

염주괴불주머니 (*Corydalis heterocarpa*) 추출물의 암세포 성장 억제 효과

김유아 · 이정임 · 공창숙¹ · 예성수² · 서영완*

한국해양대학교 해양환경 · 생명과학부, ¹부경대학교 해양바이오세스연구단, ²인제대학교 의과대학 생화학교실

Antiproliferative Effect of Extracts from *Corydalis heterocarpa* on Human Cancer Cells

You Ah Kim, Jung Im Lee, Chang-Suk Kong¹, Sung Su Yea², and Youngwan Seo*

Division of Marine Environment & Bioscience, Korea Maritime University, Busan 606-791, Korea,

¹Marine Bioprocess Research Center, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea,

²Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University Busan 614-735, Korea.

Abstract Whole plants of *Corydalis heterocarpa* were extracted twice with CH₂Cl₂ and MeOH in turn. The combined crude extracts were concentrated in *vacuo* and then partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. The organic layer was fractionated with *n*-hexane and 85% aq. MeOH, and the aqueous fraction was also further fractionated with *n*-BuOH and H₂O, successively. Growth inhibition effects of crude extracts and their solvent fractions were evaluated in AGS, HT1080, U-937, MCF-7 and HT-29 human cancer cells using MTT assay. The inhibitory effects of solvent fractions were increased in a dose-dependent manner. Among these tested samples, 85% aq. MeOH fraction showed the most potent inhibitory effect on the growth of human cancer cells. These results suggest that active compounds having much stronger anticancer effect can be isolated from *Corydalis heterocarpa*.

Keywords: *Corydalis heterocarpa*, anticancer, human cancer cells

서 론

2005년 미국 내 주요 사망 원인 통계에서 1위가 전체 사망률의 26.6%를 차지하는 심장질환이었으며, 뒤이어 암이 22.8%의 사망률을 보일 정도로 큰 비중을 차지하고 있었다. 또한 2008년에 미국 암학회 (American Cancer Society)에서 조사한 바에 따르면 2008년 미국 내에서만 약 144만명의 새로운 암환자가 발생되었으며, 암에 인한 사망자 수가 약 57만에 이르렀다고 한다(1). 우리나라 역시 음식의 서구화에 따라 매년 암 발병률이 증가하고 있으며 고령화 혹은 이동 성인병 등에 따른 각종 암의 위험에 노출되어 있는 것으로 보인다(2). 최근 들어 이러한 이유에서 암이나 심혈관계 질환을 치료하고 예방하려는 연구가 활발

히 진행되고 있으며, 그 일환으로 치료에 따른 부작용을 줄일 수 있는 천연물 유래의 신규 생리활성물질 개발에 대한 연구가 관심이 되고 있다(3-5). 특히, 해양생물자원의 중요성에 대한 인식이 높아짐에 따라 해양생물을 이용한 새로운 생리활성물질의 개발에 관심이 증가되고 있으며(6), 그 중에서도 해수와 민물이 섞이는 독특한 환경에 서식하며 이에 적합한 적응기작을 발전시킨 염생식물 또한 새로운 신물질 자원으로서 주목받고 있다(7-10).

염생식물의 일종인 염주괴불주머니 (*Corydalis heterocarpa*)는 한국의 곳곳에서 자생하는 노란 꽃이 피는 두해살이 식물로서(11), 조간대에서 매우 중요한 생태적 위치를 차지하고 있으나 지금까지 염주괴불주머니로부터 이차 대사산물의 분리나 유용한 생약학적 특성이 보고된 적이 없다. 그러나 염주괴불주머니는 오랫동안 산모의 진통이나 경련의 치료제로 사용되었으며 같은 속의 다른 식물에서는 다양한 이차 대사산물이 보고된 바 있다(12-14). 따라서 본 연구에서는 염주괴불주머니를 이용하여 생리활성물질에 의한

*Corresponding author

Tel: +82-51-410-4328, Fax: +82-51-404-3538

e-mail: ywseo@hhu.ac.kr

발암물질의 생성방지 및 생체방어물질로서의 유용성, 또한 항암 생리활성물질 탐색을 위한 기초 연구로서 염주괴 불주머니의 추출물 및 용매 분획물을 이용하여 AGS 인체 위암세포, HT1080 인체 섬유육종 세포, U-937 인체 구성 림프종 세포, MCF-7 인체 유방암세포 및 HT-29 인체 결장암세포에 대한 인체암세포 증식억제효과를 검토하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 염주괴불주머니 (*Corydalis heterocarpa*)는 2003년 7월 전라남도 무안군 현경면 해안가에서 직접 채집하였다. 채집한 시료는 응달에서 자연 건조한 후 추출하기 전까지 -25℃에서 냉동 보관하였다.

사용시약

세포 배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)은 Sigma에서 구입하였고, RPMI 1640, Fetal bovine serum (FBS), 0.05% Trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/ml Penicillin-Streptomycin과 phosphate buffered saline (PBS)는 GIBCO사 (USA)로부터 구입하였다. 암세포의 세포 독성 실험에 사용한 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 시약은 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 그 외에 연구에 사용된 용매 및 시약은 모두 특급을 사용하였다.

추출물 및 분획물 제조

염주괴불주머니 (*C. heterocarpa*)는 건조 보관하였다가 추출 직전 분쇄하여 methylene chloride 용매에 충분히 잠기게 한 후 24시간 동안 방치하였으며 이를 여과하는 과정을 2회 반복하여 추출 하고, 다시 남은 잔사에 MeOH 용매를 넣고 동일과정으로 반복 추출하여 모두 41.1 g의 조추출물을 얻었다. 얻어진 모든 조추출물을 합한 후에 용매의 극성에 따라 순차적으로 분획하여 진공증발기 (EYELA, N-N series)로 농축하고 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획을 각각 7.3 g, 12.0 g, 4.3 g, 20.0 g 얻었다. 각 추출물 및 분획물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 희석하여 실험에 사용하였다.

암세포배양

본 실험에 사용한 암세포주인 AGS 인체 위암세포 (AGS human gastric cancer cell), HT-29 인체 결장암세포 (HT-29 human colon cancer cell), HT1080 인체 섬유육종 세포 (HT1080 human fibrosarcoma cell), U-937 인체 구성 림프

종 세포 (U-937 human histocytic lymphoma cell), MCF-7 인체 유방암세포 (MCF-7 human breast cancer cell)는 세포주 은행 (서울의대)으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS, U-937, HT-29 세포의 경우 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 Fetal Bovine Serum (FBS)가 함유된 RPMI 1640을 사용하였고, HT1080과 MCF-7 세포는 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 DMEM 배양액을 사용하였으며, cell culture dish를 이용하여 37℃, 5% CO₂ incubator (Forma Scientific, Japan)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2-3회 refeeding하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% Trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 10 ml씩 일정 수 분할하여 주입하고 계속 6-7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

MTT assay

MTT assay는 생존 암세포의 미토콘드리아 내의 dehydrogenase의 효소작용에 의해 황색의 수용성 물질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)가 환원되어 dark blue formazan crystal을 생성하는 원리를 이용한 실험법으로, formazan crystal이 침전되는 정도를 흡광도로 측정함으로써 항암제에 의해 암세포가 사멸 또는 증식 억제되는 정도를 결정할 수 있다(15). 배양된 암세포는 well당 1×10^5 cells/ml가 되도록 96-well plate에 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후, 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 90 μ l와 일정 농도의 시료 10 μ l를 첨가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 대조군에는 시료 대신 phosphate buffered saline (PBS) 10 μ l를 첨가하였다. 24시간 배양 후 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 10 μ l를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다(16). 이때 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 억제율 (%)을 구하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석 (ANOVA)을 행한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였으며, 그 결과는 평균 (Mean) \pm 표준편차 (Standard deviation, SD)로 표시하였다. 모든 통계 분석은 Statistic Analysis System (v8.2 SAS Institute Inc., NC, USA) 통계프로그램

을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

염주괴불주머니 조추출물의 인체 암세포 성장 억제효과

염생식물인 염주괴불주머니의 항암 생리활성 물질을 탐색하기 위한 기초 연구로서 염주괴불주머니의 조추출물을 이용하여 AGS 인체 위암세포, HT1080 인체 섬유육종 세포, U-937 인체 구성 림프종 세포, MCF-7 인체 유방암세포 및 HT-29 인체 결장암세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 상기 암세포에 염주괴불주머니의 용매추출물을 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 처리한 결과(Fig. 1), 시료 처리 농도의 증가에 따라 농도 의존적으로 암세포의 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. AGS 인체 위암세포의 경우, methanol과 methylene chloride 추출물을 10 µg/ml의 농도로 처리 했을 때에는 암세포 증식 억제효과가 각각 11.5%, 16.4%로 약한 활성을 나타냈지만, 50 µg/ml로 처리했을 때에는 각각 10.0%, 87.8%를 나타내었고, 100 µg/ml 농도의 시료 처리시 각각 88.2%와 94.2%로 급격히 활성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. AGS의 증식 억제효과를 관찰하였을 때와 같이 HT1080 인체 섬유육종 세포의 증식 억제 실험에서도 높은 억제 효과를 확인할 수 있었다. 특히, 10 µg/ml의 낮은 농도에서도 각각의 추출물이 44.1%, 45.5%의 효과를 보였으며, 50 µg/ml과 100 µg/ml의 상대적으로 높은 농도에서는 차례로 72.7%, 91.1% 그리고 76.9%, 91.5%의 높은 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 또한,

각각의 추출물을 U-937 인체 구성 림프종 세포에 처리한 경우에서도 50 µg/ml의 농도에서 각각 42.0%, 79.5%의 억제효과를 나타내었으며, 100 µg/ml의 농도에서도 각각 52.4%와 78.9%로 우수한 활성을 확인할 수 있었다. 동일 조건하에서 MCF-7 인체 유방암세포와 HT-29 인체 결장암세포에 methanol과 methylene chloride 추출물 시료를 처리한 결과, 100 µg/ml의 고농도에서 대조군에 비해 각각 47.8%, 43.2%와 19.7%, 39.6%로 활성을 나타냈으나, AGS, HT1080 및 U-937의 결과에는 미치지 못하였다. 전반적으로 염주괴불주머니의 methanol과 methylene chloride 추출물을 처리한 결과, 모든 세포에서 methylene chloride 용매 추출물이 높은 활성을 나타내어 추출물 내에 존재하는 여러 화학 성분들 중에 비교적 극성이 덜한 물질들이 암세포의 증식 억제에 영향을 미치는 것으로 예상되었다.

염주괴불주머니 분획물의 인체 암세포 성장 억제효과

염주괴불주머니의 암세포 증식 억제효과를 나타내는 물질의 특성을 확인하기 위하여 methanol 및 methylene chloride 용매 추출물을 혼합하여 극성도에 따라 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane 순서로 용매 분획하여 그 분획물을 얻었으며, 각각의 분획물을 이용하여 인체 암세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

AGS 인체 위암세포에 염주괴불주머니 분획물을 농도별 (10, 50 및 100 µg/ml)로 첨가하여 암세포 증식 억제 정도를 확인한 결과(Fig. 2), 85% aq. MeOH 층은 대조군에 비해 각각 20.1%, 30.6%, 93.4%의 강력한 암세포 증식 억제효과를 나타내었으며, *n*-hexane 층은 각각 9.6%, 44.8%

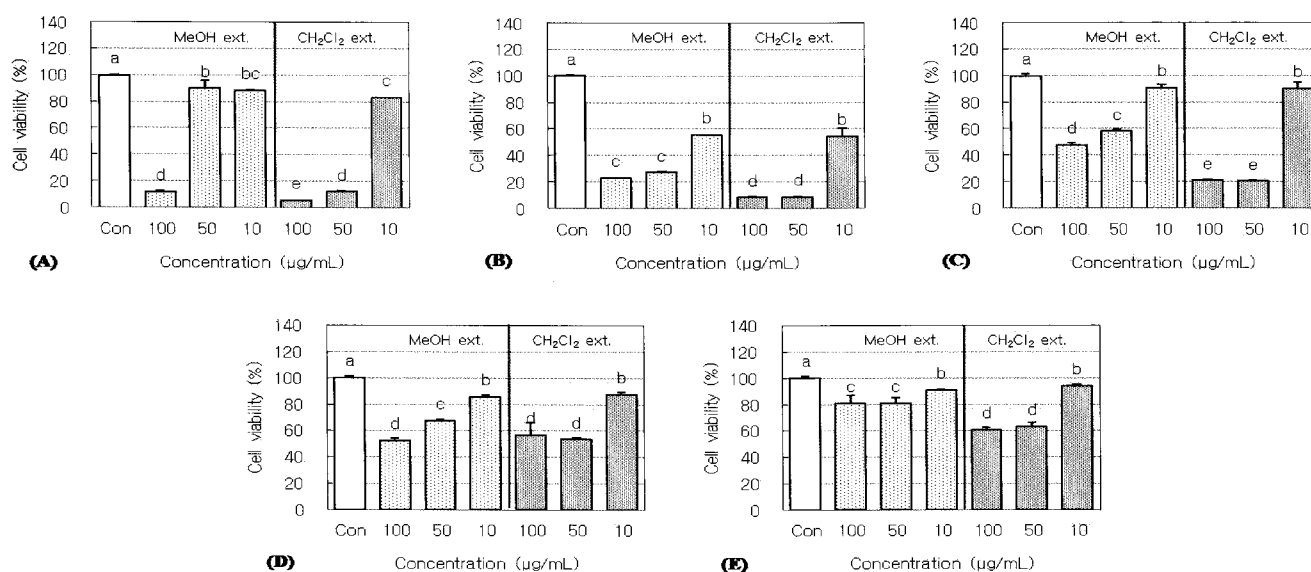


Fig. 1. Inhibitory effects of crude extracts from *Corydalis heterocarpa* on the growth of human cancer cell lines (A) AGS, (B) HT1080, (C) U-937, (D) MCF-7 and (E) HT-29.

^{a-e} Means with the different letters are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

및 49.4%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. *n*-BuOH 층과 H₂O 층의 경우, 모든 처리 농도에서 50% 이하의 낮은 억제율을 보여 다른 분획물에 비해 암세포 증식 억제에는 크게 영향을 미치지 않았다.

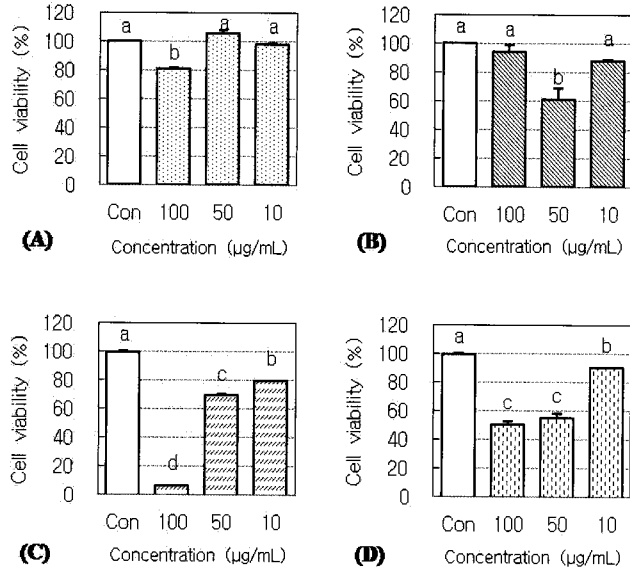


Fig. 2. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Corydalis heterocarpa* on the growth of AGS human gastric cancer cells.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

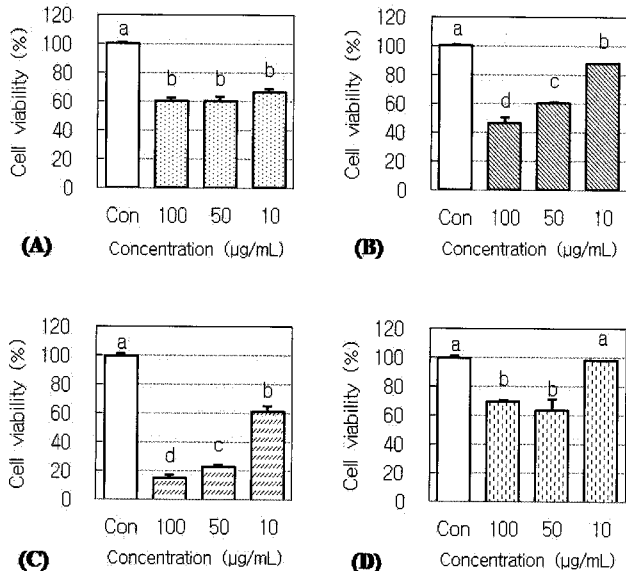


Fig. 3. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Corydalis heterocarpa* on the growth of HT1080 human fibrosarcoma cells.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

추출물에서와 유사하게 분획물의 암세포 증식 억제효과는 HT1080 인체 섬유육종 세포에서도 높은 효과를 나타냈다(Fig. 3). 특히, 85% aq. MeOH 층은 10, 50 및 100 µg/ml의 시료 처리 농도에서 농도의존적으로 우수한 암세포 증식 억제효과를 보였으며, 그 억제율은 각각 39.0%, 77.3% 그리고 85.0%였다. 또 한 가지 주목할 사항은 HT1080 인체 섬유육종 세포에서는 동일 농도의 *n*-BuOH 층에서도 12.2%, 39.4%, 53.2%의 억제율을 보여 methanol 추출물에서 HT1080에 효과를 보이던 성분 물질이 *n*-BuOH 층으로도 이동함을 확인할 수 있었다. *n*-Hexane과 H₂O 층의 경우에는 100 µg/ml의 고농도에서 약 30% 정도의 억제율을 보였다.

동일 조건하에서 각각의 염주괴불주머니 분획물을 10, 50 및 100 µg/ml의 농도로 U-937 인체 구성 림프종 세포에 처리하고 세포독성을 확인한 결과(Fig. 4), 다른 인체 암세포와 같이 85% aq. MeOH 층에서 가장 높은 암세포 증식 억제효과를 가짐을 확인할 수 있었다. 억제율은 농도의존적으로 각각 6.1%, 61.1% 그리고 71.5%였으며, 다른 분획층에서는 100 µg/ml의 처리 농도에서 최고 20-30%의 억제 효과를 나타냈다.

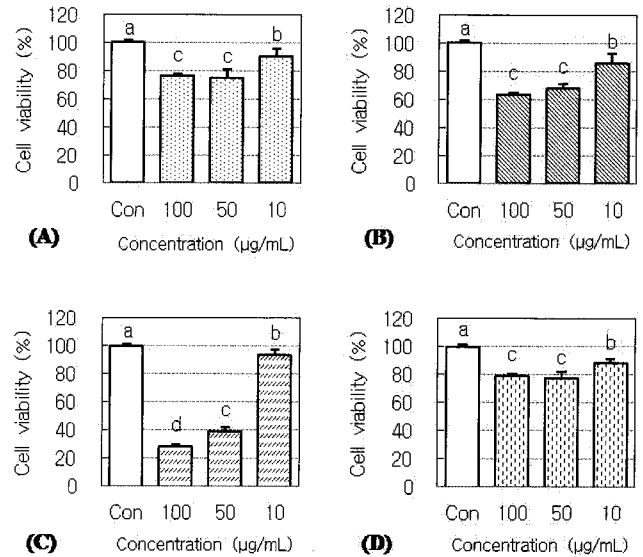


Fig. 4. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Corydalis heterocarpa* on the growth of U-937 human histiocytic lymphoma cells.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

염주괴불주머니 용매 분획물의 인체 암세포에 대한 증식 억제효과를 MCF-7 인체 유방암세포와 HT-29 인체 결장암 세포의 증식 억제 실험에서도 살펴보았다(Fig. 5, 6). 각 세포에 분획물을 차례로 처리한 결과에서 85% aq. MeOH 층에서 가장 뛰어난 효과를 보이며 처리 시료에 따른 경향이 다른 세포에서와 유사하게 나타났으나, 100 µg/ml의

시료 처리 농도에서 MCF-7이 51.7% 및 HT-29가 36.8%로 상대적으로 효과가 낮음을 알 수 있었다.

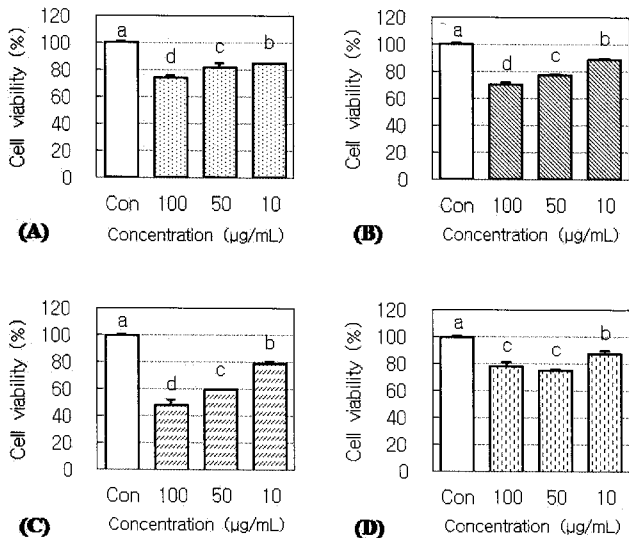


Fig. 5. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Corydalis heterocarpa* on the growth of MCF-7 human breast cancer cells.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

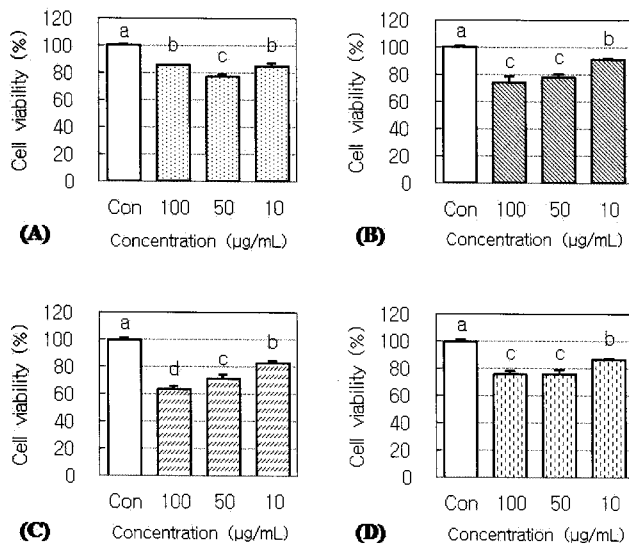


Fig. 6. Inhibitory effects of solvent fractions (A) H₂O (B) *n*-BuOH (C) 85% aq. MeOH and (D) *n*-hexane from *Corydalis heterocarpa* on the growth of HT-29 human colon cancer cells.

^{a-d} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

이상의 결과로부터 염주괴불주머니 조추출물의 암세포 성장을 억제하는 물질들이 용매 분획에 의해 85% aq. MeOH 층으로 이동함을 확인 할 수 있었으며, 인체암 특히 AGS

인체 위암세포를 100 µg/ml의 농도에서 처리할 때 약 90% 이상의 높은 증식 억제효과를 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구를 통해 높은 암세포 증식 억제율을 보이는 85% aq. MeOH 용매 분획물에서 활성성분의 분리 및 정제가 기대되어지며 화학구조 동정을 위한 분광학적 연구 및 다양한 생리활성 검증을 통해 암예방 효과를 가진 건강기능성 식품 및 의약품으로서의 개발이 가능할 것으로 여겨진다. 또한, 염생식물 중에서 식용 및 약용으로의 가치성을 인정받고 있는 함초, 나문재, 갯방풍 등과 함께 새로운 생리활성 물질 소재군으로서의 가치가 기대되어 진다.

요 약

본 연구에서는 염생식물의 한 종인 염주괴불주머니의 조추출물 및 용매별 분획물을 이용하여 생리활성물질에 의한 항발암성 물질의 생성 및 생체방어물질로서의 유용성을 검토하고자 5종의 인체암세포 (AGS, HT1080, U-937, MCF-7 및 HT-29)에 대한 증식 억제효과를 검토하였다. 조추출물에 대한 암세포 증식 억제능 측정 결과, 10, 50 및 100 µg/ml의 시료 처리 농도에서 농도 의존적으로 암세포의 생존율이 감소하는 경향을 확인하였으며, 모든 세포주에 대하여 methanol 조추출물 보다 methylene chloride 조추출물이 뛰어난 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서, 물질의 극성에 따른 암세포 성장 억제능을 관찰하고자 조추출물을 순차적으로 용매 분획하여 H₂O, *n*-BuOH, 85% aq. MeOH 및 *n*-hexane의 네 가지 분획층을 얻었으며, 조추출물과 동일한 조건하에서 암세포 증식 억제능을 재검토하였다. 그 결과, *n*-BuOH 분획층보다 85% aq. MeOH 분획층에서 우수한 암세포 성장 억제능이 확인되어, 이는 비교적 비극성인 methylene chloride 조추출물로부터 활성 성분들이 85% aq. MeOH 분획층으로 이동된 것으로 여겨졌다. 특히 100 µg/ml의 85% aq. MeOH 분획층의 시료를 처리한 AGS 인체 위암세포는 93.4%라는 강력한 효력을 기록하였으며, 그 외에도 HT1080 인체 섬유육종 세포가 85.0%, U-937 인체 구성 림프종 세포 71.5%, MCF-7 인체 유방암세포와 HT-29 인체 결장암세포가 각각 51.7% 및 36.8%의 암세포 증식 억제효과를 나타내었다. 이상의 결과로부터 해양생물 중 염생식물의 한 종류인 염주괴불주머니의 높은 항암활성효과와 함께 암예방 기능성 소재로서의 개발 가능성을 확인할 수 있었으며, 특히 염주괴불주머니의 85% aq. MeOH 분획층에 대한 집중적인 연구를 통해 새로운 생리활성물질의 개발이 기대된다.

사 사

본 연구는 2007년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원 (NO. R01-2007-000-20669-0)을 받아

수행되었으며 이에 감사 드립니다.

접수 : 2009년 3월 23일, 게재승인 : 2009년 4월 29일

REFERENCES

- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, and M. J. Thun (2008), Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J. Clin.* **58**, 71-96.
- Lee, J. O., S. Y. Choi, N. S. Park, Y. S. Shim, S. Y. Yoo, J. I. Lee, E. D. Lee, and S. Y. Chin (1996), Statistical Analysis on Cancer Patients of Korea Cancer Center Hospital, *J. Korean Cancer* **28**, 336-349.
- Shur, Y. J. (2004), Cancer chemopreventive Effects of Dietary Phytochemicals, *J. Korean Assoc. Cancer Preven.* **9**, 68-83.
- Park, E. J. and J. M. Pezzuto (2002), Botanicals in cancer chemoprevention, *Cancer Metast. Rev.* **21**, 231-255.
- Stan, S. D., S. Kar, G. D. Stoner, and S. V. Singh (2008), Bioactive Food Components and Cancer Risk Reduction, *J. Cell Biochem.* **104**, 339-356.
- Park, J. C. and J. W. Choi (1996), Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation, *Korean J. Pharmacogn.* **27**, 117-122.
- Seo, Y., H. J. Lee, Y. A. Kim, and K. E. Park (2004), Antioxidative effect of glasswort (*Salicornia herbacea*) extract from Daebudo, *Proceeding of Current Biotechnology and Bioengineering* **10**, 1-7.
- Ng, T. B., F. Liu, and H. X. Wang (2004), The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*, *Codonopsis pilosula*, *Pseudostellaria heterophylla* and *Glehnia littoralis*, *J. Ethnopharmacol.* **93**, 285-288.
- Kong, C.-S., Y. R. Yeom, J. I. Lee, Y. A. Kim, J.-S. Lee, and Y. Seo (2008), Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**, 177-182.
- Kong, C.-S., Y. A. Kim, M. M. Kim, J. S. Park, S. K. Kim, B. J. Lee, T. J. Nam, and Y. Seo (2008), Antioxidant Activity and Inhibition of MMP-9 by Isorhamnetin and Quercetin 3-O- β -D-Glucopyranosides Isolated from *Salicornia herbacea* in HT1080 Cells. *Food Sci. Biotechnol.* **17**, 983-989.
- Lee, Y. N. (2002), Flora of Korea, 4, pp241, Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Korea.
- Ma, W. G., Y. Fukushi, and S. Tahara (1999), Fungitoxic alkaloids from Hokkaido *Corydalis* species, *Fitoterapia* **70**, 258-265.
- Tatsuzawa, F., Y. Mikanagi, N. Saito, K. Shinoda, A. Shigihara, and T. Honda (2005), Cyanidin glycosides in flowers of genus *Corydalis* (Fumariaceae), *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 789-798.
- Choi, S. U., N. I. Baek, S. H. Kim, J. H. Yang, J. S. Eun, T. Y. Shin, J. P. Lim, J. H. Lee, H. Jeon, M. Y. Yun, K. H. Leem, H. W. Park, and D. K. Kim (2007), Cytotoxic isoquinoline alkaloids from the aerial parts of *Corydalis incise*, *Arch. Pharm. Res.* **30**, 151-154.
- Hansen, M. B., S. E. Nielsen, and K. Berg (1989), Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
- Park, J. G., H. Frucht, R. V. LaRocca, D. P. Bliss, Y. Kurita, T. R. Chen, J. G. Henslee, J. B. Trepel, R. T. Jensen, B. E. Johnson, Y. J. Bang, J. P. Kim, and A. F. Gazdar (1990), Characterization of cell lines established from human gastric carcinoma, *Cancer Res.* **50**, 2773-2780.