

# 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

韓 相 日      姜 秉 淇

## I. 緒 論

痞氣丸은 李東垣이 立方하였으며<sup>14)</sup> “在于胃脘 大如盤 久不愈 令人四肢不收 惡發黃疸 飲食不爲肌膚”라하여 脾積을 다스리는 處方으로 알려져 왔다<sup>18)</sup>.

積聚는 腹部에 있는 어떤 腫塊의 形狀으로 感知된다는 점에 비추어 보아 大部分이 內科的인 腫瘍의 範疇에 包含되는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 腹部에서 觸知되는 癌도 이 範疇에 屬하는 것으로 認定되고 있으며 그 原因도 多樣하게 알려져 있다<sup>1, 4, 6, 17)</sup>

抗癌效果에 對한 實驗的 報告로는 金<sup>19)</sup> 등이 人蔘, 鹿茸으로 制癌劑 및 Glucocorticoid의 抗體生産抑制作用의 實驗에서 抗體生産抑制을 緩和시킨 結果를 나타낸다하였고, 文<sup>20)</sup> 등은 蓬朮等 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를 보였다하였으며, Tang<sup>23)</sup> 등은 白朮이, Sasaki<sup>24)</sup>는 甘草가 Odajima<sup>25)</sup>는 人蔘이 各各 相當한 抗癌效果가 있다고 하였으며, 任<sup>22)</sup>은 魚腥草, 鹿血, 猪苓, 穿山甲等이 正常免疫細胞에 對하여 毒作用이 없을 뿐 아니라 強力한 抗癌效果를 나타낸다고 報告하였다.

近來에 韓醫學에서 試圖하고 있는 癌治療는 主로 扶正祛邪를 爲主로 하는 內科的 療法을 擇하고 있으며<sup>11-13, 15)</sup>, 이는 西洋醫學의 癌治療 四大療法<sup>11)</sup> 中 化學療法 및 免疫療法과 비슷한 方法으로 볼 수 있다.

白血病과 淋巴腫은 癌腫의 一種으로 白血病은 韓醫學의 血證 熱癆 癥瘕 積聚 虛損 勞瘵의

範疇에 屬하는 造血係의 惡性 疾病이며<sup>11-13)</sup> 淋巴腫은 淋巴系統의 惡性腫類의 總稱으로서 淋巴腫大 壓迫症狀 脾腫大 貧血 全身 症狀를 主證으로 하는 惡性 腫瘤로 近來에 發生 頻度가 增加하는 傾向이며<sup>15)</sup> 이에 對한 研究가 必要하다고 생각된다.

金<sup>21)</sup>의 報告에서 伏梁丸이 肝癌 뿐만 아니라 白血病에 對한 抗癌作用도 있다는 점에 비추어 보아 痞氣丸에서도 血液癌에 效果가 있으리라 생각되어 著者는 積聚에 應用되고 있는 痞氣丸의 臨床的 效能을 實驗을 通하여 究明하고자 白血病과 Lymphoma 患者에서 抽出한 癌細胞 生存率에 미치는 抗癌效果를 觀察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

痞氣丸의 構成 藥物과 用量은 東醫寶鑑<sup>18)</sup>에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 附屬韓方病院에서 購入 後 精選하여 使用하였다.

#### 2) 檢液의 調製

痞氣丸 1000g을 round flask에 蒸溜水 2000 ml와 함께 넣은 다음 冷却器를 附着시키고 120分間 加熱하여 各各 1000ml의 抽出液을 얻

Prescription of BIGIHWAN

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 baicalensis 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 ROSC.	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	ATRACTYLLS RHIZOMA	Atractylodes japonica Koiz Compositae.	0.750g
			計 99.375g

었다. 이 抽出液을 4°C 5000 rpm으로 20 分間  
遠心分離하여 粒子를 除去한 後에 각각 300ml  
가 되게 減壓濃縮하여 본 實驗에 使用하였다.

## 2. 方 法

### 1) 惡性 腫瘍 細胞柱 및 細胞 培養<sup>26-31)</sup>

本 實驗에서는 사람의 白血病에서 由來된  
K562와 Burkitt lymphoma에서 由來된 Raji 및

사람의 T lymphoblast에서 얻은 MO<sub>4</sub>를 使用했  
으며 이들 3個의 細胞柱는 모두 56°C에서 30  
分동안 熱로 不活性化 시킨 fetal bovine  
serum(이하 FBS라함, 美國 GIBCO社)이 10% 함  
유되고 streptomycin과 penicillin이 各各  
100mg/ml와 100u/ml로 함유된 Roswell Park  
Memorial Institute 1640 배양액 (이하 RPMI  
1640이라고 함)으로 5% CO<sub>2</sub>와 100% 습도가 유  
지된 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다.

## 2) 細胞 生存能의 測定

### ① <sup>3</sup>H-thymidine 吸收法<sup>40-45)</sup>

上記와 같은 方法으로 各 細胞柱를 37°C 5% CO<sub>2</sub> 條件下에서 24시간 동안 培養시키고 培養 終了 4시간 前에 well 당 1 $\mu$ ci <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity : 2.0 ci/n mol New 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 溶解시켜 liquid scintillation counter로 放射能을 測定하였다.

### ② MTT colorimetric assay<sup>32-39)</sup>

살아있는 細胞는 연노랑색의 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 分解시켜 푸른색의 formazan을 形成하는데 이 MTT分解에는 반드시 살아있는 細胞의 活性이 있는 mitochondria가 關與하므로 죽은 細胞는 아무리 新鮮하다 해도 分解能이 없다. 따라서 이 MTT分解 反應은 細胞分裂 程度나 生存能 測定에 좋은 方法이다.

培養된 細胞柱들을 1~10x10<sup>6</sup> cell/ml가 되도록 濃度를 調整한 後 96 well microtiter plate에 100 $\mu$ l씩 채운 후 CO<sub>2</sub> 5% 37°C에서 24시간동안 培養시킨다. 이때 痞氣丸의 效果를 보기 위하여 여러 濃度の 痞氣丸을 添加하여 培養시키고 培養 終了 4時間 前에 Phosphate buffered saline에 녹인 5mg/ml의 MTT를 각 well마다 50 $\mu$ l씩 加한후 다시 培養한 다음 反應이 終熄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 용액으로 측정하기 좋게 바꾸어 주므로 發色한 1時間 以內에 Dynatech MR 580 ELISA platereader에서 630 nm 波長을 reference로 하여 570nm에서 O.D.를 測定하였다.

### ③ 單細胞 懸탁액 및 細胞數 測定<sup>46-50)</sup>

培養細胞를 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.5% trypsin으로 5분간 처리한 뒤 trypsin에 의한 細胞 損傷을 막기 위하여 10% fetal bovine Serum이 包含된 RPMI 1640 培養液 10ml를 넣어 trypsin 作用을 증화시키고 가벼운 pipetting으로 物理的인 分離를 하여 單細胞 懸탁액을 만든다. 실온에서 1200 rpm으로 5 分間 3회 원심 세척한 後 上清液을 버린다. 다시 이를 RPMIFBS에 넣어 pipette으로 充分히 分離시켜 懸탁액을 만든 後에 hemocytometer위에서 細胞數를 測定하였는데 이 때 95 % 이상이 單細胞임을 확인하였고, 또한 trypan blue 染色法으로 90% 이상의 生存率을 확인하였다.

### ④ 細胞 成長 實驗 ( cell growth evaluation)<sup>51,52)</sup>

實驗에 使用한 細胞는 指數적 成長期에 있는 細胞를 使用 하였다. 즉, 4x10<sup>6</sup> cells/ml을 일정시간 아무 처치없이 同一條件에서 자라게 한 후 2시간 간격으로 200 $\mu$ l 씩을 取하여 同量의 5%trypan blue로 잘 섞어 살아 있는 細胞數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.

### Ⅲ. 實驗成績

本實驗에서 사용된 사람의 癌細胞柱 K562, Raji, MO<sub>4</sub>의 成長 速度와 doubling time은 fig. 1에 나타난 바와 같이 K562가 가장 빨리 자라서 9.5시간에 그 細胞數가 2배로 되었고 MO<sub>4</sub>는 細胞數가 2 배로 增殖되는 doubling time이 14 時間인데 반하여 Raji는 增殖 時間도 가장 더딜 뿐 아니라 細胞끼리 aggregation되는 性質이 強하여 單細胞 顯濁液을 얻기도 어려웠고 특히 cell media 속에서 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 特히 認識하는 것을 알 수 있었다.

흔히 癌細胞柱들을 invirto에서 靜置시킬 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 實驗錯誤를 排除하고자 0.9% 生理的 食鹽水를 實驗에 使用한 抗癌劑의 濃도와 똑같이 하여 靜置 시키므로써 各 各의 control값으로 使用하였다.

Fig 2에서 나타난 바와 같이 K-562의 경우에는 1, 3, 5, 7, 10 및 15%와 20%의 生理的 食鹽水에서도 그 成長에 阻害를 받지 않아 상당히 好鹽性 癌細胞柱인것을 알 수 있었고 MO<sub>4</sub>의 Raji는 鹽基性에 비해 濃도가 增加됨에 따라 그 成長이 阻害되어 Raji는 15~18%의 成長 阻害를 보였고 MO<sub>4</sub>의 경우도 15%까지 成長이 抑制됨을 觀察할 수 있었으나 本實驗에서 주로 使用한 1% 溶液內에서는 K562와 Raji 모두 抗癌劑가 아닌 단순한 異物質 즉, 生理的 食鹽水의 存在에는 전혀 그 細胞의 生存道가 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 保正하여 使用하였다.

Fig. 3은 高濃度の 痞氣丸 處置時 癌細胞들

의 成長 阻害 정도를 MTT法으로 呑呑度를 測定한 것으로 그 結果들은 10%까지의 濃度에서는 그 成長이 현저히 阻害되어 MO<sub>4</sub>의 경우 95% 正道의 癌細胞가 致死되고 Raji와 K-562는 80% 正道의 癌細胞가 致死 되었음을 觀察하였다.

흔히 쓰이는 5% 濃度 까지를 보다 더 正確하게 <sup>3</sup>H-thymidine uptake법으로 DNA 합성 정도를 직접 觀察하므로써 癌細胞 成長率에 미치는 痞氣丸의 濃度を 觀察하여 Table II와 Fig 4에 表示하였다. 同量의 癌細胞를 (4x10<sup>6</sup> cells/ml) 同一한 條件에서 아무 처치없이 자라도록 2日동안 前靜置 시킨후 이에 1-5%濃度の 痞氣丸을 添加시켜 다시 24時間 동안 靜置시키고 이들 癌細胞의 DNA 合成能을 調査하여 比較한 바 1% 痞氣丸 處置時 이미 癌細胞의 DNA 合成能을 잃어 거의 阻害되어 MO<sub>4</sub>의 경우 96%癌細胞가 그 DNA 合成能을 잃어 거의 致死 되었음을 觀察하였고 K562 역시 70%정도가 致死 되었으며 Raji의 경우는 62%의 致死率을 나타내었다.

또한 MO<sub>4</sub>와 Raji가 3% 까지 그 濃度を 높여도 同一한 致死率을 보인다면 K562는 3%에서는 96% 까지 致死되어 癌細胞의 性格에 따라 1-3 배 정도의 서로 다른 痞氣丸 濃도에 따라 癌細胞 致死率도 4-42% 달라짐을 알 수 있었다.

또한 本實驗 結果만을 고려해 보면, 白血病에서 Burkitt lymphoma보다 效果가 있음을 알 수 있었다. 그러나 Burkitt lymphoma에서 유래된 Raji의 成長率이 leukemia에서 유래된 k562 보다 顯著하게 느리게 成長하여 그 doubling time도 거의2배나 느리므로 이를 직접 比較하기 어렵다는 점을 감안하여 이들 각기 다른 癌細胞柱들에 대한 抗癌劑 痞氣丸의 相對的 效果를 觀察코자 0-10%까지의 痞氣丸 濃度を 增加 시키면서 그때 觀察되는 抗癌效果를 직접 細胞類를 hemocytometer에서 count

하여 이를 percent survival rate로 換算하여 Table 111과 Fig. 5에 表示하였다. 비록 細胞柱의 性格에 따라 成長率 및 致死率은 다르지만 이를 各 細胞柱 別로 相對的인 致死率을 比較해 보면 LD50의 效果는 K562가 MO<sub>4</sub> Raji의 중간값을 보였고 觀察된 3종류의 細胞柱에서 모두 1% 미만의 低濃度에서 Raji는 65%, K-562는 67% 그리고 MO<sub>4</sub>는 95%의 致死率을 나타 냈으며 K-562는 다소 높은 濃度에서 致死率이 커서 5% 瘡氣丸에서 95%의 致死率을 보여 瘡氣丸은 白血病의 경우 보통보다 높은 濃度의 投與가 보다 效果의 일 것임을 시사하였다.

低濃度の 瘡氣丸이 觀察된 모든 癌細胞柱에서 效果의 임을 알았으므로 이번에는 그 濃度を 0.25, 0.5, 0.75, 1% 등으로 4배까지 다시 稀釋시켜 癌細胞들의 <sup>3</sup>H-thymidine uptake의 정도로 比較 觀察한 바 Fig. 6에 알 수 있는 바와 같이 K-562인 경우 0.75%까지는 瘡氣丸의 濃度가 增加됨에 따라 抗癌 效果도 거의 直線的으로 增加해서 癌細胞 生存率을 低下시킴을 觀察할 수 있었는데 9.75%에서 DNA 合成

能을 2.200cpm으로 아무것도 處置 않은 對照群의 11.800cpm의 18%로서 82%까지 癌細胞를 致死 시켰음을 나타내고 있으며 1% 瘡氣丸 處置 時에는 87%까지 致死시켰음을 알 수 있었다. 한편 Raji는 0.5%에서는 55%, 1%에서는 91%의 癌細胞를 致死 시켰고, MO<sub>4</sub>의 경우에는 0.25%, 瘡氣丸 處置로 40%, 0.75%에서는 80%의 癌細胞를 致死 시키다가 1%에 오히려 cpm이 다소 높아 지는 것이 觀察되었으나 이후의 다른 實驗에서는 1%에서 더욱 致死率이 增加 되었음을 알 수 있었다.

dye exclusion analysis를 通하여 測定한 細胞 生存率을 相對的인 %로 比較해 봤을 때 (Fig. 7) K-562인 경우 0.25%에서 47%의 癌細胞가 致死되었고 0.5%에서 75%, 0.75%에서는 70%, 그리고 1%에서 95%의 白血病 癌細胞柱가 致死됨이 觀察 되었다. 반면 瘡氣丸에 대해서 比較的 效果가 덜 한 것으로 觀察 되었던 Burkitt lymphoma 細胞柱인 Raji에서도 0.25%의 瘡氣丸 處置시 46%, 0.5%때 43%, 0.75% 處置時는 55% 및 1.0% 瘡氣丸 處置時 72%의 癌細胞가 죽는 것을 알 수 있었다.

Table I. Characteristic of Human cancer cell Lines used in this study.

Characterics Name	Primary tumor	Cultured tumor site	Viability	Mophology	Karyology
K 562	Human erythroleukemia	pleural effusion	85%	lymphoblast like	triploid
Raji	Human Burkitt lymphoma	left maxilla	84%	lymphoblast like	6-10% polyploidy and disparity in size
MO <sub>4</sub>	Human lymphoblast				

Table II. The effect of Bigi-whan on the tumor cell survival rate

Cell lines	Concent ration Count	cpm (%)			
		0 %	1 %	5%	10 %
Raji	cpm	4803	1763	1798	3803
	%	(100)	(36)	(37)	(79)
MO <sub>1</sub>	cpm	17881	782	684	2564
	%	(100)	(4)	(4)	(15)
K 562	cpm	14453	4710	869	510
	%	(100)	(32)	(6)	(4)

Table III. The numbers of live tumor cells when treated with low concentrations of Bigi-hwan

Concentra- tion Tumor Cells	Live tumor cells (%)				
	Control	0.25 %	0.5 %	0.75 %	1.0 %
Raji	1.64 10 <sup>6</sup> (100 %)	1.05 10 <sup>6</sup> (64 %)	1.13 10 <sup>6</sup> (69 %)	0.75 10 <sup>6</sup> (46 %)	0.48 10 <sup>6</sup> (29 %)
MO <sub>1</sub>	1.57 10 <sup>6</sup> (100 %)	1.01 10 <sup>6</sup> (96 %)	0.73 10 <sup>6</sup> (46 %)	0.59 10 <sup>6</sup> (38 %)	0.1 10 <sup>6</sup> (6 %)
K 562	1.81 10 <sup>6</sup> (100 %)	0.95 10 <sup>6</sup> (52 %)	0.63 10 <sup>6</sup> (35 %)	0.57 10 <sup>6</sup> (31 %)	0.1 10 <sup>6</sup> (5 %)

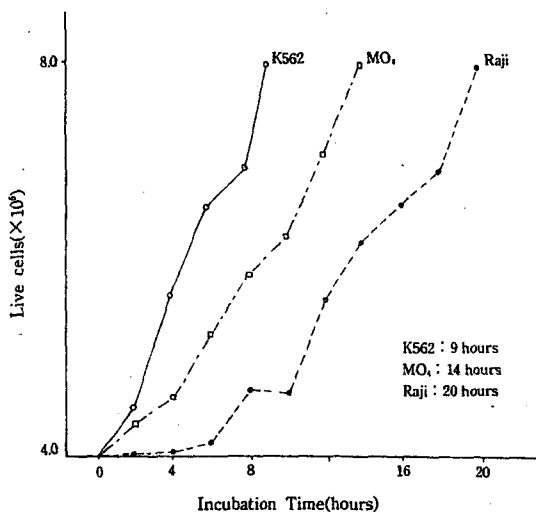


Fig. 1. Growth Rate and Doubling Time of Tumor cell Lines.

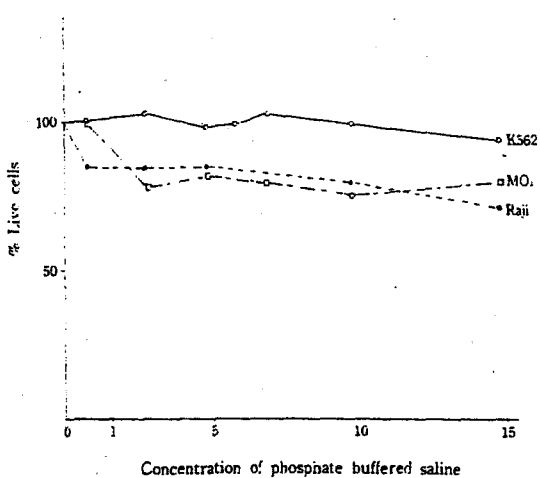


Fig. 2. Percent live cells incubated with phosphate buffered saline

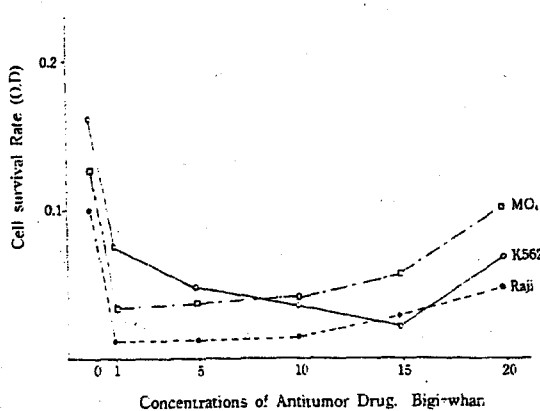


Fig. 3. Tumor cell survival rate under the high concentrations of antitumor drug, Bigi-hwan

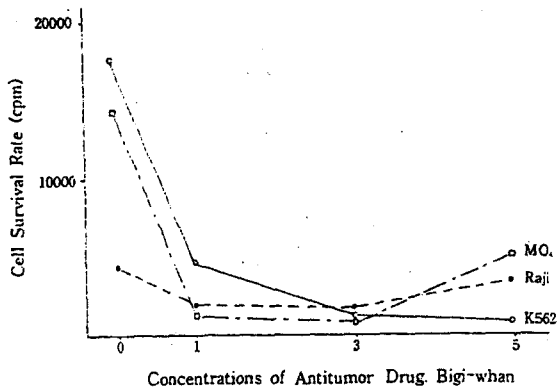


Fig. 4. Tumor cell survival rate on the treated of moderate concentrations of antitumor drug, Bigi-hwan measured by <sup>3</sup>H-thymidine uptake assay

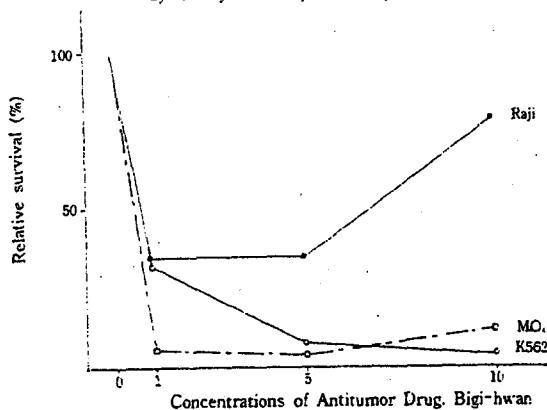


Fig. 5. Relative survival rate of various human tumor cell lines when treated with 1, 5, 10% of antitumor drug, Bigi-hwan.

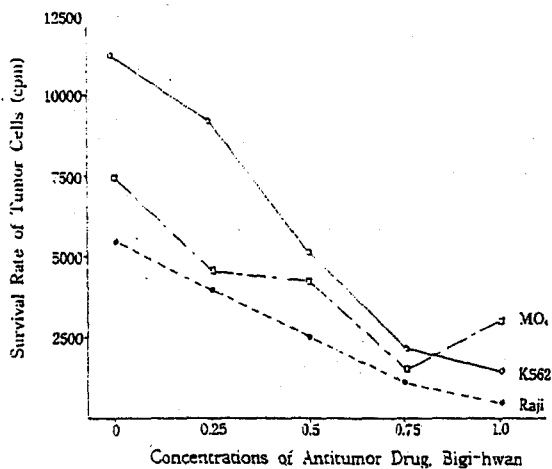


Fig. 6. The effect of low concentration of antitumor drug Bigi-hwan on the tumor cell survival rate counted by <sup>3</sup>H-thymidine uptake

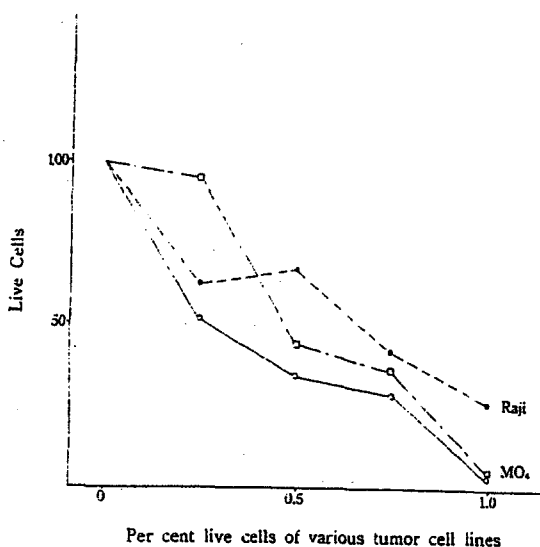


Fig. 7. Per cent live cells of various tumor cell lines when treated with 0-1.0% of Bigi-hwan

#### IV. 考 察

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 이루어져 있는데<sup>2, 3, 8, 16, 18</sup>) 黃連은 清熱燥濕, 瀉下解毒<sup>9, 10</sup>) 殺菌作用<sup>5</sup>)이 있으며 厚朴은 化濕溫中<sup>9, 10</sup>) 消痰抗菌<sup>10</sup>)作用이 있고 吳茱萸는 抗菌作用<sup>5, 10</sup>)이 있으며 黃芩은 清熱燥濕<sup>5, 9, 10</sup>) 抗菌<sup>9, 10</sup>)作用이 있고, 縮砂는 行氣調中<sup>10</sup>) 建胃作用이 있으며, 白茯苓은 利水<sup>5, 9, 10</sup>) 人蔘은 新陳代謝를 促進<sup>5, 10</sup>)시키고 強心利尿<sup>10</sup>)하며, 澤瀉는 利尿<sup>5, 10</sup>)하고, 脂質代謝를 促進<sup>10</sup>)시키며, 茵陳은 抗微生物<sup>10</sup>) 抗菌作用<sup>5</sup>)이 있고 利尿, 實驗의 感染에 對한 治療效果<sup>5, 10</sup>)가 있음이 밝혀졌으며, 乾薑은 抗菌作用<sup>10</sup>)이 있고, 新陳代謝의 機能沈滯를 改善하며<sup>5</sup>), 川烏는 散寒止痛하고<sup>9, 10</sup>) 殺蟲抑菌作用이 있어서 陰疽腫毒을 다스리며<sup>10</sup>) 新陳代謝 技能의 劣勢를 補強한다<sup>5</sup>) 하였고 川椒 殺蟲 止痛<sup>5, 10</sup>)作用이 있으며, 巴豆霜은 瀉下祛積<sup>9, 10</sup>) 消腫蝕瘡<sup>9</sup>)하여서 痞結癥瘕를 治療할 수 있다<sup>10</sup>) 하

였고, 白朮은 強壯利尿, 抗菌<sup>5, 10</sup>)作用이 있으며 強力한 抗炎症作用<sup>5</sup>)이 있다고 하였으므로 痞氣丸은 殺菌, 利尿, 強壯作用이 있어서 扶正祛邪하는 方劑임을 알 수 있었다.

이러한 작용이 있는 痞氣丸을 白血病과 淋巴瘤患者에서 抽出한 各各의 癌細胞柱를 對象으로 實驗한 바 抗癌劑의 濃度가 지나치게 높아지면 오히려 그 抗癌效果가 떨어져서 癌細胞 致死率이 減少되었는데 이때 그 高濃度 抗癌劑의 抗癌減少 效果는 本 實驗에서 관찰한 바로는 MO4, K526, Raji의 순이었고 그 阻害 정도도 크게 달라서 흡광도로 測定한 結果는 Raji의 경우 거의 75%까지 致死率이 떨어짐이 觀察되었다. (Fig. 3) 물론 MTT assay의 흡광도 測定이 高濃度에서 Lineweaver Burk의 Law를 벗어나므로 직접 살아있는 細胞수를 재는 다른 方法과 일치하지 않는다는 한계점이 있기는 하지만 이와 같이 高濃度의 抗癌劑가 癌細胞致死率을 크게 떨어 뜨린다는 점이 흥미 있는 觀察이었다. 다행히 20%라는 高濃度의 漢方 投與는 實際적으로는 거의 없는 일이므로 크게 염려할 것은 없지만 그래도 말기의 癌患者에서 患者 自身이 醫師의 指示를 무시하고 간혹 이 藥 劑 藥 등 여러 處方을 竝行해서 使用하는 경우 再考해 봐야할 문제이며 이와 같은 高濃度 抗癌劑의 抗癌減少 效果는 細胞柱에 따라 크게 달라서 이는 癌의 종류와 患者 個人差에 따라 그 減少 및 抑制 效果도 크게 달라 질 것이 예상되었다. 그러나 보통 10~20%의 高濃度 投與는 거의 없을 것이라 思料된다.

Table II와 Fig. 4는 매우 有意性 있는 觀察로서 患者 個人差와 또 같은 患者라고 해도 그들이 갖고 있는 여러 다른 癌 種類에 따라서 같은 漢方 處方 이라도 그 量이 1~3 배 정도 달라져야 함을 시사한 것으로서 本方에 따른 日服적인 用量의 處方은 한번 再考해 봐야 할 것이다.



Table III와 fig. 5에서 特히 關心이 큰 部分은 Burkitt lymphoma에서 유래된 Raji 癌細胞에서는 痞氣丸 濃度를 5%에서 10%로 培로 增加 시키면 相對的인 癌細胞 致死率은 65%에서 20% 까지 減少하여 물론 이 한가지 細胞柱의 比較로 斷言할 수는 없지만 Burkitt lymphoma의 경우 痞氣丸은 1%로 부터 5%까지 5배 가량 그 用量을 倍加 시켜도 癌細胞 生存을 阻害하지 못할 뿐 아니라 이를 10%로 10배 増量시키면 오히려 그 抗癌效果가 3배 以上 減少하여 痞氣丸의 高濃度 使用에 주의를 要할 것을 시사하였다.

Fig. 6은 低濃度의 痞氣丸 投與時 여러 癌細胞柱들의 致死率을 DNA 합성능으로 比較해 본 것으로서 천천히 자라는 癌細胞柱 Raji의 致死效果가 抗癌劑 痞氣丸의 濃度가 增加함에 따라 완만하게 커진데 반해 빨리 자라는 K562는 그 致死率이 크게 阻害해서 이는 이미 예상한 바와 같이 癌의 性格에 따라 빨리 増殖되는 癌에서 痞氣丸의 抗癌效果가 완만하게 자라는 癌보다 더 큰 것을 알 수 있었다.

Fig. 7은 低濃度의 痞氣丸 處置時 相對的인 癌細胞 致死率을 hemocytometer로 測定한 生存細胞數로서 직접 比較한 것으로서 이미 기술한 바와 같이 서로 다른 癌細胞柱들이 각각 doubling time과 cell growth rate이 相異하므로 직접 比較하기에는 해석의 어려움이 있어 相對的인 細胞 生存率을 比較하였다. k-562에서 痞氣丸의 抗癌效果가 가장 確實한 것은 DNA 합성능을 觀察한  $^3\text{H}$ -trymidine uptake 法이나 細胞代謝率로 測定한 MTTColorimetric assay 및 tryphan blue dye exclusion assay를 使用하여 hemocytometer 위에서 살아있는 細胞數를 직접 Count할 때를 本實驗에서 使用한 3가지 測定法에서 모두 일치했을 뿐 아니라 痞氣丸의 抗癌效果가 0.25, 0.5, 0.75, 1.0% 등 低濃度에서는 물론 1, 3, 5, 10, 15%까지의 高濃度에서도 가장 確實하여 痞氣丸은 白

血病 細胞柱에 좋은 抗癌效果를 갖는다는 것을 알았다.

以上の 結果로 보면 積聚 治療劑인 本 痞氣丸은 服用 方法이 服用 첫날 2丸에서 시작하여 하루 1丸씩 늘려 나가며 大便이 묽게 되고 腹部 腫塊가 半 정도로 줄어들면 治療를 중단하게 되어있다. 本實驗에서는 低濃度에서 가장 效果가 뚜렷한 結果가 나타났고 濃度가 增加할 수록 效果가 減少되는 점에 유의한다면 積聚 治療劑의 服用 方法에 對한 研究가 더욱 進行되어야 할 것으로 생각된다. 또한 痞氣丸의 癌細胞 致死效果는 매우 顯著하여서 白血病이나 淋巴腫癌類에서 活用할 수 있는 可能性이 있으나 보다 分析的으로 正確한 效果는 더 많은 다른 細胞柱를 使用하여 多角的인 檢討가 뒤따라야 할 것으로 思料된다.

## v. 結 論

漢方에서는 抗癌制로 널리 쓰이는 痞氣丸을 0.25-20%까지의 여러 濃度로 사람의 癌細胞인 白血病에서 抽出한 K562, 임파종癌인 Burkitt lymphoma에서 抽出한 Raji 및 임파아구유래癌인 MO<sub>4</sub> 등 여러 血液癌에 處置한 後 3가지 다른 細胞 生存率檢査法인  $^3\text{H}$ -thymidine uptake assay, MTT colorimetric assay 및 trypan blue exclusion analysis로 比較 觀察한 바 有意性 있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

1. 10% 이상의 高濃度 痞氣丸 處置時 觀察된 3 種類의 癌細胞柱에서 모두 癌細胞 生存에 대한 阻害 效果를 보였고, 그 정도는 MO<sub>4</sub> < K562 < Raji 順序로 增加했다
2. 1-5%의 濃度로 痞氣丸을 각각 白血病 및 淋巴腫 등에 처치 했을 때 癌細胞柱에 따라 4-30%의 細胞 生存率을 보여서 痞氣丸의 抗癌作用은 개체와 癌의 性格 및 種類에 따라 70-96%까지의 서로 다른 致死

- 효과를 갖는다는 것을 알 수 있다(Fig. 4)
3. 成長率이 서로 달라서 초기 cpm이 달랐던 이들 癌細胞柱들의 細胞 生存率을 상대적인 값으로 換算해 볼 때 1% 痞氣丸에서 Raji와 K562는 65% 정도의 抗癌效果를 나타냈으며 5%로 痞氣丸을 增加時 Raji와 K562는 93%까지의 癌細胞를 致死시켰으나 Raji는 변동이 없었다. 한편 상대적인 細胞 成長率을 볼 때 가장 效果가 컸었던 Raji의 경우 1% 痞氣丸 處置로 95%까지 癌細胞를 致死시킬 수 있었다.(Fig. 5).
  4. 淋巴腫의 하나인 Burkitt lymphoma에서 抽出한 Raji의 경우 痞氣丸 濃度가 1%에서 10%까지로 10배 增加됨에 따라 2.3배까지 癌細胞 生存率이 增加되므로 痞氣丸은 Burkitt lymphoma 로 確認된 癌患者에게 投與 時는 그 容量을 低濃度로 유지시키고 과량 투여를 삼가하는 것이 좋을 수 있었다(Fig 5)
  5. 痞氣丸의 抗癌效果는 관찰된 癌細胞柱에서 K562>M0<sub>4</sub>>Raji 순서였고 이때 가장 效果가 낮았던 Raji의 경우 1%處置로서 68%의 癌細胞가 致死된 반면 M0<sub>4</sub>와 K562는 95%까지의 致死率을 보였다
  6. 관찰된 모든 濃度에서 痞氣丸 白血病에서 유래된 K562에 가장 效果가 있음이 3가지 각각 다른 測定法에서 모두 일치 하였다.

### 參 考 文 獻

1. 江蘇新醫學院 中醫內科教研組編 中醫內科學, 江蘇科學技術出版社, 香港, p.169.
2. 南采祐 : 靑囊決, 서울癸丑文化史, p.677, 1973.
3. 樓全善 : 醫學綱目, 臺南北一出版社, 卷25 pp.28-29, 1973.
4. 金秉雲 外 : 肝係內科學, 東洋醫學研究出版部, 서울, pp.88-89, 1989.
5. 木村康一 外 : 日本藥用植物圖鑑 大阪 保育社, p3, 42, 44, 48, 50, 114,117,151, 192, 227, 229, 231, 271, 1983.
6. 上海中醫學院 : 中醫內科學, 常務印書館 香港分館, 香港, p.90
7. 서울대학교 의과대학(편) : 腫瘍學, 서울 서울대학교出版部, p74, 1986
8. 徐學山 : 醫學門徑, 臺北, 新文豐出版社, p.66, 1977.
9. 新文豐出版公社 : 中藥大辭典, 大北, 新文豐出版社, pp.30, 270, 346, 566, 871, 1096,1210,1288,1463, 1593, 1602, 2092, 2107, 2524, 1982.
10. 辛民教 : 臨澤本草學, 서울, 南山堂, p166 172, 250, 252, 259,260, 271, 308, 310, 393, 489, 520, 602, 1986.
11. 郁仁存 : 中醫腫留學, 北京, 科學出版社, p.120, 176, 177, 306, 1983.
12. 李 岩 : 腫留任證摘要, 北京, 人民衛生出版社, p.1, 197, 201, 202, 1979.
13. 李 岩 : 腫留病, 北京, 人民衛生出版社, p.3, pp.29, 30, 95, 98, 1982.
14. 江 昂 : 國譯의方集骸, 大星文化社, 서울, p354, 1984.
15. 錢伯文 : 腫留的辨證施治, 上海, 上海科學技術出版社, pp.1-4, p.28, 127, 1980.
16. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, p122 1975.
17. 中醫學會 : 中醫內科學概要, 臺北 自由出版社, p293, 1984.
18. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.490 1987.
19. 金光湖 外 : 數種 漢藥劑가 制癌制 및 Glucocorticoid의 抗體 生産 抑制作用에 미치는 影響, 趙永植 博士 華甲紀念 論文集, pp.1041-1050, 1981.
20. Chang Kiu Moon : Byeong Gon Lee, Soo Whan Lee and Tak Lim Kang : Effect of

- antitumor polysaccharides from Albizza julibrissin on Immune function, Arch. Pharmacolx Res., 8(4), pp.277-282, 1985
21. 金剛山 : 伏梁丸이 白血病과 肝癌患者에서 抽出한 癌細胞에 미치는 抗癌效果, 圓光大學校 碩士學位論文, 1989.
  22. 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.
  23. Tang, Defang : Hao, Yohung : Miao, S hulin, 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.
  24. Sasaki S.: Antitumor agents from medical plants. *Jpn. Kokai Tokyo koho Jp.* p58, 118, 820, 1983
  25. Odajima Yoshio : Effects of on cancer cell. *Yakuyo Ninjin Sono Kenkyu to Shinpo*, pp.198-209, 1981
  26. Albert D.S., Chen H.S.G. : Tubular summary of pharmacokinetic parameters relavant 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.
  27. Beren baum M.C.: Predicting responses of hman cancer to chemotherapy. : *Lancet* 1141 - 1142, 1974.
  28. Carney D.N. Winkler C.F. : In vitro assays of chemotherapeutic sensitivity important advaces in oncology. : *Lippincott Phil.* pp.78-103, 1985.
  29. 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
  30. 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.
  31. 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
  32. 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
  33. Waserman T.H. and Twentyman P.: Use of a colorimetric microtiter (MTT) as say in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. : *Int. J. Radiat oncol. biol. Phys.*, 15 (3) : 699-702, Sep. 1988
  34. Maehara Y., Kusumoto T., Kusumoto H., Anai H. and Sugimachi K., : Scdium succinate enhances the colorimetric reaction of the in vitro chemosensitivity test : MTT assay : *Oncology*, 1988
  35. 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.
  36. 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 absorp-tion chemosensitivity determined by a novel tetrazoliumbased assay. : *Cancer Res.* 49(16) : 4435-4440 Aug. 1. 1989
37. 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
  38. Horiuchi N., Nakagawa K., Sasaki Y., Minato K., Fujiwara Y., Nezu K., Ohe Y. and Saijo N. : In vitro antitumor activity 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
  39. 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
  40. 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
  41. Hamburger A.W. : Uses of in vitro tests in predictive cancer chemotherapy. : *J. Natl. Cancer Inst.* 66 : 981-988, 1981
  42. 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
  43. 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
  44. 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
  45. 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
  46. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. : *J. Immunol. Methods* 65 : 55-63, 1983
  47. 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
  48. Roper P.R. Drewinko B. : Comparison of in vitro methods to determine drug induced cell lethality. : *Cancer Research* 32 : 2182-2188, 1976
  49. 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
  50. Twentymen P. R. : Experimental chemotherapy studies : Intercomparison of assays. : *Br. J. Cancer* 41 :
  51. Weisenthal L.M., : In vitro assays in preclinical antineoplastic drug screening : seminars in oncology 4: 362-376 1981

52. Weisenthal L.M., Lippman M.E. : Clonogenic and non clonogenic in vitro Chemosensitivity assays. : Cancer treat Rep. 6 : 616-631, 1985
53. Zubod C.G. : Origins and development of chemotherapy research at the National Cancer Institute. : Cancer treat Rep. 68 : 9-19, 1984
54. Sasaki S. : Antitumor agents from medical plants. : Jpn. Kokai Tokyo koho Jp. p58, 118, 820, 1983
55. Odajima Yoshio : Effects of Ginseng on cancer cell : Yakuyo Ninjin Sonokenkyu to Shinpo, pp.198-209, 1981
56. Baker P.R., Gillis S. and Smith A.K. : Monoclonal cytotoxic T cell lines. : J. Exp. Med. 149-273, 1979
57. 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
58. Mosman T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation cytotoxic assay. : J. Immunol. Methods. 65 : 55, 1983
59. 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
60. 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
61. 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
62. 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 lymphoma. : Ann Intern, Med. 93 : 399-406, 1980
63. 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
64. 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
65. 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

## Abstract

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

By Han, Sang-II

Dpt. of Oriental Medicine Graduate School.  
Won Kwang University

Directed by Kang, Byung Ki

Bigihwan which has been widely used in Oh-jug in oriental Medicine was investigated on its antitumor effect employing blood cancer cell lines.

K 562 derived from human erythroleukemia, Raji from lymphoma and MO<sub>4</sub> from blastogenic cancer were used in this study to see the analytical evaluation of Bigihwan's antitumor effect using three different kinds of methods such as <sup>3</sup>H-thymidine up take assay. MTT assay and live cell counts by Trypan blue assay.

The result obtained are as follows.

1. When higher than 10% Bigihwan was treated. inhibitory effect of tumor killing action was observed showing the increasing order of MO<sub>4</sub>, K 562 and Raji(Fig. 3).
2. When 1 to 5% of Bigi-hwan was treated, 4 to 30% of tumor cell survival was observed according to various blood tumor cell lines suggesting that antitumor effect of Bigi-hwan was different as the characteristics of tumor cells showing 70 to 95% cell killing effect(Fig. 4).

3. Compared the survivals of cells by relative scales though the initial cpm was variable because of different cell growth rate. Raji was most effective being killed 95% by the treatment of 1% Bigihwan while Raji and K562 showed 93% by 5% Bigihwan (Fig. 5)
4. The survival rate of Raji derived from Burkitt lymphoma was rather increased to 2.3 times when Bigihwan concentration was increased from 1 to 10% implying of refraining from over use of this anticancer drug, specially to lymphoma patients (Fig. 5).
5. Bigihwan was most effective to K562 and then MO<sub>1</sub> showing 95% tumor cell death by using 1% of this anticancer drug while it was least effective to Raji showing only 68% of tumor cell death (Fig. 7).
6. Judging from the all the analytical methods used in this study, through all different three tumor cell lines. Bigihwan was most effective to K562 derived from human erythroleukemia.