

PTU 투여 갑상선기능저하증 유발 랫드모델에서 고용량 MOK 약침의 효능 및 안전성 평가 연구

황지혜 · 임우현¹ · 정 철¹ · 정효원^{2*}

가천대학교 한의과대학 침구의학과, 1: 남상천한의원 원외탕전실, 2: 동국대학교 한의과대학 본초학교실

Study on Efficacy and Safety of High Dose MOK Pharmacopuncture in Hypothyroidism-induced Rats with Propylthiouracil

Ji Hye Hwang, Wu Hyun Im¹, Chul Jung¹, Hyo Won Jung^{2*}

Department of Acupuncture & Moxibustion Medicine, College of Korean Medicine, Gachon University,

1: Namsangcheon Herbal Medicine Dispensary, 2: Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University

In this study, we investigated the effects of MOK pharmacopuncture at high-doses which are increased 10 to 100-fold in clinics, on propylthiouracil (PTU)-induced hypothyroidism in rats and the safety. We measured the changes of body weight, food and water intake, body temperature, the serum levels of thyroid hormones (TSH, T3, and T4), AST and ALT, glucose, lipid metabolites (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglyceride) and observed histopathological changes of thyroid tissues by H&E staining. We also analyzed the peaks of constituents of MOK using HPLC. In the results, the treatment of MOK pharmacopuncture at high-dose (30 mg/kg) in hypothyroidism-induced rats for 2 weeks was shown the improvement effects on the decrease of body weight, food intake, and body temperature. The MOK pharmacopuncture at high dose regulated the imbalance of thyroid hormones, glucose, and lipid metabolites and also inhibited the structural damages of thyroid tissues. In liver damage, the MOK pharmacopuncture at high dose reduced the increase of AST and ALT levels in hypothyroid rats. We identified the MOK constituents in HPLC analysis. In conclusion, the treatment of MOK pharmacopuncture at high dose has a therapeutic effect on hypothyroidism without liver toxicity, suggesting that the MOK pharmacopuncture be usefully applicable to treat with hypothyroidism in clinics.

keywords : Hypothyroidism, MOK pharmacopuncture, Propylthiouracil (PTU), High-dose

서 론

갑상선기능저하증(hypothyroidism)은 갑상선 조직 손상에 따른 갑상선호르몬 합성이 불가능해지거나, 갑상선호르몬 조절 상위 중추인 시상하부 또는 뇌하수체 기능 이상으로 갑상선 호르몬 합성 단계에 장애가 생겨 갑상선호르몬 생산이 결핍되어 발생하는 대사 성질환이다.¹⁻³⁾ 갑상선호르몬은 결핍 정도에 따라 증상이 다르게 발현되는데, 태아 및 영아기의 뇌와 골격계 발달 장애와 저하된 열 발생으로 인한 체온하강, 그리고 조직 내 대사율 감소로 인한 이화 작용 저하와 이를 통한 대사산물의 축적 및 모든 장기들의 기능저하 등이 주로 나타나게 된다.¹⁾

서양의학에서의 갑상선기능저하증 치료는 주로 갑상선호르몬제인 Levothyroxine (L-Thyroxine)를 투여하여 부족한 갑상선호르

몬을 보충하는 호르몬요법을 사용하고 있으며, 장기간 복용해야 하는 불편함, 허혈성 심장질환의 발생, 갑상선 호르몬 요구량의 변화 등의 문제점과 함께 갑상선호르몬을 보충해주더라도 임상증상이 개선되지 않는 문제점도 발생하고 있다.¹⁻³⁾ 따라서 이러한 치료제의 단점을 보완하면서 치료의 효율을 높일 수 있는 새로운 치료기술 개발 연구가 필요하다.

갑상선 질환은 한의학에서 영(癭)이라 하여 신체 음양의 불균형으로 발생한다고 보아, 질환의 원인이라 생각되는 면역기능의 불균형을 정상화시킴으로써 증상개선 뿐 아니라 원인치료까지 동시에 할 수 있다고 보며, 침, 약침, 뜸, 약물 요법 등의 다양한 치료방법을 사용하고 있다. 현재 침구 및 한약을 활용한 갑상선 질환 치료에 대한 연구들이 보고되고 있으나⁴⁻⁸⁾ 실제 임상에서 갑상선질환 치료에 활용되고 있는 약침 침구요법에 대한 연구사례는 아직 부족

* Corresponding author

Hyo Won Jung, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Dongdaero 123, Gyeongju 38066, Korea

E-mail : tenzing2@hanmail.net Tel : +82-54-770-2367

Received : 2019/02/05 Revised : 2019/04/25 Accepted : 2019/04/30

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.04.33.2.123

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

하여 연구가 필요한 실정이다.⁹⁻¹³⁾ 중의학에서도 갑상선질환 치료에 약침 활용에 대하여 혈위주사와 침 치료 병행, 황기와 리도카인 혼합 혈위주사에 대하여 보고¹⁴⁾된 바 있으나 이외 연구 사례는 거의 없다. 또한 한약과 관련된 연구에서는 국내 연구자들을 중심으로 갑상선기능항진증 및 저하증 동물실험 모델에서의 효능이 보고⁴⁻⁸⁾되고 있으나 아직 대사조절이나 면역조절 기전에 대한 구체적 연구는 많이 보고되지 않았다.

MOK는 자하거, 우황, 사향, 웅담 등 10종 한약재로 구성된 면역약침액으로, 임상에서 수승화강 치료 외에 갑상선기능항진증, 갑상선기능저하증, 갑상선비대증 및 갑상선종 등의 다양한 갑상선 질환 치료에 활용되고 있다.¹⁵⁾ 갑상선 질환에서의 MOK 약침 치료는 갑상선 부위 근처의 혈위인 양측 수돌혈(ST10)에 적용되며, 시술방법이 간단하고 갑상선 부위에 직접적으로 약물효과를 줄 수 있기에 치료효율을 높여 줄 수 있다. 본 연구자는 선행연구에서 세포실험을 통하여 MOK 약침액의 항산화, 항염증 및 면역조절 기능을 확인하였으며, 갑상선기능저하증 및 갑상선기능항진증 동물모델에서 체온조절, 갑상선호르몬 분비조절, 항산화 및 Th1/Th2 면역반응 조절을 통한 증상개선 효과를 확인하였다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 이를 바탕으로 본 연구에서는 갑상선기능저하증 치료를 위한 MOK 약침의 임상용량에 대한 적절성을 평가해보기 위하여 현재 갑상선기능저하증 유발에 많이 사용되고 있는 propylthiouracil(PTU)의 투여^{6-8,22-24)}로 갑상선기능저하증이 유발된 흰쥐에서 MOK 약침의 적정 투여용량과 안전성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) MOK 약침

남상천원외탕전원에서 조제한 MOK 약침액을 본 실험에 사용하였다. 자하거(*Hominis Placenta*, 2 mg/mL), 사향(*Moschus berezovskii*, 0.3 mg/mL), 웅담(*Ursus arctos*, 0.3 mg/mL), 우황(*Bos taurus*, 0.3 mg/mL), 황금(*Scutellaria baicalensis*, 10 mg/ml), 황백(*Phellodendron amurense*, 10 mg/ml), 백두옹(*Pulsatilla koreana*, 10 mg/ml), 산두근(*Sophora tonkinensis*, 10 mg/ml), 목향(*Aucklandia lappa*, 5 mg/ml), 침향(*Aquilaria agallocha*, 5 mg/ml)으로 구성된 MOK 약침액(53.1 mg/mL)을 실험직전 멸균된 생리식염수에 이용하여 적정 용량으로 보정하여 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 연구에 사용된 시약으로는 propylthiouracil(6-Propyl-2-thiouracil, PTU), L-thyroxine (Sigma-Aldrich, CA, USA), thyroid stimulating hormone(TSH), triiodothyronine(T3), thyroxine(T4) enzyme-linked immunoassay(ELISA) kit(Cusabio, Hubei, China), Hematoxylin & eosin(H&E) solution(Seoulin Biosciences Co., Seoul, Korea)이며, 본 연구에 사용된 기기로는 자동혈액분석기(FDC7000i, Fujifilm Co., Tokyo, Japan), 직장체온계 (Thermalert TH-8 (Physitemp Instruments, Clifton, NJ, USA), 현미경(LEICA, Wetzlar, Germany), ELISA reader(ASYS,

Austria), 추출기(Daihan scientific Co., Ltd., Wonju, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd., Tokyo, Japan), 동결건조기 (Ilshin Lab Co., Ltd, Yangju, Korea), 등을 사용하였다.

3) 실험동물

본 연구에서는 5주령 170~190 g의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 랫드(rat)를 (주)오리엔트바이오 (Seoungnam, Korea)로부터 공급받아 7일 동안 순화시킨 후 실험모델 제작에 사용하였다. 실험기간 동안 일정량의 고형사료(200 g)와 정수된 물(500 mL)을 섭취시켰으며, 실험종료까지 12시간(Day light 08:00~20:00) 주기의 명암으로, 23±2°C의 실내온도와 50±10%의 습도를 유지하여 일정한 사육조건을 유지시켰다. 본 실험은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험윤리위원회 심의(IACUC-2016-006)에 따라 모든 동물들을 관리하였다.

2. 방법

1) 갑상선기능저하증 동물모델 제작

랫드에 갑상선기능저하증 유발을 위해 10 mg/kg/body weight(b.w.) 용량의 PTU를 0.3 mL 생리식염수에 용해한 후 매일 1회씩 4주 동안 등(dorsal) 쪽 경부에 피하 주사하였다. 정상 균은 경부 피하(cervical subcutaneous)에 PTU 대신 동일 용량의 생리식염수를 주사함으로써 동일한 실험 조건을 유지하였다. 2주간 PTU를 주사하였을 때 3주가 시작되는 시점부터 실험종료까지 매일 1회씩 2주 동안 갑상선 부위에 MOK 약침액을 3 mg/kg/b.w. 또는 30 mg/kg/b.w. 용량으로 피하 주사(subcutaneous injection)하였다. 양성 대조약물로 갑상선호르몬제인 L-thyroxine (0.5 mg/kg/b.w.)를 기존 연구^{6,7,23,24)}에서와 같은 방법으로. 복강 주사(intraperitoneal injection)하였으며, 정상군과 PTU-투여 갑상선기능항진증 유발 대조군은 MOK 약침액과 동일한 양의 생리식염수를 갑상선 부위에 피하 주사하였다(Fig. 1).

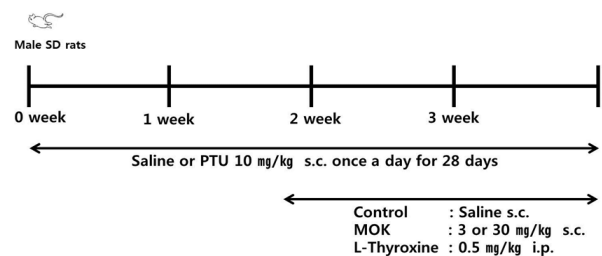


Fig. 1. Experimental design for PTU-induced hypothyroid rat model.

2) 생리학적 변화 평가

실험기간인 4주 동안 매주 1회 체중(body weight), 섭취량(food intake), 음수량(water intake), 직장체온(rectal temperature)의 변화를 측정하였다. 섭취량의 경우, 매주 1회 고형사료 200 g을 제공 후 다음 측정 때 잔여량을 측정하여 평가하였고, 음수량은 매주 1회 정수된 물 500 mL 제공 후 1주일 후 잔여량을 측정하여 평가하였다. 또한 직장체온은 실험동물을 고정하고 나서 직장체온계를 삽입하여 5초간 고정된 후 체온 변화가 없는 수치를 기록하였다.

3) 혈액학적 변화 평가

실험이 종료된 후에, 실험동물을 희생시키고 복대정맥(abdominal vein)에서 혈액을 채취하였고, 혈청을 분리하여 -80°C에 보관하였다. 혈청 내 갑상선호르몬인 TSH, T3, T4의 농도를 각 호르몬에 대한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well plate에 표준용액과 혈청을 100 µl씩 넣고 conjugate를 넣은 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 wash buffer를 이용하여 3회 세척한 후 HRP-avidin을 넣어 37°C에서 30분간 반응시키고 3회 세척하였으며, 여기에 기질액(substrate)을 넣어 37°C에서 15분 반응시켰다. 반응정지액을 넣어 반응을 종료시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 각 호르몬 농도는 표준용액을 사용하여 표준곡선을 만든 후 정량 값으로 환산하였다. 한편, 혈청 내 AST, ALT, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride 및 glucose의 농도를 자동혈액분석기를 이용하여 측정하였다.

4) 조직학적 변화 평가

실험이 종료된 후에, 실험동물을 희생시키고 갑상선 조직을 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 담가 고정하고, 파라핀 포매 과정 후 microtome을 이용하여 2 µm 두께로 절편하여 조직슬라이드를 제작하였다. 조직슬라이드의 H&E 염색을 위하여 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2~3분간 염색한 후 탈수과정을 거쳐 mounting한 후 광학현미경으로 조직의 구조적 변화를 관찰하였다.

5) 통계학적 검정

본 연구는 최소 3회 반복 수행되었고, 모든 결과는 평균과 표준편차 (mean±SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, CA, USA)을 이용하여 one-way ANOVA와 Tukey's test를 통한 검정으로, p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

6) MOK의 구성약물에 대한 HPLC 분석

MOK 약침은 남상천원외탕전원에서 제조된 5배 농축 약침액을 0.2 µm cellulose acetate filtering 하여 사용하였으며, 남상천원외탕전원에서 수급한 MOK 구성 약재(자연담은, 양주, 한국)를 처방대로 추출한 후, 제조하여 0.2 µm cellulose acetate로 필터하여 사용하였다.

HPLC 분석은 PDA (Photodiode Array) Detector 검출기가 있는 Waters Delta 600 (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였고 Column은 CAPCELL PAK C18 UG80 (SHISHEIDO Co., Ltd. Japan)을 사용하였으며, 용매는 물과 B (ACN + 0.1% formic acid)으로 하였다. Gradient 프로그램은 0 min, 0%B; 5 min, 10%B; 40 min, 50%B; 60 min, 100%B로 하였다. UVA 260 nm에서 검출하였으며, flow rate는 1 mL/min, injection volume은 50~100 µL로 하였다.

결 과

1. 갑상선기능저하증에 따른 체중 변화에 대한 효과

체중 변화에 대한 MOK 약침의 효과를 확인하기 위해 매주 체

중 변화를 측정한 결과, 정상군에 비해 PTU를 2주(P<0.05)와 4주(P<0.001) 간 투여한 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 유의적으로 체중이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 PTU 투여 3주째부터 2주간 MOK 약침 및 대조약물(L-Thyroxine, 0.5 mg/kg)을 처치하였을 때 저용량 MOK(0.3 mg/kg, P<0.05) 및 L-Thyroxine 처리군(P<0.01)에서 대조군에 비해 유의적인 체중 증가가 나타났다. 한편 고용량(3 mg/kg) MOK 처치군에서는 대조군보다 체중이 증가하였으나 유의적이지는 않았으며, 저용량 처치군보다 변화가 적은 것으로 나타났다(Table 1).

Table 1. Effects of MOK pharmacopuncture on the changes of body weight in PTU-induced hypothyroid rats

Group	Period		
	0 week (g)	2 week (g)	4 week (g)
Normal	211.8±15.32	291.2±22.82	321±34.15
Control	204.67±10.26	263.17±15.12a*	233±7a***
MOK 3	213.6±4.88	269±3.81a*	257.6±10b*
MOK 30	217±2	262±13.27a*	249.25±5
L-Thyroxine	212.2±6.42	261.6±23.14a*	288.6±26.02b***

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroid group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug.

2. 갑상선기능저하증에 따른 섭식량 및 음수량 변화에 대한 효과

섭식 변화에 대한 MOK 약침의 효과를 확인하기 위해 매주 섭식량을 측정한 결과, 2주간의 PTU 투여는 갑상선기능저하증 발생으로 정상군(normal)에 비해 유의적인(P<0.001) 섭식량 감소를 나타내었다. 또한 MOK 약침 저용량 및 고용량 처치는 대조군에 비해 섭식량 감소를 다소 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았으며, L-Thyroxine 처리군은 유의적인(P<0.001) 섭식량 증가를 나타내었다(Table 2). 한편, 음수량 변화에서는 정상군에 비해 대조군에서 감소하였으며, MOK 약침 및 L-Thyroxine 처치는 음수량 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 2. Effects of MOK pharmacopuncture on the changes of food intake in PTU-induced hypothyroid rats

Group	Period			
	1 week (g)	2 week (g)	3 week (g)	4 week (g)
Normal	157.33±13.58	148±19.31	153.67±12.06	139±11.77
PTU Control	133.33±9.07a***	118.67±2.89a***	96.33±5.51a***	74.6±5.97a***
MOK 3	146.67±2.89	119.5±9.27a***	102.6±12.07	82±7.12
MOK 30	144.67±3.89	120.67±4.95a***	91±1.41	77±4.24
L-Thyroxine	144.33±4.04	126.67±14.57a***	121±10.58b***	129±10.98b***

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). **P<0.01 and ***P<0.001 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug.

3. 갑상선기능저하증에 따른 체온 변화에 대한 효과

체온 변화에 대한 MOK 약침의 효과를 확인하기 위해 매주 체온 변화를 측정한 결과, PTU 투여 2주째 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비해 유의적인(P<0.001) 체중감소가 나타났으며, 4주까지 체온감소 현상이 관찰되었다. MOK 약침을 2주 동안 저용량(0.3 mg/kg)과 고용량(30 mg/kg) 처치하

였을 때 두 용량 모두 대조군에 비해 체온이 유의적으로($P<0.05$, $P<0.01$) 증가하는 것으로 나타났다. 또한 L-Thyroxine 투여군에서도 대조군에 비해 체온이 유의적으로($P<0.001$) 증가되었으며, 정상군보다 유의적인($P<0.001$) 증가를 나타내었다(Table 4).

Table 3. Effects of MOK pharmacopuncture on the changes of water intake in PTU-induced hypothyroid rats

Group	Period			
	1 week (ml)	2 week (ml)	3 week (ml)	4 week (ml)
Normal	263±17.06	184±18.17	296±11.4	217±31.14
PTU Control	216.67±19.66 ^{a**}	163.33±24.22	166.67±10.33 ^{a***}	183.33±27.87 ^{a*}
MOK 3	210±14.96 ^{a***}	202.5±5	209±19.81 ^{b***}	185±20.31
MOK 30	202±29.44 ^{a***}	220±15 ^{a**}	174±20.82	186±18.71
L-Thyroxine	213.33±15.28 ^{a***}	213.33±11.55	265±35 ^{b***}	210±17.32

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug.

Table 4. Effects of MOK pharmacopuncture on the changes of body temperature in PTU-induced hypothyroid rats

Group	Period			
	1 week (°C)	2 week (°C)	3 week (°C)	4 week (°C)
Normal	36.52±0.2	36.83±0.38	36.68±0.2	36.30±0.17
PTU Control	36.5±0.19	35.35±0.29 ^{a***}	35.00±0.14 ^{a***}	35.2±0.20 ^{a***}
MOK 3	36.95±0.26	35.80±0.20 ^{a***}	36.12±0.15 ^{b***}	35.86±0.32 ^{b*}
MOK 30	36.86±0.21	35.64±0.21 ^{a***}	35.73±0.05 ^{b**}	35.90±0.37 ^{b**}
L-Thyroxine	36.92±0.27	35.83±0.21 ^{a***}	38.12±0.47 ^{b***}	37.36±0.21 ^{ab***}

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug.

4. 갑상선기능저하증에 따른 갑상선호르몬 분비 변화에 대한 효과

혈청 내의 TSH, T3, T4의 농도를 측정하여 갑상선호르몬 분비 변화에 대한 MOK 약침의 효과를 확인하였다. 그 결과, TSH는 정상군(normal)에 비해 PTU 투여 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 유의적으로 증가되었고($P<0.001$), 이는 MOK 약침 저용량(0.3 mg/kg, $P<0.01$) 및 고용량(3 mg/kg, $P<0.01$) 처치에 의해 유의적으로 감소하였다. L-Thyroxine 투여군에서는 대조군에 비해 유의적으로($P<0.001$) 감소하였고, 정상군보다 더 감소한 것으로 나타났지만 유의하지는 않았다.

T4 분비는 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로($P<0.001$) 감소하였고, MOK 약침액 저용량($P<0.001$) 및 고용량($P<0.001$) 처치 시 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. L-Thyroxine 투여군에서는 대조군에 비해 유의적으로($P<0.001$) 증가하였고, 정상군보다 유의적인($P<0.001$) 증가를 나타내었다.

T3 분비는 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로($P<0.01$) 감소하였고, MOK 약침액 저용량($P<0.01$) 및 고용량($P<0.01$) 처치 시 대조군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었다. 특히 고용량 MOK 약침액 처치군에서 정상군과 유사한 T3 분비 증가 수치를 나타내었다. L-Thyroxine 투여군에서는 대조군에 비해 다소 증가하였으나, 유의성은 나타나지 않았으며, 정상군보다 유의적인($P<0.05$) 증가를 나타내었다(Table 5).

5. 갑상선기능저하증에 따른 갑상선 조직의 구조적 손상에 대한

효과

갑상선 조직의 병리적 손상에 대한 MOK 약침의 효과를 확인하기 위해 갑상선 조직을 H&E 염색하였다. 그 결과, 정상군(normal)에서는 여포(follicle)의 직경이 넓고 여포 외벽(follicular lining epithelium)의 변화가 없는 반면, 대조군(control)에서는 정상군에 비하여 여포 직경의 크기가 감소하였고, 여포 외벽에 있는 여포세포의 수적인 증가로 외벽이 비후되었으며, 여포 모양이 손상된 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 대조군에서의 갑상선 조직 손상은 MOK 약침액 저용량(3 mg/kg) 및 고용량(30 mg/kg) 처치에 의하여 여포 직경의 증가와 외벽 비후의 감소로 개선된 것을 확인할 수 있었다. 또한 L-Thyroxine 투여군에서도 여포 직경 감소 및 외벽 손상이 개선된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Table 5. Effects of MOK pharmacopuncture on the changes of serum thyroid hormone levels in PTU-induced hypothyroid rats

Group	TSH (ng/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (µg/mL)
Normal	0.55±0.04	1.27±0.13	65.00±0.47
PTU Control	11.95±0.78 ^{a***}	1.04±0.04 ^{a*}	39.60±0.31 ^{a***}
MOK 3	7.73±2.71 ^{b*}	1.15±0.02 ^{b*}	43.11±0.39 ^{b***}
MOK 30	7.31±0.43 ^{b*}	1.23±0.07 ^{b*}	43.41±0.28 ^{b***}
L-Thyroxine	0.48±0.03 ^{b***}	1.07±0.05 ^{a*}	83.13±2.09 ^{ab***}

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug. TSH, Thyroid stimulating hormone; T3, Tri-iodothyronine; and T4, Thyroxine.

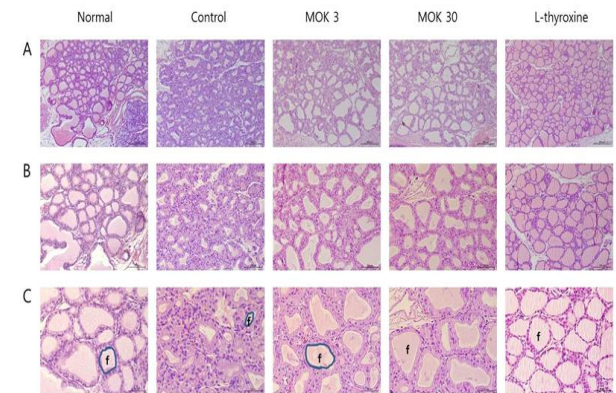


Fig. 2. Effects of MOK pharmacopuncture on the histopathological changes of thyroid tissue in PTU-induced hypothyroid rats. MOK pharmacopuncture was subcutaneously administration once daily for 2 weeks, and isolated thyroid glands from the rats. Thyroid tissues were prepared paraffin-formatted slide, and stained with H&E dye. Morphological changes were observed by microscope ×100 (a), ×200 (b), and ×400 (c) in original magnification. Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug. f, follicle.

6. 갑상선기능저하증에 따른 간 수치 변화에 대한 효과

PTU 투여 갑상선기능저하증 유발 및 MOK 약침 처치가 간 기능 손상에 미치는 영향을 확인하기 위하여 혈청 내 AST($P<0.01$)와 ALT($P<0.001$)의 수치 변화를 확인하였다. 그 결과, 정상군(normal)에 비해 대조군(control)에서 유의적으로 AST와 ALT 수치가 증가하였으며, 저용량(0.3 mg/kg, $P<0.01$) 및 고용량(3

mg/kg, $P < 0.01$) MOK 약침액과 L-Thyroxine 처치에 의해 AST 수치가 대조군에 비해 유의적으로($P < 0.01$) 감소하였다(Fig. 3).

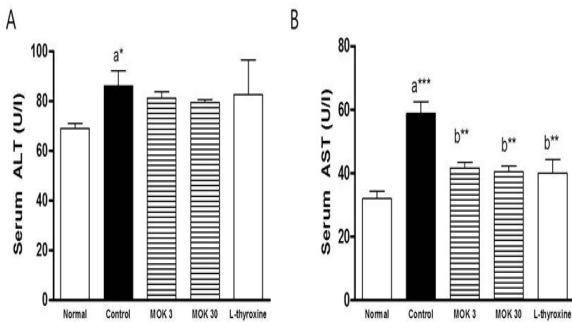


Fig. 3. Effects of MOK pharmacopuncture on the levels of AST (A), and ALT (B) in PTU-induced hypothyroid rats. MOK pharmacopuncture was subcutaneously administration once daily for 2 weeks, and measured the levels of AST (A) and ALT (B) in the sera of rats by automatic blood biochemical analyzer. Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug.

7. 갑상선기능저하증에 따른 지질 및 당 성분 함량 변화에 대한 효과

갑상선기능저하증 유발에 따른 지질 및 당 대사변화에 대한 MOK 약침의 영향을 확인하기 위하여 혈청 내 triglyceride, HDL-cholesterol, LDLcholesterol, total cholesterol, glucose의 농도를 측정하였다. 그 결과, 정상군(normal)에 비해 PTU 투여 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 total cholesterol ($P < 0.001$), LDL-cholesterol($P < 0.001$) 분비가 유의적으로 증가하였고, triglyceride($P < 0.01$), glucose($P < 0.001$) 분비가 유의적으로 감소하였다. 또한 MOK 약침액 저용량(0.3 mg/kg)과 고용량(3 mg/kg) 및 L-Thyroxine 투여는 대조군에 비해 total cholesterol($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) 및 LDL-cholesterol ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.001$) 분비 증가를 유의적으로 감소시켰다. MOK 약침은 total cholesterol에 대해서는 용량 별 차이가 나타나지 않았으나, LDL-cholesterol에서는 저용량이 고용량에서 보다 현저한 감소효과를 나타내었다. 또한 HDL-cholesterol에서는 낮은 농도의 MOK 3mg/kg가 MOK 30mg/kg에 비해 오히려 정상군에 가까운 수치를 나타내었으며, L-Thyroxine 투여군에서는 대조군에 비해서 현저하게 감소되었다. Triglyceride에서는 저용량(0.3 mg/kg, $P < 0.05$)과 고용량(3 mg/kg, $P < 0.01$) MOK 약침 처치에서 모두 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타냈고, L-Thyroxine 처리에서는 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 또한 glucose 수치는 MOK 약침액 저용량($P < 0.05$) 및 고용량($P < 0.01$)과 L-Thyroxine($P < 0.05$) 처치에서 모두 대조군 보다 유의적인 증가를 나타내었다(Table 6).

8. MOK 약침의 구성 약재별 HPLC 분석 결과

본 연구에서는 약침의 조제과정에서 각각의 약물들의 손실없이

포함되어 있는 상태를 확인하고자 MOK 약침농축액과 각각의 약재들을 HPLC 분석을 하였으며, MOK 약침 5배 농축액과 웅담, 우황, 사향, 자하거, 백두옹, 목향, 침향, 황금, 황백, 산두근 등의 10가지 약물추출액의 peak 분석을 통하여, MOK 약침액에서의 약재들 각각의 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

Table 6. Effects of MOK pharmacopuncture on the levels of lipid metabolites and glucose in PTU-induced hypothyroid rats

Group	Lipid metabolites				Glucose (mg/dl)
	T-CHO (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	TG (mg/dl)	
Normal	93.93±4.71	84.33±1.70	7.33±3.92	28.67±7.59	115.33±11.47
PTU Control	163±11.66 ^{a***}	71.25±9.42	91.2±6.23 ^{a***}	13.37±2.62 ^{a*}	64.67±2.62 ^{a***}
MOK 3	140.5±26.26 ^{b*}	82.25±13.10	53.96±12.08 ^{b***}	25.2±4.79 ^{b*}	76.67±4.78 ^{b*}
MOK 30	136.67±10.27 ^{b*}	73.05±18.50	62.2±1.42 ^{b***}	26.05±12.59 ^{b**}	77±1.87 ^{b**}
L-Thyroxine	92±7.79 ^{b***}	45.8±6.11 ^{b**}	42.4±1.70 ^{b***}	27±9.95	88±4.90 ^{b*}

Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism group; MOK 3, MOK 3 mg/kg-treated group in control; MOK 30, MOK 30 mg/kg-treated group in control; and L-Thyroxine, L-Thyroxine 0.5 mg/kg-treated group as a reference drug. T-CHO, total cholesterol; HDL, HDL-cholesterol; LDL, LDL-cholesterol; TG, triglyceride.

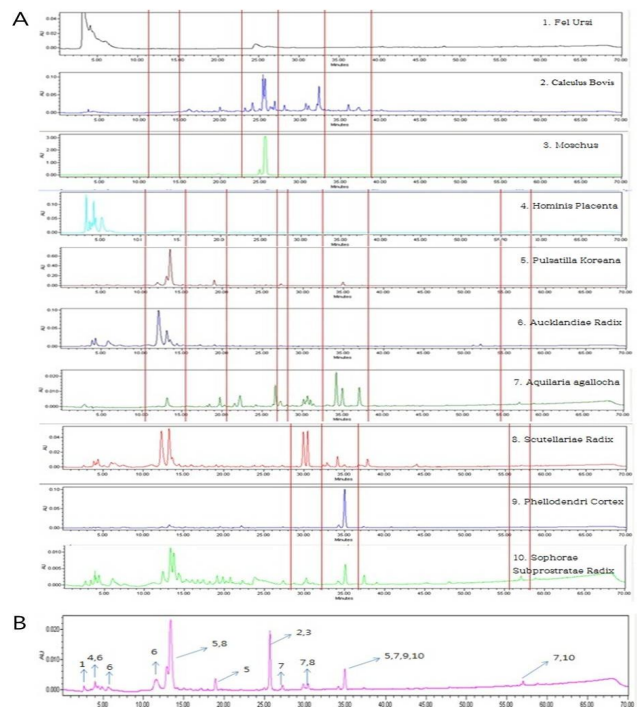


Fig. 4. HPLC pattern analysis of the constituents of MOK extract. (A) Each constituent herb peak: 1. Fel Ursi 2. Calculus Bovis 3. Moschus 4. Pulsatilla Koreana 5. Aucklandiae Radix 6. Aquilaria agallocha 7. Hominis Placenta 8. Scutellariae Radix 9. Phellodendri Cortex 10. Sophorae Subprostratae Radix; and (B) MOK extract.

고찰

갑상선기능저하증은 갑상선으로부터 갑상선호르몬 생산이 결핍되어 발생하는 병증을 통칭하며, 갑상선호르몬이 결핍되면 인체 내 각종 대사 작용에 여러 영향을 미치게 된다. 즉, 갑상선호르몬 부족은 심장에 점액수종이 생겨 수축력 감소, 심비대, 심삼상출, 심박수와 심박출량 감소로 인한 맥압 감소 등을 초래하고, 위산분비와

위장 운동성 저하로 인한 위장의 장내 진행 장애와 월경불순, 무배란, 불임 등의 증상 및 대사 이상으로 인하여 콜레스테롤 증가 및 혈당 증가, 인슐린 저항성 등을 유발하게 된다¹⁻³⁾. 또한 추위 불내성, 비만, 거친 피부, 발한 감소, 식욕 감소, 무기력, 우울, 변비, 관절 및 근육통, 기억력 감소, 시력 감소, 거친 목소리 등의 비특이적 증상들이 동반된다¹⁻⁴⁾. 따라서 갑상선기능저하증 치료의 목표는 위와 같은 임상증상의 진행을 막고, 정상적인 호르몬(TSH, T4) 수준을 유지시켜 정상적인 대사과정이 진행되도록 하는 것이다. 현재 양방에서는 일정량의 갑상선호르몬제(Levothyroxine)를 매일 복용하는 것과¹⁹⁾ T4 단독만으로 증상이 개선되지 않을 경우 T3, T4 호르몬을 함께 복용하는 것이 도움이 된다고 본다²⁰⁾. 그러나 이러한 호르몬요법은 손상된 갑상선을 재생시킨다거나 면역기능을 근본적으로 회복시키는 것이 아니기에, 대부분의 환자는 호르몬제를 평생 복용해야 하고, 일부는 호르몬보충요법을 통해 정상화된 갑상선 호르몬 농도를 가졌음에도 불구하고 증상이 지속되기도 한다²¹⁾.

갑상선 질환은 한 번 발병하면 완치가 어려운 질환으로, 증세가 호전되었다 하더라도 재발률이 높으며, 연령이 증가할수록 발생 빈도가 높아지기 때문에 향후 고령화 사회와 더불어 더욱 증가할 것으로 예상된다. 이에 본 저자는 갑상선 질환 치료에서 양방에서의 호르몬대체요법과 다르게 MOK 약침액을 활용한 침구치료를 통하여 갑상선기능이상을 효과적으로 개선시킬 수 있음에 착안하여 MOK 약침액의 효과와 기전을 밝히고자 다양한 선행 연구를 수행한 바 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 선행연구에서 MOK 약침은 갑상선기능저하증 및 갑상선기능항진증 랫드모델에서 체온 조절, 갑상선호르몬 분비 조절, 항산화 효과 및 Th1/Th2 면역반응 조절 등 다양한 기전조절을 통해 증상을 개선시켰다.

MOK 약침은 심장에 우황, 사향, 응담 등을 추출한 氣劑에, 심장에 潤을 보충해주는 자하거 추출물인 냉성윤제가 혼합되어, 심장 질환 및 갑상선질환에 효과가 우수한 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. MOK는 인체의 기혈순환 및 심신 안정을 위한 水升火降 치료법에 주로 쓰이는 약침액으로, 火性經絡 치료 및 火喘에 사용되며, 임상적으로 경계, 정충, 수면장애, 협심증, 갑상선질환, 화병 등의 다양한 질환에 활용하고 있다¹⁵⁾. 갑상선 질환에서 MOK 약침의 임상 사용량은 0.2-0.6 mL/회로, 이는 약 0.18~0.53 mg/kg 용량에 해당하고, 60 kg 성인 기준 일반적 사용량은 평균 0.4 mL(0.35 mg/kg)이다. 이를 바탕으로 본 연구자는 선행 동물실험 연구¹⁷⁾에서 0.3~1.5 mg/kg 용량 처치에 따른 개선효과를 확인한 바 있다. 본 연구에서는 임상 및 선행연구 결과를 바탕으로 MOK 약침액의 고용량 투여에 따른 안전성과 효능을 확인해 보고자 임상용량의 10배와 100배에 해당하는 3 mg/kg와 30 mg/kg 용량을 동물모델에 처치하여 실험을 수행하였다.

최근 갑상선기능저하증에 대한 한약의 효능연구로는 인삼⁷⁾, 시호⁸⁾, 음양곽²²⁾, 육종용²³⁾, 부자⁶⁾, 오매²⁴⁾ 등이 보고된 바 있다. PTU는 대표적 항갑상선제로, 갑상선에서 iodine과 tyrosine의 결합 억제를 통해 TSH 분비 증가 및 T3, T4의 분비 감소시킴으로써 비활동성 갑상선 종대 유발로 갑상선 기능을 억제하며, 갑상선기능저하증 동물모델 제작에 있어서 현재 많이 사용되고 있다.^{6-8,22-24)} 본 연구에서도 PTU 경피주사방법에 의해 갑상선기능저하증이 유발

된 랫드모델을 제작하였고, 갑상선기능저하증 유발에 따른 체중의 전반적인 감소, 체온 감소, 혈당과 지질산물의 증가, 갑상선조직의 구조적 변형, 갑상선 호르몬 분비 이상 등 병적 특징을 관찰할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 현재 양방치료제로 사용되고 있는 티로신(T4) 합성호르몬인 Levothyroxine(L-Thyroxine)을 대조약물로 사용하여 MOK 약침의 갑상선기능저하증 개선 효과를 비교하였다. 갑상선기능저하증에서는 일반적으로 혈청 내 TSH의 농도가 증가되어 있거나 T3와 T4의 농도가 감소되어 있으며 특히 T4는 갑상선 기능 평가에 널리 사용되는 혈액마커이다. 본 연구에서 PTU 투여 갑상선기능저하증 랫드의 혈청 내 TSH 분비 증가와 T3, T4 분비 감소를 확인하였다. 또한 MOK 약침 처치는 TSH, T3, T4 분비 이상을 모두 조절하여 갑상선 기능을 회복시킬 수 있는 것으로 나타났으며 특히 T3 분비 조절 효과는 대조약물인 L-Thyroxine 투여에서 보다 우수한 것으로 나타났다. 반면 대조약물인 L-Thyroxine는 대조약물인 L-Thyroxine는 TSH와 T4 분비를 정상 수준으로 조절하는 것으로 나타났으며, T3 분비는 정상군 보다 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났고, TSH는 다소 감소시키는 것으로 나타났다.

PTU의 투여는 갑상선조직에서 현저한 갑상선 여포세포 증식(hyperplasia)에 의한 비대와 여포 직경 및 여포 내 콜로이드 물질의 감소를 유발시키는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ 본 연구의 TU 투여로 갑상선기능저하증이 유발된 랫드의 갑상선 조직에서는 여포 직경의 감소, 여포 외벽에서 여포세포 수적 증가로 인한 외벽의 비후 및 여포의 형태적 손상을 확인할 수 있었으며 이러한 구조적 손상은 MOK 약침 저용량 및 고용량 처치에 의해 개선되어짐을 확인하였다. 이는 MOK 약침이 갑상선기능저하증 유발에 따른 갑상선 조직 손상을 막아줌으로써 갑상선 호르몬 분비 기능을 회복시킬 수 있음을 의미한다.

갑상선기능저하증의 대표적 증상으로 체온 감소가 있으며 이는 갑상선호르몬 부족으로 인하여 갑상선호르몬의 필수 기능인 체내 에너지 대사조절의 실패에 따라 체온 조절이 잘 되지 않아 추위를 잘 타게 되며 전반적인 대사기능 감소를 동반하게 된다.⁶⁾ 본 연구에서도 갑상선기능저하증이 유발된 랫드에서의 체온 감소를 확인하였으며, MOK 약침을 2주 간 처치하였을 때 체온의 유의적인 상승을 확인할 수 있었다. 이는 한의학에서 갑상선기능이상 치료의 일차적 목표인 음양 불균형 조절을 통한 항상성 회복이 MOK 약침치료를 통해 이루어짐으로써 체온조절에 작용한 것으로 생각된다. 한편 체온조절과 함께 대사저하에 의한 지질산물 분비 변화에 대한 MOK 약침 효과를 확인한 결과 total cholesterol, LDL-cholesterol과 같은 지질산물의 축적을 억제하고 triglyceride 및 혈당을 조절할 수 있음을 확인하였다.

한편 갑상선기능저하증은 전반적인 기초 대사량 감소로 체중 증가가 나타나는 것으로 알려져 있지만, 실제 체중 증가가 관찰되는 빈도는 54% 정도로²⁶⁾ 오히려 28%의 환자의 경우는 체중 변화가 없었고, 나머지 13%의 환자의 경우는 오히려 식욕부진으로 인해 체중이 감소한다고도 알려져 있다.²⁷⁾ 따라서 체중 증가 변화를 갑상선기능저하증의 필수 증상으로 보기 어려우나 본 연구에서는 갑상선기능저하증 유발 흰쥐의 체중 감소를 관찰하였고 이는 조직

내 당단백의 침착보다 식욕 감소가 더 커서 나타난 결과로 추정된다. 또한 L-Thyroxine 투여로 인한 체중 증가는 L-Thyroxine에 의한 대사의 이화작용 촉진 효과보다는 식욕 향진에 따른 섭취량 증가와 연관 있다고 추정된다. 본 연구에서 MOK 약침 처치는 갑상선기능저하증 유발에 따른 체중 감소와 섭취량 감소에 다소 영향을 주었으며, 음수량 감소에는 영향을 주지 않았다.

AST(aspartate aminotransferase, GOT)와 ALT(alanine aminotransferase, GPT)는 간 기능을 평가할 수 있는 간 효소로, 본 연구에서 PTU의 투여는 AST와 ALT 수치를 증가시켰으며, MOK 약침 처치는 특히 간에서만 특징적으로 생산되는 ALT의 감소에 효과적인 것으로 나타났다. 특히 고용량 처치에서 ALT 수치를 감소시킨 결과는 실제 임상에서 사용하는 용량 보다 100배 이상 처치하여도 간 손상을 유발하지 않음을 의미하는 것으로, 향후 임상에서 고용량 처치에 대한 안전성을 확인할 수 있었다고 생각된다. 이전연구의 MOK 약침의 일반 용량(0.3, 1.5 mg/kg)에서의 갑상선기능저하증 개선 효과¹⁷⁾와 비교해보면, 본 연구에서의 고용량(3, 30 mg/kg) MOK 약침 처치가 일반 용량 처리보다 더 효과적인 것으로 나타나지 않아서 일반 용량으로도 충분히 개선 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

본 연구자는 기 연구¹⁶⁾를 통해 MOK 약침액의 주요 구성약제에 대한 성분 분석을 통해 사향의 3-methylcyclopentadecanone (muscone), 웅담의 ursodeoxycholic acid(UDCA), 우황의 bilirubin, 황금의 5,6,7-trihydroxyflavone (baicalein)을 확인하였다. 본 연구에서는 MOK 약침액 내 구성약제의 분포 상태를 확인하고자 MOK 약침액과 각 약물에 대한 HPLC 프로파일 분석을 실시하였다. 그 결과, MOK 약침액 내 각 약물의 고유 peak를 확인할 수 있었으며, 이를 바탕으로 향후 구성약제 별 표준성분 분석을 실시할 예정이다. 이러한 MOK 약침액과 구성약제 및 표준성분에 대한 비교 분석은 MOK 약침액의 규격조건 설정에 도움을 줄 것으로 사료된다.

본 연구결과를 통해 MOK 약침 처치는 PTU 투여로 갑상선기능저하증이 유도된 랫드에서 체온의 감소를 상승시키고, 갑상선 조직 손상에 따른 갑상선호르몬 분비 이상을 개선시키며, 혈청 내 포도당과 지질산물의 축적을 조절함으로써 증상을 개선시킬 수 있음을 확인하였으며, 고용량에서 간 기능에 손상을 유발하지 않는 것으로 나타나서 임상에서의 사용 용량이 안전함을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 PTU 투여로 갑상선기능저하증이 유발된 랫드 모델에서 저용량(3 mg/kg) 및 고용량(30 mg/kg)의 MOK 약침 처치에 의한 개선 효과와 간 독성을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 체중, 섭취량, 음수량 감소에는 영향을 주지 않았다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 체온 저하를 증가시켰다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 TSH 증가 및 T4, T3 감소를 조절하였다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 갑상선 조직의 구조적

손상을 억제하였다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 혈청 내 total cholesterol, LDL-cholesterol 증가를 감소시켰으며, triglyceride, HDL-cholesterol, glucose 감소를 조절하였다.

MOK 약침은 갑상선기능저하증에 따른 혈액 내 ALT와 AST 수치 증가를 감소시켰다.

따라서 고용량 MOK 약침 처치는 간 손상 없이 안전하게 갑상선기능저하증 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 나타났다.

Acknowledgement

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIT) (No. 2017R1C1B5076224). This work was also supported by the Gachon University research fund of 2018.(GCU-2018-0299)

References

1. Doo HK. Oriental Medicine of Nephrology. Seoul: The Academy of oriental Medicine; 1993.
2. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JL, Morreale de Escobar G. Treatment of hypothyroidism with levothyroxine or a combination of levothyroxine plus L-triiodothyronine. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2015;29(1):57-75.
3. Cho BY. The clinical thyroidology. the 3rd editoin. Seoul: Korea Medicine; 2010. p. 437-76.
4. Lee M, Choi Y. Systemic Reviews of Domestic Experimental Studies of Herbal Medicines Used for Hypothyroidism since 2000. J. Int. Korean Med. 2015;36(4):570-81.
5. Lee M, C Jeon, MS Kang, Choi Y. Review of Domestic Experimental Studies of Herbal Medicines for Hyperthyroidism since 2000. J. Int. Korean Med. 2016; 37(6):949-60.
6. Hwang MS, Hwang JH, Kang SY, Kang AN, Roh HS, Park YK. Effects study of Aconiti Lateralis Radix Preparata extract on the regulation of heat and cold in PTU-induced hypothyroidism rats. Kor. J. Herbol. 2016;1(6):63-71.
7. Kim SM. Effects of Ginseng Radix on the Rat Hypothyroidism Induced by PTU (6-n-propyl-2-thiouracil). Kor J Herbol. 2010;25(3):11-8.
8. Kim SM, Ku SK, Cho SY, Park SJ. Effects of Bupleuri Radix on the Rat Hypothyroidism induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil). Kor J Orient Physiol Pathol. 2012;26(5):714-23.

9. Shon YH, Kim HC, Moon JS, Baek TS, Kim CH, Jeon BH, Nam KS. Effects of Gangung-tang on Lymphocyte Activities in Immunodeficiency Mice. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2004;18(4):995-1000.
10. Lee YS, Han SW. The Effect of Labiatae Herba Prunellae and Thesium chinese Turczaninow Aqua-acupuncture on Taechung(LR3) in Hyperthyroidism Rats. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 1997;14(1): 494-502.
11. Lee SY, Kim KS, Han JH. The Effect of Radix Angelicae gigantis aqua-acupuncture on the hypothyroidism induced by thiourea in rats. *Journal of Pharmacopuncture*. 1997;1(1):53-76.
12. Kim KH, Yun JH, Kim KS. Effect of Haejo - okho - tang Aqua - acupuncture by Density on the Hyperthyroidism Induced by Sodium Levothyroxine in Rats. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 1995;12(1):221-35.
13. Kim YS, Kang SG. A Study of the Effects of Ginseng Radix Aqua-Acupuncture on the Hypothyroidism induced by Thiourea in Rats. *Kyunghee Medicine*. 1990;19(2):202-10.
14. Li L. Clinical study on acupuncture and moxibustion for treatment of hypofunction of spleen kidney yang deficiency of thyroid function. Heilongjiang academy of traditional chinese medicine master's degree. 2014.
15. Jung C, Jeong JH, Lee MS. A clinical study of immune pharmacopunctureology. Chungnam: Kyungrak medical publishing co.; 2011.
16. Hwang JH, Kang SY, Kang AN, Jung HW, Jung C, Jung JH. et al. MOK, a pharmacopuncture medicine, regulates thyroid dysfunction in L-thyroxine-induced hyperthyroidism in rats through the regulation of oxidation and the TRPV1 ion channel. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):535.
17. Hwang JH, Jung HW, Kang SY, Kang AN, Ma JN, Meng XL. et al. Therapeutic effects of acupuncture with MOK, a polyherbal medicine, on PTU-induced hypothyroidism in rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16(1):310-20.
18. Hwang JH, Ma JN, Park JH, Jung HW, Park YK. Anti-inflammatory and antioxidant effects of MOK, a polyherbal extract, on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *International journal of molecular medicine*. 2019;43(1):26-36.
19. Jo BY. *Clinical Thyroidology*. Seoul: Korea Medical Book Publisher; 2001.
20. Roti E, Minelli R, Gardini E, Braverman LE. The use and misuse of thyroid hormone. *Endocr Rev*. 1993;14(4):401-24.
21. Clyde PW, Harari AE, Getka EJ, Shakir KM. Combined levothyroxine plus liothyronine compared with levothyroxine alone in primary hypothyroidism: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290(22):2952-8.
22. Hong MJ, Lee BC, Ahn YM, Ahn SY. The Effects of Epimedii Herba on a Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil). *J Pharmacopuncture*. 2011;14(4):13-22.
23. Lee SJ, Baek SH, Ahn SY, Lee BC, Ahn YM. Effects of Cistanche Deserticola on Thyroid Function in Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil). *Korean J Orient Physiol Pathol*. 2011;25(6):989-95.
24. Choi JY, Roh SS, Park JH, Koo JS, Seo BI. Effects of Mume Fructus on the Rat Hypothyroidism Induced by PTU(6-n-propyl-2-thiouracil). *Kor J Herbol*. 2015;30(4):109-19.
25. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol Sci*. 2002 ; 69 : 79-91.
26. Zulewski H, Muller B, Exer P, Misserz AR, Staub JJ. Estimation of tissue hypothyroidism by a new clinical score: evaluation of patients with various grades of hypothyroidism and controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(3):771-6.
27. Werner SC, Ingbar SH. *The thyroid: a fundamental and clinical text*. Hagerstown: Harper & Row; 1978. p. 847.