischemic heart disease and apoptosis Rinsho Byori. 1997;45(7):606-13.
36. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of Caspase-independent neuronal cell death. J Cell Biol. 2002;158(3) :507-17.
37. Yang YJ, Kim YS, Shin MS, Chang HK, Lee TH, Sim YJ, Shin MC, Park HY, Kim S, Park HK, Kim CJ. Effects of acupuncture on the intrastriatal hemorrhage-induced Caspase-3 expression and newly cell birth in rats. Neurol Res. 2007;29:65-71.
38. Cheng JH, Lee EY, Jang MH, Kim J, Kim CJ, Ha E, Park HK, Choi S, Lee H, Park SH, Leem KH, Kim EH. Acupuncture decreases ischemia-induced apoptosis and cell proliferation in dentate gyrus of gerbils. Neurol. Res. 2007;29:23-7.
39. Asahi M, Hoshimaru M, Uemura Y, Tokime T, Kojima M, Ohtsuka T, Matsuura N, Aoki T, Shibahara K, Kikuchi H. Expression of interleukin-1 beta converting enzyme gene family and BCL-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. J Cereb Blood Flow Metab. 1997;17:11-8.
40. Cho NH, Lee JD, Cheong BS, Choi DY, Chang HK, Lee TH, Shin MC, Shin MS, Lee J, Kim CJ. Acupuncture suppresses ntrastriatal hemorrhage-induced apoptotic neuronal cell death in rats. Neurosci Lett. 2004;362(2):141-5.
41. Guo J, Li R, Zhao P, Cheng J. Effect of taurine in combination with electroacupuncture on neuronal damage following transient focal cerebral ischemia in rats. Acupunct Electrother Res. 2002;27(2):129-36.
42. Li ZR, Shen MH, Niu WM. Involvement of melatonin in the adjusting effect of electroacupuncture in resisting oxygen stress in cerebral ischemia-reperfusion injury rats. Zhen Ci Yan Jiu. 2008;33(3):164-8.
43. Ma HF, Ren XJ, Tu Y, Lin CX. Effect of electroacupuncture on Caspase-9 expression in hippocampus and neuroethology in hyperlipemia rats with concurrent cerebral ischemia. Zhen Ci Yan Jiu. 2008;33(6):382-6.
44. Wang SJ, Omori N, Li F, Jin G, Zhang WR, Hamakawa Y, Sato K, Nagano I, Shoji M, Abe K. Potentiation of Akt and

suppression of caspase-9 activations by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats. Neurosci Lett. 2002;331:115-8.