

息責丸 및 痞氣丸이 白血病과 淋巴腫 患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌 效果

姜 大 根 · 姜 秉 淇

I. 緒 論

息責丸은 李東垣이 入方하였으며⁵⁾ 在右脇下覆大如杯 久不愈 令人 酒漸寒熱 喘咳發肺癰하는 肺積을 다스리며 5. 6. 8. 10. 13. 14. 17. 20. 22 23) 또한 痞氣丸 역시 李의 處方으로서¹⁵⁾ 在于胃腕 大如盤 久不愈 令人 四肢不收 或發黃疸 飲食不爲肌膚하는 脾積을 다스리는 處方으로 5. 6. 8. 10. 13) 알려져 왔으며, 樓^{5-8. 13. 15)} 等에 依하여 臨床의으로 많이 應用되어 왔다.

積聚는 腹部에서 腫塊의 形象으로 觸知된다(1-3. 25) 點에 비추어 보아 大部分이 內科의 腫瘍의 範疇에 該當되는 것으로 생각되고 있으며 따라서 腹腔臟氣의 痞도 積聚의 一種으로 認識되고 있다.³⁾

抗癌效果에 對한 實驗的 報告로는 金³²⁾ 等의 人蔘鹿茸이 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産 抑制作用의 實驗에서 抗體生産抑制 緩和시킨다는 報告가 있었으며, 文³³⁾ 等은 薏朮等 數種의 韓藥物에서 抽出한 多糖類의 抗癌 및 免疫機能에 對한 實驗에서 刮目할 만한 制癌效果가 있다고 하였으며, Tang⁷⁶⁾ 等은 白朮이 Sasaki⁶⁴⁾ 는 甘草가, Odajima⁶⁵⁾ 는 人蔘이 各 各 抗癌 效果가 있다고 하였으며, 任³⁵⁾ 은 漁腥草, 鹿血, 猪苓, 穿山甲等이 強力한 抗癌效果가 있을 뿐 아니라 正常 免疫細胞에 對하여 毒作用도 없다고 報告하였다.

白血病과 淋巴腫은 癌腫의 一種으로서 白血病은 韓醫學의 血證, 熱據, 虛損, 勞瘵 癥瘕 積聚의 範疇에 屬하는 造血系의 惡性 疾病이며^{3. 18)} 淋巴腫은 淋巴系統의 惡性 種類를 總稱하며 淋巴腫大 壓迫症狀, 脾腫大, 貧血, 全

身症糖을 主證으로 하는 惡性 種類로서 近來에 發生 頻度가 增加되고 있는 趨勢이며¹⁸⁾ 이에 對한 韓醫學의인 研究가 必要하리라 생각된다.

이에 對한 研究의 一環으로 金³¹⁾ 은 伏梁丸이 肝癌 뿐만 아니라 白血病 患者의 癌細胞에서도 抗癌 效果가 있음을 立證하였으며 따라서 著者는 伏梁丸과 마찬가지로 積聚를 다스리는 處方으로 알려진 息責丸과 痞氣丸에서도 血液 淋巴腫에 效果가 있으리라 생각되어 이를 實驗的으로 究明하고자 白血病과 Lymphoma 患者에서 抽出한 癌細胞의 生存率에 미치는 抗癌效果 研究하여 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥 物

息責丸과 痞氣丸의 構成藥物과 用量은 東醫 寶鑑³⁰⁾에 依據하였으며 藥材는 圓光 大學校 韓醫科大學 附屬漢方病院에서 購入 後 精選하여 使用하였다.

2) 檢液의 調劑

息責丸 1575g과 痞氣丸 1000g을 各 各 round flask에 蒸溜水 2000ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 120 分間 加熱하여 各 各 1500ml와 1000ml의 抽出液을 얻었다. 이 抽出

液을 4°C 5,000rpm으로 20分間 遠心分離하여 粒子를 除去한 後에 각각 300ml가 되게 減壓 濃縮하여 本 實驗에 使用하였다.

K562와 Burkitt lymphoma에서 由來된 Raji 및 사람의 T lymphoblast에서 얻은 MO4를 使用 했으며 이들 세個의 細胞柱는 모두 56°C에서 30분동안 heat inactivate 시킨 fetal bovine serum (以下 FBS라 함, 미국 GIBCO社)이 10% 含有되고 streptomycin과 penicillin이 各各 100mg/ml와 100unit/ml로 含有된 RoswellPark Memorial Institute 1640 培養液 (以下 RPMI 1640이라고 함)으로 5% CO₂와 100% 濕度가 維持된 37°C의 CO₂ incubater에서 培養하였다.

2. 方法

1) 惡性 腫瘍 細胞柱 및 細胞 培養³⁶⁻⁴¹⁾

本 實驗에서는 사람의 白血病에서 由來된

Prescription of SIKBOONWHAN

藥物名	生藥名	學名	重量
黃連	RHIZOMA	Coptis japonica MAKINO.	48.750
厚朴	CORTEX MAGNOLIAE	Magnolia officinalis REHD. et WILS.	30.000
川烏	RADIX ACONITI	Aconitum carmichaeli DEBX	7.500
桔梗	RADIX PLATICODONIS	Platicotton glaucum NAKAI	7.500
白豆蔻	FRUCTUS AMOMI CARDAMOMI	Amonum cardamomum L.	7.500
陳皮	PERICARPIUM CITRI RETICOLATAE	Citrus aurantium L.	7.500
三稜	RHIZOMA SPARGANII	Scirpus maritimus L.	7.500
天門冬	RADIX ASPARAGI	Asparagus iucidus LIDLEY	7.500
人參	RADIX GINSENG	Panax schinseng NESS	7.500
乾薑	PHIZOMA ZINGIBERIS SICCAUOM	Zinggiber officinale ROSCOE	5.625
白茯苓	SCLEROTIUM PORIAE	Polia cocos WALF	5.625
川椒	FRUCTUS ZANTHOXYLI	Xanthoxylum piperitum CANOOLLE	5.625
紫菀	RADIX ASRERIS	Aster tataricus LINNE	5.625
青皮	FRUCTUS CITRI SIN-	Cirtus aurantium var.	1.875
巴豆霜	SEMEN TIGLI	Croton tigilium L.	1.875
			計 157.59

Prescription of BIGIWHAN

藥物名	生藥名	學名	重量
黃連	SHIZOMA COPTIDIS	Coptis japonica MAKINO.	30.000g
厚朴	CORTEX MAGNOLIAE	Magnolia officinalis REHD. et WILS.	15.000g
吳茱萸	FRUCTUS EVODIAE	Evodia rutaecarpa (JUSS) BENTH.	11.250g
黃芩	RADIX SCUTELLARIAE	Scutellaria baikalensis GEORGI.	7.500g
縮砂	AMOMI SEMEN	Amomum Xanthoides Wallich Zingiberaceae.	5.625g
白茯苓	SCLEROTIUM PORIAE	Polia cocos WALF.	3.75g
人參	RADIX GINSENG	Panax schinseng NESS.	3.75g
澤瀉	ALISMATIS RHIZOMA	Alisma oriental Samu.	3.75g
茵陳	ARTEMISIAE IWAYO- MUGIS HERBA	Artemisia iwayomogi kitumura Compositae.	5.625g
乾薑	RHIZOMA ZINGIBERIS SICCATUM	Zingiber officinale ROSCOE.	5.625g
川烏	RADIX ACONITI	Aconitum carmichaeli DEBX.	1.875g
川椒	FRUCTUS ZANTHOXYII	Cinnamomum cassia PRESL.	1.500g
巴豆霜	SEMEN TIGLII	Croton tiglium L.	1.500g
白朮	ATRACYLLS RHIZOMA	Atractylodes japonica Koiz Compositae.	0.750g
			計 99.375g

2) 細胞生存能의 測定

① ³H-thymidine 吸收法⁵⁰⁻⁵⁵⁾

上記와 같은 方法으로 各 細胞柱를 37°C 5% CO₂ 條件下에서 24時間 동안 培養시키고 培養 終了 4時間 前에 well당 1μci ³H - thymidine

(specific activity: 2.0 ci/n mol Newengland Research product, Dupont, Ma)를 加하여 細胞를 glass fiber filter paper (Skatron, Liver Norway)에 吸着시켜 乾燥시킨 後 scintillation tube에 filter disc를 넣어 5ml scintillation cocktail (New Research product, Dupont)에 鎔解시켜 liquid scintillation counter로 放射能을 測定하였다.

② MTT colorimetric assay⁴²⁻⁴⁹⁾

살아있는 세포는 연노랑색의 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 분해시켜 푸른색의 formazon을 형성하는데 이 MTT분해에는 반드시 살아있는 세포의 활성이 있는 mitochondria가 관련하므로 죽은 세포는 아무리新鮮하다 해도 분해능이 없다. 따라서 이 MTT분해 반응은 세포분열 정도나 생존능 측정에 좋은 방법이다.

배양된 세포를 1-10×10⁶ cell/ml가 되도록 농도를調整한 후에 96 well microtiter plate에 100μl씩 채운 후 CO₂ 5% 37°C에서 24시간동안 배양시킨다. 이때 息貢丸의 효과를 보기 위하여 여러 농도의 息貢丸을 添加하여 배양시키고 배양 終了 4시간 前에 phosphate buffered saline에 녹인 5mg/ml의 MTT를 각 well마다 50g씩 加한 後 다시 배양한 다음 反應이 終息되어 각 well에서 生成된 MTT formazan의 검정색의 흐린 結晶이 생기면 이 各各의 well에서 isopropanol/HCl의 發色 試藥을 0.1ml씩 加하고 multichannel pipettor를 利用하여 완전히 섞은 다음 isopropanol이 formazan을 녹여 푸른색 溶液으로 測定하기 爲도록 바꾸어 주므로 發色한 時間 以內에 Dynatech MR 580 ELISA plate reader에서 630 nm 波長을 reference로 하여 570nm에서 O.D.를 測定하였다.

以上の 細胞 生存能의 實驗은 모두 3개 well의 平均値를 利用하여 評價하였다.

③ 單細胞 懸液 및 細胞數 測定⁵⁶⁻⁶⁰⁾

單層 培養細胞를 phosphate buffered saline (PBS)로 洗滌한 後 0.5% trypsin으로 5分間 처리한 後 trypsin에 依한 細胞 損傷을 막기 爲하여 10% fetal bovine serum이 包含된 RPMI 1640 培養液 10ml를 넣어 trypsin 作用

을 中和시키고 가벼운 pipetting으로 物理的인 分離를 하여 單細胞 懸濁液을 만든다. 室溫에서 1,200rpm으로 5分間 3回 遠心 洗滌한 後 上清液을 버린다.

다시 이를 RPMI-FBS에 넣어 pipette으로 充分히 分離시켜 懸濁液을 만든 後에 hemocytometer 위에서 細胞數를 測定하였는데 이때 95% 이상인 單細胞임을 確認하였고 또한 trypan blue 染色法으로 90% 以上の 生存度 確認하였다.

④ 細胞 成長 實驗

(cell growth tevaluation)^{61,62)}

實驗에 使用한 細胞는 指數적 成長期에 있는 細胞를 使用하였다. 即 4×10⁶cell/ml을 一定 時間 아무 處置없이 同一條件에서 자라게 한 後 2時間 間隔으로 200ml씩을 取하여 同量의 5% trypan blue로 잘 섞어 살아 있는 細胞數를 測定하였다.

Ⅲ. 實驗 成績

本 實驗에서 使用된 사람의 癌 細胞柱의 性 格을 살펴보면 Table 1에 表示한 바와 같이 K562와 Raji는 ATCC에서 그 性格 究明이 되어 있어 사람의 白血病에서 由來된 K562는 lymphoblast와 같은 形態로서 triploid이며 이를 pleural effusion에서 culture하여 얻은 것이고 Raji는 사람의 burkitt lymphoma에서 始作된 tumor를 left maxilla에 培養시켜 83%의 viability를 얻은 lymphoblast形態의 癌細胞로 그 DNA는 形態가 一定하지 않고 6 - 10%는 polyploidy를 나타내는 것이었고 MO₄는 사람의 lymphoblast에서 始作된 癌 細胞柱이나 아직 그 特性이 報告되지 않은 것을 使用하였고 이들의 成長 速度와 doubling time은 Fig 1에 나타난 바와 같이 K562가 가장 빨리 자라서

9.5 時間에 그 細胞數가 2 倍로 되었고 MO₄는 세포수가 2배로 增殖되는 doubling time이 14 時間인데 反하여 Raji는 增殖 時間도 가장 더 길뿐 아니라 細胞끼리 aggregation되는 性質이 強하여 單細胞 顯濁液을 얻기도 어려웠고 특히 cell media속에서 細胞數가 稀釋 될 때에는 增殖이 어려워 이 癌 細胞는 成長에 他 細胞의 存在를 특히 認識하는 것을 알 수 있었다.

흔히 癌細胞柱들을 invitro에서 부치시킬 때 반드시 抗癌劑가 아니더라도 다른 溶液의 存在로 成長에 阻害를 받는 경우가 많으므로 本 實驗에서는 이와 같은 artifact를 排除하고자 0.9% 生理的 食鹽水를 實驗에 사용한 抗癌劑의 濃도와 똑같이 하여 부치시키므로, 各各의 control값으로 使用하였다. Fig 2에서 나타난 바와 같이 K562의 경우에는 1, 3, 5, 6, 7, 10 및 15%와 20%의 生理的 食鹽水에서도 그 成長에 阻害를 받지않아 상당히 好鹽性癌細胞柱인 것을 알 수 있었고 MO₄와 Raji는 鹽基性에 약해 濃도가 增加됨에 따라 그 成長이 阻害되어 Raji는 15 - 18%의 成長 阻害를 보였고 MO₄의 경우도 15%까지 成長이 抑制됨을 觀察할 수 있었으나 本 實驗에서 柱로 使用한 1% 溶液內에서는 K562와 Raji 모두 抗癌劑가 아닌 單純한 異物質 即 生理的 食鹽水의 存在에는 전혀 그 細胞의 生存도가 阻害되지 않았음을 確認했고 低濃度の 1% 生理的 食鹽水 存在에도 그 成長에 阻害를 보여 14%까지 成長이 抑制되는 Raji에 대해서는 이후 實驗治에서 이 對照群의 값을 補正하여 使用하였다.

息賁丸은 漢方에서 “在右脇下 覆大如杯 久不愈令人 酒漸寒熱 喘咳 發肺癰”하는 證을 治療하기 위한 目的으로 주로 息賁을 다스리는 處方으로 活用되어 왔는데 이의 抗癌 效果를 보다 分析的으로 알아 보하고자 먼저 高濃度の 息賁丸을 白血病 淋巴腫 및 淋巴芽球 癌細胞柱

에 各各 處置한 後 48時間동안 이들 癌細胞內의 DNA 合成能을 ³H-thymidine法으로 測定하여 Table 2에 表示하였다. 白血病 細胞柱인 K562의 경우 1%에서 86%까지 DNA合成能이 低下되었다가 息賁丸의 濃도가 더욱 增加되면 오히려 癌細胞의 DNA合成能은 減少되어 20%에서는 70%程度 밖에 減少시키지 못했으며 이러한 樣相은 淋巴腫인 Raji의 경우 1%에서 76% DNA合成能을 抑制했다가 20%가 되면 34%로 減少되었고 淋巴芽腫인 MO₄의 경우에는 1% 息賁丸 處置時 48時間만에 90%나 癌細胞의 DNA合成能을 低下시켰지만 이 역시 息賁丸의 濃도를 增加시키면 점점 低下率이 減少되어 20%의 高濃度 處置時는 36%까지로 癌細胞 致死率이 減少되었다. 이와 같은 結果는 Fig 3에 그 樣相을 표시한 바와 같이 1% 以上の 息賁丸 使用은 바람직하지 못함을 보여 주어 過量의 息賁丸 使用에 注意를 要할 것이 示唆되었다.

韓等に 의하면 痞氣丸의 좋은 抗癌效果를 觀察했다 하므로 息賁丸과 痞氣丸을 竝用시켜 그 量을 각각 半半씩 使用했을때 單獨 投與時와 얼마나 다른 效果를 볼 수 있는지를 알아 보기 僞하여 두가지 混合 濃도가 1, 3, 5%가 되도록 痞氣丸과 息賁丸을 處置시킨 후 48 時間 동안의 DNA合成能을 ³H-thymidin uptake法으로 測定하여 그 結果를 Table 3에 表示하고 이를 Fig 4에 圖解하였는데 이는 1%에서 가장 DNA合成을 阻害시키므로 가장 強한 抗癌 效果를 보여주었고 그以上에서는 差異가 없어 普通 使用되는 息賁丸의 量만치 痞氣丸을 竝用해도 抗癌效果는 비슷해서 癌細胞柱에 따라 80 - 90%의 癌細胞 致死效果를 갖지만 이 藥을 3배, 5배 增量시켜도 그 效果에는 變함이 없다가 이를 5배, 10배, 15배, 20배로 增量시키면 오히려 그 抗癌效果가 抑制됨을 보여 이는 常識의으로 容量만 늘인다고 效果가 增大되는 것이 아니고 지나침은 오히려 부족함 만

못하다는 漢方의 中庸說을 뒷받침 한 것이라 볼 수 있다. Fig 5는 Table 3의 癌細胞 生存率을 百分率로 표시한것으로 이는 癌細胞柱가 그 doubling time과 成長率이 달라서 同一 條件에서 實驗을 始作해도 投藥 以前 전부치도 이들 細胞數가 二倍정도 달라지므로 이를 補正하여 단순한 百分率로 이들 여러 癌細胞柱에 대한 抗癌效果를 相對的으로 비교코자 한 것으로 緩慢한 成長率을 보이는 Raji 細胞柱가 Fig 4에서는 그 容量의 增加에 크게 變化되지 않는 것처럼 보였지만 그 自體의 相對的인 細胞 生存率은 抗癌劑의 濃度가 平常의 3倍로 增量될 때 10%, 5倍로 增量되면 20%程度 抗癌效果가 減少되는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 抗癌劑의 容量 增加가 그 效果의 減少를 가져 옴은 매우 有用한 實驗 結果라 思料되어 이번에는 이 竝用 療法의 濃度를 10배까지 增加시켜 1, 3, 5, 10%의 濃度에서 癌細胞의 生存率을 trypan blue excusion assay로 測定해 보았다. 살아있는 細胞는 이 色素를 토해 내므로 染色되지 않은 細胞數를 計算하여 이를 Fig 6에 圖解하고 이들 癌細胞의 生存率을 百分率로 換算한 後 癌細胞 致死率을 求하여 이를 Fig 7에 表示하였다. Fig 6에서 나타난 바와 같이 癌細胞柱들은 1%의 息貢丸과 痞氣丸 竝用療法 (各各0.5%씩 使用했음)에서 癌細胞의 性格에 따라서 5 - 23%만이 生存하다가 이들 抗癌劑의 濃度를 3倍, 5倍, 10倍로 增加시키면 癌細胞 生存率을 오히려 增加되어 淋巴腫인 Raji의 경우 23%에서 10倍 增量시는 癌細胞 生存率은 86%로 3.7배나 增加됨을 보여주었다. 그러나 MO₄와 K562의 경우는 3倍, 5倍에서도 效果가 같거나 多少 나아짐을 보였지만 역시 10倍로 增量시키면 25%로 生存率이 增加되어 過量服用은 좋지 않음을 다른 方法에 의해 測定할때도 一致된 缺課를 보여 주었다. Fig 7은 이와 같은 竝用 療法의 高濃度가 癌細胞 致死率에 미치는 效果를 百

分率로 表示하여 圖解한 것으로서 K562와 MO₄가 1, 3, 5%에서 큰 差異를 보이지 않다가 10%로 增量되면 各各 72%와 75%로 癌細胞 致死率이 減少되어 같은 樣相을 보인 반면 느리게 자라므로 生存數의 變化에는 크게 다르지 않았지만 이들 癌細胞 致死率을 各各 細胞柱에 대한 百分率로 表示해 보면 MO₄와 K562가 비슷한 樣相으로 抗癌劑의 濃度 增量에 대해서 緩慢한 沮害 曲線을 보인 반면 成長速度가 顯著하게 느렸던 Raji의 경우에는 抗癌劑의 濃度 增量에 예민한 反應을 보여서 細胞 致死率에 급격한 減少를 나타내었다.

Fig 8은 低濃度의 息貢丸을 處置했을때 癌細胞柱들의 生存率을 ³H-uptake assay로 測定한 것으로서 이는 觀察된 세가지 서로 다른 癌細胞柱에 대하여 低濃度 息貢丸의 效果가 거의 비슷한 樣相으로 細胞 生存을 沮害시킴을 볼 수 있었다. 이 實驗에서는 成長 速度가 느린 Raji를 전부치후 K562의 2倍로 添加시켜 거의 같은 細胞數로서 始作했으므로 cpm값이 거의 같은 狀態에서 control을 정하여 各各 低濃度의 息貢丸의 效果를 比較했다는 것이 特徵이라 할 수 있다. 아주 낮은 濃度에서는 0.25 - 0.5% 息貢丸은 淋巴腫인 Raji에 더 效果의이라 볼 수 있는 반면 0.75% - 1.0%의 濃度에서는 K562에 약간 더 效果가 있는 것이 觀察되었다.

Table 6은 息貢丸과 痞氣丸의 竝用療法을 低濃度에서 觀察하여 ³H-thymidine uptake 法으로 測定한 것으로서, 이를 百分率로 換算한 후 癌細胞 致死率로서 Fig 9에 圖解 하였다.

淋巴腫인 Raji에서 白血病인 K562에서 보다 多少 더 이 竝用療法이 效果의임일 알 수 있었다. Fig 10은 2.0%의 息貢丸을 여러 癌細胞柱에 하루동안 處置하고 이들 細胞의 生存率을 MTT法으로 吸充度를 測定한 것과 生存 細胞數를 Trypan blue exclusion法으로 各各 測定하여 그 結果 相關性を 相互 比較해 본 것

으로서 상당히 좋은 相關關係가 있음을 알 수 있었다.

低濃度 息貢丸을 長期 處置 할 때와 이 보다 4倍정도 增量한 息貢丸을 短期間에 處置 할 때를 比較하고자 0.25%의 息貢丸을 하루 동안 處置한 癌細胞柱와 1%의 그것을 일주일 處置한 후 그 結果를 Fig 11에 表示하였다. 細胞 生存率의 百分率로 表示한 Fig 11을 보면 그 樣相이 豫想한 바와 같이 1%에서는 급격히 生

存率이 減少되어 하루만에 Raji는 81%, MO₄는 80% 그리고 K562인 경우 89%의 癌細胞가 致死된 것이 DNA의 合成能의 低下를 본 ³H-thymidine uptake法으로 確認하였다. 또한 0.25%의 息貢丸을 일주일간 處置했을 경우 또한 同一한 測定法으로 確認한 것으로서 Fig 11에 나타난 바와 같이 觀察한 세가지 細胞柱에서 모두 97 - 93%의 癌細胞 致死率을 보여 주었다.

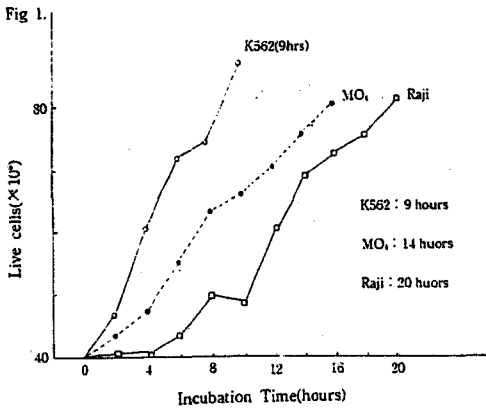


Fig 1. Growth Rate & Doubling Time of Tumor cell Lines.

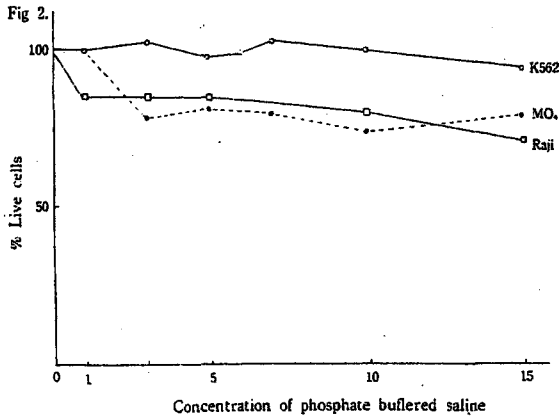


Fig 2. Per cent live cells incubated with phosphate buffered saline

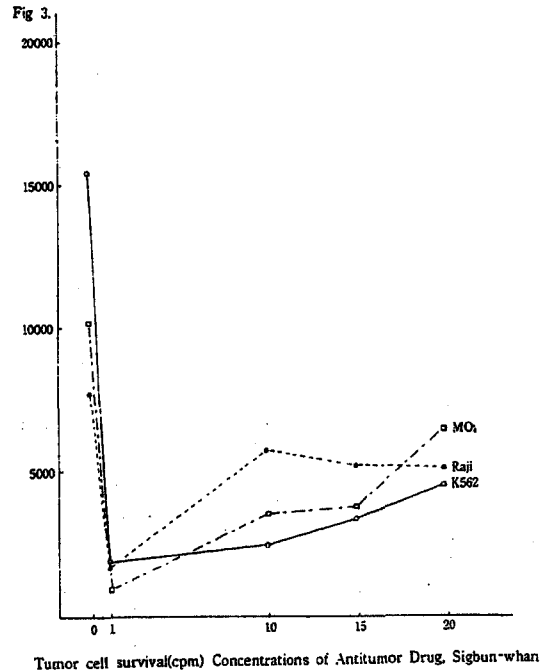


Fig 3. The effect of high concentrations of Sigbun-whan to the cell survival rate of various human tumor cell lines measured by ³H-thymidine uptake for 24hours culture.

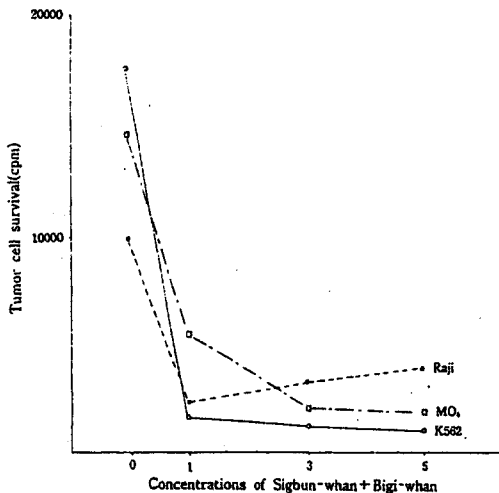


Fig 4. ³H-Thymidine uptake of human tumor cell lines when treated with high concentrations of Sigbun-whan and Bigi-whan for 48hours.

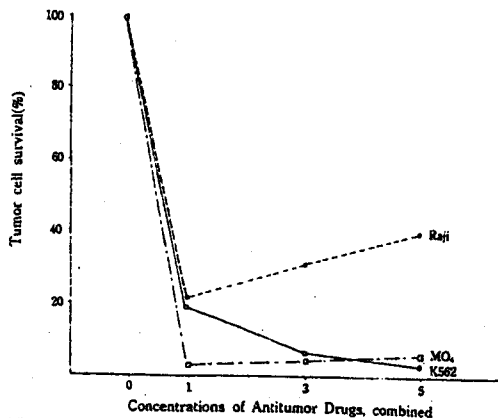


Fig 5. The effect of antitumor drugs combined Sigbun-whan and Bigi-whan calculated by percent human tumor cell survival rate when treated high concentrations of and tumor drugs to various human cell lines for 2days.

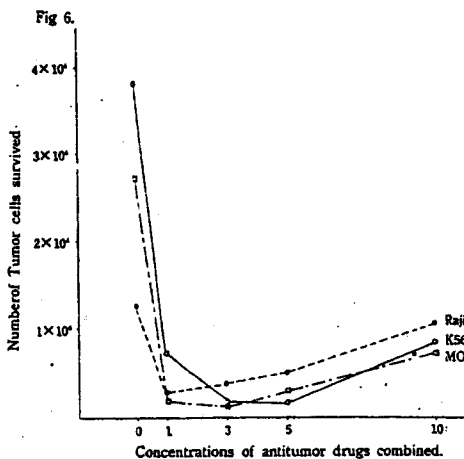


Fig 6. Live cells counted by trypan blue exclusion assay when treated with combined Sigbun-whan and Bigi-whan to various human tumor cell lines for 48hours.

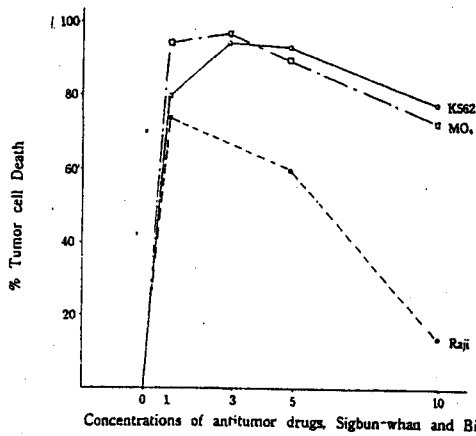


Fig 7. Effect of high concentration combined therapy on the tumor cell death. High concentrations of both Sigbun-whan and Bigi-whan were treated to various human tumor cell lines for 48hours.

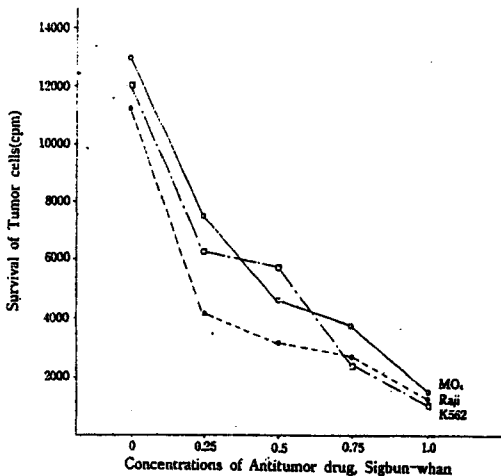


Fig 8. Effect of antitumor drug, Sigbun-whan at low concentrations on the tumor cell survival rate counted by ³H-Thymidine uptake.

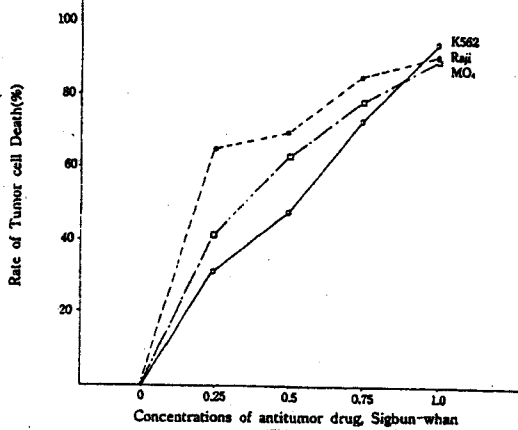


Fig 9. The rate of tumor cell death represented by percent when treated low concentrations of Sigbun-whan for 3days to the various human tumor cell lines.

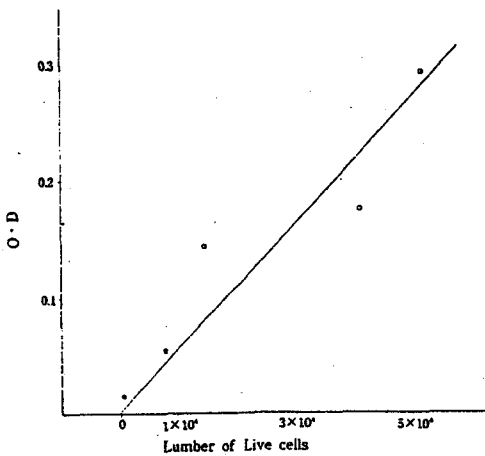


Fig 10. Correlations between number of live cells measured by trypan blue assay and optical density measured by MTT assay when 2.0% Sigbun-whan is treated to the various human tumor cell lines for 24hours.

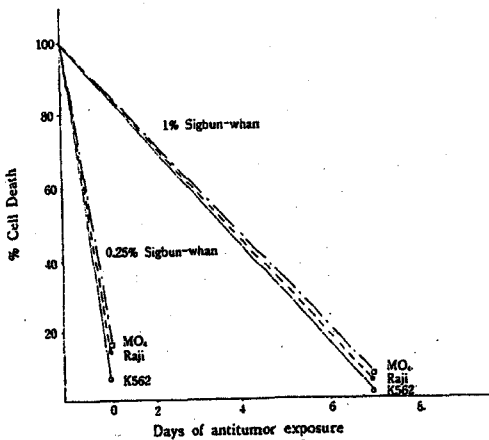


Fig 11. Comparison of the effectiveness of anti tumor drug Sigbun-whan when 0.25% is treated for a week and % for a day to the various human tumor cell lines.

Table 1. Characteristics of Human cancer cell Lines used in this study.

Character Name	Primary tumor	Cultured tumor site	Viability	Morphology	Karyology
K562	human erythroleukemia	pleural effusion	85%	lymphoblast like	triploid
Raji	human Burkitt lymphoma	left maxilla	84%	lymphoblast like	8-10 ⁿ polyploidy and disparity in size
MO ₁	human lymphoblast				

Table 2. ³H-Thymidine uptake of various tumor cell lines when treated with Sigbun-whan for 48hours

Cell Lines	CPM (%)				
	0	1	10	15	20
Raji	7884 (100)	1910 (24)	6776 (86)	5393 (68)	5216 (66)
MO ₁	10261 (100)	1003 (10)	3816 (37)	3838 (37)	6378 (66)
K562	14448 (100)	1920 (14)	2456 (17)	3240 (22)	4528 (31)

Table 3. ³H-Thymidine uptake of various tumor cell lines when treated with antitumor drugs combined Sigbun-whan and Bigi-whan for 48hours

Cell Lines	CPM (%)			
	0	1	3	5
Raji	4880	1050 (22)	1500 (31)	1950 (40)
MO ₁	17881	950 (5)	700 (4)	1050 (6)
K562	14453	2700 (19)	800 (6)	700 (5)

Table 4. Live cells counted by trypan blue exclusion assay when treated with combined Sigbun-whan and Bigi-whan to various human tumor cell lines for 48 hours

Cell Lines	Live Cell (%)				
	0	1	3	5	10
Raji	1.24 × 10 ⁴ (100)	0.28 × 10 ⁴ (23)	0.38 × 10 ⁴ (31)	0.50 × 10 ⁴ (40)	1.06 × 10 ⁴ (86)
MO ₁	2.78 × 10 ⁴ (100)	0.14 × 10 ⁴ (5)	0.11 × 10 ⁴ (4)	0.28 × 10 ⁴ (10)	0.77 × 10 ⁴ (28)
K562	3.86 × 10 ⁴ (100)	0.73 × 10 ⁴ (19)	0.23 × 10 ⁴ (6)	0.19 × 10 ⁴ (5)	0.99 × 10 ⁴ (25)

Table 5. ³H-Thymidine uptake of various tumor cell lines on the treatment of low concentrations of Sigbun-whan for 48hours

Cell Lines	CPM (%)				
	0	0.25	0.5	0.75	1.0
Raji	11753 (100)	4172 (35)	3289 (28)	2686 (23)	2258 (19)
MO ₁	12037 (100)	6407 (53)	5886 (49)	3876 (32)	2408 (20)
K562	12998 (100)	7656 (59)	4624 (36)	2895 (22)	1444 (11)

Table 6. ³H-Thymidine uptake of various human tumor cell lines when treated with low concentrations of combined Sigbun-whan and Bigi-whan for 2days cultured under 37°C and 5% CO₂

Cell Lines	CPM (%)				
	0	0.25	0.5	0.75	1.0
Raji	11753 (100)	4172 (35)	3289 (28)	1750 (15)	1258 (11)
MO ₁	12037 (100)	8381 (69)	6407 (53)	3120 (27)	590 (5)
K562	12998 (100)	7656 (59)	4624 (36)	2895 (22)	1444 (11)

IV. 考 察

積聚는 그 病變이 처음에는 氣의 鬱滯에서 始作하여 濕, 熱, 痰, 血, 食으로 變化하여 成續하는 것으로 歲月이 오래 지나면서 形成된다고 보았으며³⁾ 오늘날의 癌等 腫瘍에 該當된다고 一般적으로 認識하고 있다.³⁾

賈¹⁾ 等은 癌 自體도 이미 體內에서 正氣가 虛하여 氣鬱, 血滯하여 發生한다고 하였으니 西洋醫學의 癌治療 四大療法中^{9, 29)} 放射線療法, 化學療法, 及 免疫療法은 扶正 祛邪를 爲主로 治療하는 韓醫學의 內科的 療法の 範疇에 該當된다^{18, 21)} 고 볼 수 있다. 癌에 對한 韓醫學의 治法은 正氣補養을 爲主로 하고 波積, 活血, 解鬱, 行氣, 補血等의 方法을 活用하며^{1, 18, 19)} 이에 該當하는 處方中의 하나가 息賁丸 및 痞氣丸이다. 息賁丸은 黃連, 厚朴, 川烏, 桔梗, 白豆寇, 陳皮, 三稜, 天門冬, 人蔘, 乾薑, 白茯苓, 川椒, 紫莞, 青皮, 巴豆霜으로 構成되며³⁰⁾ 痞氣丸은 黃連, 厚朴, 吳茱萸, 黃芩, 縮砂, 白茯苓, 人蔘, 澤瀉, 茵陳, 乾薑, 川烏, 川椒, 巴豆霜, 白朮로 構成되어 있다.³⁰⁾ 이들 藥物中 黃連은 清熱解毒하고 燥濕健胃하며^{11, 12)} 厚朴은 祛濕健胃, 行氣消滯하며^{11, 12)} 川烏는 祛風止痛, 勝濕, 祛痰攻毒하며^{11, 12)} 桔梗은 清肺, 祛痰鎮咳, 開發和解하며 白豆寇는 濕中行氣, 化濕和胃, 行氣寬中하며^{11, 12)} 陳皮는 理氣健胃, 燥濕化痰하며^{11, 12)} 三稜은 破血祛痰, 消積行氣하며^{11, 12)} 天門冬은 滋陰潤燥, 清熱化痰하며^{11, 12)} 人蔘은 大補元氣, 建脾養氣하며^{11, 12)} 乾薑은 溫中回陽, 溫肺化痰하며^{11, 12)} 白茯苓은 利水滲濕, 健胃하며^{11, 12)} 川椒는 溫中止痛 祛濕하며^{11, 12)} 紫莞은 益肺下氣, 消痰, 止咳定喘하며^{11, 12)} 青皮는 疎肝破棄, 散積化滯하며^{11, 12)} 巴豆霜은 攻積瀉下하는^{11, 12)} 效能을 가지고 있다. 또한 吳茱萸^{11, 12)} 抗菌作用이 있으며, 縮砂는 行氣調中, 健胃하며^{11, 12)}

黃芩은 清熱燥濕, 抗菌作用이 있으며^{11, 12)} 澤瀉는 利尿 및 脂質代謝 促進作用이 있으며^{11, 12)} 茵陳은 抗微生物 및 抗菌作用이 있으며^{11, 12)} 白朮은 強壯利尿, 抗菌 및 強力한 抗炎作用이 있다고^{11, 12)} 하였으니 이 두 處方은 모두 扶正祛邪하는 處方임을 알 수 있다.

이에 息賁丸 및 痞氣丸을 白血病과 淋巴腫患者에서 抽出한 癌細胞柱를 對相으로 實驗한 바 息賁丸 濃度 1%에서 ³H-thymidine uptake 法으로 測定하였을 때 Raji의 境遇 76%, MO-4는 90%, K562의 境遇 86%의 致死率을 나타내었으나 濃度가 增加함에 따라 致死率이 떨어짐을 알 수 있었다. (Table 2)

또한 息賁丸과 痞氣丸의 竝用 投與時 1%의 濃度에서는 Raji의 경우 78%, MO-4는 95%, K562는 81%의 致死率을 나타내었으나 濃度가 增加함에 따라 致死率이 低下함을 알 수 있었다. (Table 3)

本實驗에서 低濃度에서 가장 뚜렷한 效果가 나타났고 濃度가 增加할 수록 效果가 減少되는 點에 有意한다면 積聚 治療劑의 服用方法에 對한 研究가 더욱 進展되어야 할 것으로 思料된다.

Table 4에서는 息賁丸과 痞氣丸의 竝用 投與時 trypan blue exclusion assay法으로 測定한 結果 濃도 1%에서 Raji는 77%, MO4는 95% K562는 81%의 致死率을 나타내었으나 濃度가 增加할 수록 致死率이 低下함을 나타내었다.

또한 1%미만 低濃度 息賁丸을 ³H-trymidine uptake法으로 測定한 結果低濃度 息賁丸과 痞氣丸 竝用 投與보다 效果가 떨어짐을 알 수 있었다. (Table 5, 6)

Fig 3은 高濃度 息賁丸의 效果를 Fig 4, 5는 高濃度 息賁丸과 痞氣丸의 效果를 Fig 6은 trypan blue exclusion assay法으로 測定된 息賁丸과 痞氣丸의 竝用 效果를 Fig 7은 竝用 效果의 致死率을 optical density로 나타낸

것이다. Fig 8은 ^3H -trymidine uptake法으로測定된 低濃度 息貢丸의 癌細胞生存率 Fig 9는 低濃度 息貢丸의 致死率을 나타내었고 Fig 10은 MTT法과 trypan blue exclusion assay法과의 相關性을 나타낸 것으로 서로 密接한 關係가 있음을 알 수 있었다.

Fig 11은 低濃度 長期處理時 致死率과 高濃度 短期處理時 息貢丸에 對한 癌細胞柱의 致死率을 나타내고 있는데 低濃度 長期 效果가 더 좋은 것을 알 수 있었다.

以上の 結果로 보아 息貢丸과 痞氣丸의 單方보다는 息貢丸合 痞氣丸의 複合方이 더 나은 效果를 나타내었는 바 이는 現在 우리가 쓰고 있는 複合方에 좀더 많은 意味을 附與할 수 있으며 이들 두 處方이 抗癌效果에 대한 可能性은 있으나 보다 分析的이며 正確한 檢討와 또 다른 細胞柱를 利用한 研究가 必要할 것으로 思料된다.

V. 結 論

五積에 使用되는 息貢丸의 抗癌效果를 보기 爲하여 사람의 白血病 細胞柱인 k562와 淋巴腫에서 由來한 Raji 및 淋巴芽球 癌細胞柱 MO₄를 使用하여 여러 濃度の 息貢丸의 效果와 息貢丸 및 痞氣丸의 竝用 處置 效果를 MTT assay와 ^3H -thymidine assay 및 Trypan blue exclusion assay로 各各 測定하여 다음과 같은 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

1. 高濃度の 息貢丸을 여러 癌細胞柱에 48時間 동안 處置한 後 DNA合成能을 ^3H -thymidine uptake法으로 測定한 바 1% 處置時 76 - 90%의 DNA合成能이 低下 되었으나, 息貢丸을 10, 15, 20%로 크게 增量하면 오히려 抗癌 效果는 減少되었다. (Fig 3)
2. 息貢丸과 痞氣丸을 竝用 投與하며 그 阻害效果의 樣相은 비슷하지만 效果는 多少

增加되었다. (Fig 4)

이러한 竝用 療法 역시 高濃度에서는 그 效果가 減少되었고 成長率이 가장 느렸던 Raji를 白分率로 볼 때는 40% 까지 그 癌細胞 致死率이 高濃度에서 增加됨이 觀察되었다. (Fig 5.6)

3. 息貢丸과 痞氣丸 竝用療法時 容量을 10배까지 增強시키면 K562와 MO₄의 境遇는 그 致死率이 緩慢하게 減少하여 10%에서 72%~75%의 癌細胞가 죽었으나 成長이 느려서 細胞數 自體에는 큰 變化를 보이지 않았던 Raji의 境遇 그 致死率이 크게 減少해서 5% 에는 竝用療法에서 60%, 10% 竝用療法에서는 14% 밖에 癌細胞를 죽이지 못했다. (Fig 7)
4. 低濃度の 息貢丸 處置時 K562는 0.75와 1.0%에서 癌細胞 生存이 보다 抑制되었고 Raji는 0.25%와 0.5%에서 더 抑制되었다. (Fig 8)
5. 低濃度の 息貢丸과 痞氣丸 竝用療法時 Raji 細胞柱는 75 ~ 89%의 癌細胞가 致死되었고 MO₄는 31%~95% 그리고 K562는 41 ~ 89%의 癌細胞가 致死됨이 觀察되어 低濃度 竝用療法이 淋巴腫에서 分離된 Raji 細胞柱에 보다 效果的임을 알 수 있었다. (Fig 9)
6. trypan blue exclusion assay로 測定한 生存 癌細胞 數와 MTT assay로 測定한 吸光度를 2% 息貢丸을 24時間 處置한 여러 癌細胞에서 測定하여 比較한 바 이들 두 가지 測定法間에는 상당히 강한 相關關係가 있음이 觀察되었다. (Fig 10)
7. 高濃度 短期 處理와 低濃度 長期 處理의 效果를 比較하기 爲하여 息貢丸을 1.0%로 하루 0.25%로 일주일 處置한 後 ^3H -trymidine uptake로 cpm을 比較한 바 長期 低濃度 投與가 多少 效果的임을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. 賈 坤：癌溜防治研究，서울，成輔社，pp. 175 -180, 1984.
2. 江蘇新醫學院 中醫內科教研組編 中醫內學 江蘇 科學 技術 出版社，香港，p.169.
3. 金秉雲外 8명：肝係內科學，東洋醫學研究院，서울，pp.30-32, 88-95, 407-416, 433-436, 1989.
4. 金定濟，金賢濟：東醫臨床要覽，서울，書苑堂，pp.144, 1977.
5. 南采祐：青囊決，서울癸丑文化史，p.677 1973.
6. 樓全善：醫學綱目，臺南北一出版社，卷 25，pp.31, 1973.
7. 林珮琴：類證治裁，서울，成輔社，p 223 225, 1980.
8. 徐學山：醫學門徑，臺北，新文豐出版公 社，pp 63-64, 293, 1977.
9. 葉銘洪：治癌中藥及處方，臺北，華聯出 版社，pp 1, 1986
10. 巢元方：巢氏諸病原候論，臺中，昭人出 版社，pp 370, 1960.
11. 申佶求：申氏本草學，서울，壽文社，pp 1, 115, 317, 357, 384, 416, 456, 465, 497, 548, 576, 587, 589, 641, 725, 1982.
12. 申民教外：韓藥臨床應用，서울，成輔社 pp132, 171, 229, 230, 235, 243, 247, 252, 256, 325, 345, 412, 525, 530, 1982.
13. 王肯堂：六科準繩，서울，東明社，卷2 pp 145, 1975.
14. 王 燾：外臺秘要，서울，成輔社，pp 319 1975.
15. 汪 昂：醫方集解，臺北，文光圖書有限 公社，pp 343, 344, 345, 1981.
16. 王浴生：中藥藥理與應用，北京，人民衛 生出版社，pp 15, 236, 567, 575, 586, 767, 770, 866, 1155, 1983.
17. 王顯明：中醫內科辨證學，北京，人民衛 生出版社，pp532, 1974.
18. 李 岩：腫留任證備要，北京，人民衛生出 版社，p.11-26, 1983.
19. 張代釗：中西醫結合治療癌症，山西，山 西人民出版社，pp 11-19, 55, 98, 99, 1984.
20. 張子和：儒門事親，臺北，旋風出版社， 卷3 pp 4-6, 1978.
21. 錢伯文：腫留的辨證施治，上海，上海科 學技術出版社，pp.1-10, 48-63, 1980.
22. 周命新：醫門寶鑑，서울，杏林書院，pp 121, 122, 1975.
23. 朱 肅：普濟方，서울，翰成社，pp1992, 1981.
24. 周辰亨：丹溪心法附餘，서울，大星出版 社，pp 632, 1981.
25. 中醫學會：中醫內科學概要，台北 自由出 版社，p293, 1984.
26. 中華民國 商務印書館：中國 醫學大辭典， 서울，金泳出版社，pp 2066, 1975.
27. 陳無擇：三因方，서울，翰成社，pp 287, 1977.
28. 陳存仁：韓方醫學大典，서울，東都文化 社，卷1 pp 124, 274, 卷2 34, 64, 138, 196, 200, 314, 380, 卷 3 48, 52, 228, 264, 卷4 132, 1984.
29. 洪元植：現代中共의 癌治療，서울，英文 社，pp 17, 282, 304, 309, 320, 329, 1980.
30. 許 浚：東醫寶鑑，서울，南山堂，p.496, 489, 490, 1987.
31. 金剛山：伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에 서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果，圓 光大學校 碩士學位論文，1989.
32. 金光湖外：數種漢藥劑가 制癌制 및 Glu- cocorticoid의 抗體 生産 抑制作用에 미 치는 影響，趙永植 博士 華甲紀念論文集， pp.1041-1050, 1981.
33. 文潯典：百消丸 및 加味百消丸이 四鹽化

- 炭素로 인한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響에 關하여, 慶熙韓醫大 論文集, Vol 2 pp 2-8, 1979,
34. 徐政周 : 肥氣丸이 四鹽化炭素로 인한 白鼠 肝損傷에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, Vol 4 pp 203-208, 1981,
35. 任帝訓 : 數種의 漢藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響, 慶熙韓醫大 論文集, Vol. 9, pp.242-266, 1986.
36. Albert D.S., Chen H.S.G. : Tubular summary of pharmacokinetic parameters relevant to in vitro drug assay in S.E Salmon(ed), cloning of human tumor stem cells : pp.355 - 359, New York : Alan R. Liss. Inc. 1980.
37. Berenbaum M.C. : Predicting responses of human cancer to chemotherapy. : Lancet 1141 - 1142, 1974.
38. Carney D.N. Winkler C.F. : In vitro assays of chemotherapeutic sensitivity important advances in oncology. : Lippincott Phil. pp.78-103, 1985.
39. Drewinko B., Patchen M., L.Y. et al. : Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and non proliferating human tumor cells. : Cancer Research 41 : 2328 - 2333, 1981
40. Durkin W.J., Ghanta V.K., Balch C.M. et al. : A methodological approach to the prediction of anticancer drug effect in humans. : Cancer Research 39 : 402-407, 1979.
41. Alley M. C., Scudiero D.A. Monks A. et al. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. : Cancer Research 48 : 589-601, 1988
42. Finlay G.J., Wilson W.R., Baguley B.C. : Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. : Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22 : 655-662, 1986
43. Waserman T.H. and Twentyman P. : Use of a colorimetric microtiter (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. : Int. J. Radiat oncol. biol. Phys., 15 (3) : 699-702, Sep. 1988
44. Maehara Y., Kusumoto T., Kusumoto H., Anai H. and Sugimachi K., : Sodium succinate enhances the colorimetric reaction of the in vitro chemosensitivity test : MTT assay : Oncology, 1988
45. Hansen M.B., Nielsen S.E. and Berg K., : Re-examination and further development of a precise and rapid method for measuring cell growth/cell kill. : J. Immunol. Methods, 119 (2) : 203 - 210, May. 1. 1989.
46. Plumb J.A., Milroy R. and Kaye S. B. : Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium based assay. : Cancer Res. 49(16) : 4435-4440 Aug. 1. 1989
47. Pieters R., Huismans D.R., Leyva A and Veerman A.J. : Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye base (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia. : Cancer Lett., 41 (3) : 323-332, Aug. 30. 1988
48. Horiuchi N., Nakagawa K., Sasaki Y., Minato K., Fujiwara Y., Nezu K., Ohe Y. and Saijo N. : In vitro antitumor act-

- ivity of mitomycin C derivative(RM-49) and new anticancer antibiotic (FK973) against lung cancer cell lines determined by tetrazolium dye (MTT) assay : *Cancer Chemother Pharmacol.* 22 (3) : 246-250, 1988
49. Carmichael J., Degraff W.G., Gazdar A. F., Minna J.D. and Mitchell J.B.: Evaluation of a tetrazolium based semiautomatic Colorimetric assay : assessment of radiosensitivity. : *Cancer Res.*, 47 : 943, 1987
 50. Park J.G., Kramer B.S., Steinberg S.M. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium based colorimetric assay. : *Cancer Res.* 47 : 5875, 1987
 51. Hamburger A.W.: Uses of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. : *J. Natl. Cancer Inst.* 66 : 981-988, 1981
 52. Hanauske A. R., Hanauske U., Von Hoff D.D.: The human tumor cloning assay in cancer research and therapy current problems in cancer 12 : 4, 1985
 53. Heppner G.H., Dexter D.L., DeNucci T. et al. : Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. : *Cancer Research* 83 : 3758-3763, 1978
 54. Mann B.D., Kern D.H., Giuliano A.E. et al. : Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. : *Arch. Surg.* 117 : 33-36, 1982
 55. Mann B.D., Kristian Strom F., Morton D.L. et al.: Predictability of response to chemotherapy by the clonogenic assay. : *Cancer* 52 : 1389-1394, 1983
 56. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. : *J. Immunol. Methods* 65 : 55-63, 1983
 57. Park C.H., Savin M.A., Hoogstraten B. et al. : Improved growth of in vitro colonies in human acute leukemia with feeding culture method. : *Cancer Research* 37 : 4595-4599, 1977
 58. Roper P.R. Drewinko B. : Comparison of in vitro methods to determine drug induced cell lethality. : *Cancer Research* 32 : 2182-2188, 1976
 59. Salmon S.E., Hamburger A.W., Soehnlen B. et al. : Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. : *N. Eng. J. Med.* 298 : 1321-1327, 1978
 60. Twentymen P. R. : Experimental chemotherapy studies : Intercomparison of assays. : *Br. J. Cancer* 41 :
 61. Weisenthal L.M., : In vitro assays in preclinical antineoplastic drug screening : seminars in oncology 4: 362-376 1981
 62. Weisenthal L.M., Lippman M.E. : Clonogenic and non clonogenic in vitro Chemosensitivity assays. : *Cancer Treat Rep.* 6 : 616-631, 1985
 63. Zubod C.G. : Origins and development of chemotherapy research at the National Cancer Institute. : *Cancer Treat Rep.* 68 : 9-19, 1984
 64. Sasaki S.: Antitumor agents from medicinal plants. : *Jpn. Kokai Tokyo koho Jp.* p58, 118, 820, 1983
 65. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell : *Yakuyo Ninjin Sonokenkyu*

- to Shinpo, pp.198-209, 1981
66. Baker P.R., Gillis S. and Smith A.K. : Monoclonal cytotoxic T cell lines. : J. Exp. Med. 149-273, 1979
 67. Cardenas J.M., Marshall P., Henders on B. and Altman A. : Human interleukin 2 : quantitation by a sensitive radioimmunoassay. : J. Immunol. Methods. 89 : 181, 1986
 68. Mosman T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation cytotoxic assay. : J. Immunol. Methods. 65 : 55, 1983
 69. Clutterbuk R.D., Miller J.L. and Alexander P. : Failure of high doses of interferon to affect the growth of human carcinoma, melanoma and myeloid leukemia xenografts. : Br. J. Cancer, 48 : 445-447, 1983
 70. Foon K.A., Sherwin S.A., Abrams P. L., Longo D.L., Fer M.J., Jaffe R. S, and Oldham R.K. : Treatment of advanced non-Hodgkins lymphoma with recombinant leukocyte A interferon. : N. Engl. J. Med 311 : 1148-1152, 1984
 71. Geran R.I., Greenberg N.H., Macdonald M.M., Schumacher A.M. and Abbott B. J. : Protocols for screening chemical agent and natural products against animal tumors and other biological system. : Cancer Chemother Rep. part III. 3 : 1-103, 1987
 72. Gutterman J. U., Blumenschein G.R., Alexanian R., Yap H. Y., Buzdar A. U., Cabanillas F., Hortobagyi G.N., Hersh E.M., Rasmussen S.L., Harmon M., Kramer M. and pestka S. : Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma and malignant lymphom a. : Ann Intern, Med. 93 : 399-406, 1980
 73. Lindahl P., Leary P. and Gresser I. : Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. : Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A. 69 : 721-725, 1972
 74. Quesada J.R., Swanson D.A., Trindade A. and Gutterman J. U. : Renal cell carcinoma : Antitumor effects of leukocyte interferon. : Cancer Res. 43 : 940-947, 1983
 75. Yokota Y., Kishida T., Esaki K. and Kawamata J. : Antitumor effects of interferon on transplated tumors in congenitally athymic nude mice. : Biken J. 19 : 125-127, 1976
 76. Tang, Defang : Hao, Yohung : Miao, Shulin, Wei Hua, Wu, jian : Constituents of the essential oil from rhizome of *Attactylodes macrocephala* produced in pingjiang (China) and their antitumor effects Yaoxue Tongbao, 19(9), pp.555-558, 1984.

Abstract

Antitumor Effects of Sigbunhwan and Bigihwan on Tumor Cells derived from Leukemia and Lymphoma Patients

By Dae-Geun Kang
DEPT. of oriental Medicine
Graduate School
Won Kwang University
Directed by prof.
Kang, Byung Ki

Attempts were made to see the antitumor effects of Sigbunhwan widely used in Oh-jug(五積) employing tumor cells Lines such as K562 derived from erythroleukemia, Raji from lymphoma and MO-4 from blastogenic tumor.

Different concentrations of Sigbunhwan and combined therapy of Sigbunhwan and Bigihwan were treated to those tumor cells lines and then live cells were counted by Trypan blue assay and ^3H -Thymidine uptake assay.

The results obtained were as follows.

1. ^3H -Thymidine uptake of various tumor cells lines when treated with high concentrations of Sigbunhwan for 48hours showed that the rate of DNA synthesis decreased 76% to 90% by the treatment of 1% Sigbunhwan but this inhibition was rather decreased when Sigbunhwan concentration was increased to 10, 15 and 20%.(Fig 3)
2. When Sigbunhwan was combined with Bigihwan which was also an antitumor drug, the effectiveness of tumor cells death was somewhat increased showing

a generally similar pattern to that of Bigihwan alone used.(Fig 4) This combination therapy also showed that higher concentrations of antitumor agent were no more effective or rather harmful according to the tumor cells lines having different growth rate.(Fig 5,6)

3. The antitumor effects of combined Sigbunhwan and Bigihwan was dicresed if the concentrations of this combination therapy was increased to 10 times showing relatively sluggish decrease in K562 and MO-4 but a sharp inhibitory effect in Raji which grows slowly.(Fig 7)
4. When Sigbunhwan was treated at low concentrations, K562 was more inhibited by 0.75% to 1.0% of Sigbunhwan while Raji was more inhibited by 0.25% to 0.5% of that.(Fig 8)
5. When Sigbunhwan was treated together with Bigihwan at low concentrations, the tumor cells death rate was 75% to 89% in Baji, 31% to 95% in MO-4 and 41 to 89% in K562, showing this combination therapy was more effect to Raji derived from lymphoma.(Fig 9)
6. The number of live tumor cells was correlated with optical density of MTT assay when measured with 2% Sigbunhwan treatment to tumor cells lines for 24 hours.(Fig 10)
7. 7 days treatment of 0.25% Sigbunhwan was compared with one day treatment of 1% suggesting long term treatment more effective.(Fig 11)