대한예방한의학회지 제5권 제2호(2001년 12월)
Kor. J. Oriental Preventive Medical Society 2001:5(2):122-129

카드뮴 독성으로 손상된 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 어성초 추출물의 재생효과 (Ⅶ)

이정호, 오현주, 정승일, 천현자, 한두석[1], 이현옥[2], 안종웅[3], 이미희[4], 백승화[#]
원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과[#], 치과대학 구강해부학교실,[1] 원광보건대학 치위생과,[2] 화학연구원, 화학물질연구팀,[3] 오시오 한의원[4]

Regenerative Effects of Houttuynia cordata Extracts against Cadmium-induced Cytotoxicity in NIH 3T3 fibroblasts Cultures (Ⅶ)

Jeong-Ho Lee, Hyun-Ju Oh, Seung-Il Jeong, Hyun-Ja Chun, Du-Seok Han[1], Hyun- Ok Lee[2], Jong-Woong Ahn[3], Mee-Hee Lee[4], Seung-Hwa Baek[#]

[#]Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, and [1]Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea. [2]Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health College, Iksan 570-750, Korea. [3]Korea Institute of Chemical Research, Natural Products Research Team, Daejon 305-600, Korea. Osio Oriental Medicine, Changwon 164-111, Korea.

This study was carried out to evaluate antitoxic effects of Houttuynia cordata extract on cadmium by colorimetric methods. The antitoxic activity ofc in NIH 3T3 fibroblasts was evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) and SRB (sulforhodamine B protein) assays. The light microscopic study was carried out to observe morphological changes of the treated cells. The concentration of 10-2 mg/ml of Houttuynia cordata extract was shown significant antitoxic activity. The number of NIH 3T3 fibroblasts were antitoxic and tend to regenerate. These results suggest that the ethyl acetate extract of Houttuynia cordata retains a potential antitoxic activity.

Key words: Houttuynia cordata Thunberg, MTT assay, SRB assay, Cadmium, Antitoxic activity

서 론

삼백초과 (Saururceae)에 속하는 어성초 (Houttuynia cordata Thunberg)는 다년생 초본식물로서, 중국과 일본에서는 전통의약으로 사용하였고, 항암작용, 항균작용, 항염작용, 해독, 이뇨, 신진대사촉진, 몸속의 노폐물과 체내 독소를 배출시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있으며,[1-7] 본초강목에서는 중금속을 해독한다고 하였으며[8], Lee 등[9]은 어성초 물 추출물이 흰쥐 장기내 카드뮴의 독성에 대한 해독경감효과 있다고 보고하였다. 이에 본 연구는 어성초를 물과 유기용매로 추출하여 얻은 추출물을 이용하여 카드뮴의 독성에 대한 세포의 재생효

과를 1차 검색방법인 비색법중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 카드뮴의 독성에 대한 방어효과를 평가하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 사용한 어성초는 전북 익산시 팔봉동에서 채집하여, 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였으며, 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 한의학전문대학원 천연물학교실에 보관되어있다. 전남 보성군에 소재한 보광영농조합법인에서 생산된 어성초 팩과 어성초 엑기스차를 사용하였다.

2. 추출

본 연구에 이용한 어성초는 전북 익산시 팔봉동에서 채집하여, 어성초의 잎을 잘게 썰어 음건한 후, 건조된 어성초의 잎을 분쇄하여 어성초 30 g을 1,000 ml둥근 플라스크에 증류수 300 ml넣고, 상온에서 24시간 동안 교반한 후 추출하였다. 이와같이 세번 반복 추출하여 얻은 추출물을 0.4 μm필터로 여과한 후, 여과액을 진공증류기로 35℃에 감압농축시킨 후 냉동건조하였다. 건조된 양은 물 추출물 1,870 mg을 얻었다. 헥산, 에틸 아세테이트, 클로르포름, 메탄올, 에탄올을 상온에서 위의 방법과 동일한 방법으로 추출하였으며, 용매를 감압농축하여 헥산 추출물 380 mg, 에틸 아세테이트 530 mg, 클로르포름 1,110 mg, 메탄올 추출물 2,360 mg, 에탄올 추출물 1,860 mg을 얻었다.

3. 시약 및 기기

어성초 추출에 사용된, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, ethanol, H2O는 증류하여 사용하였다. 세포배양에 사용한 MEM (Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone 시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 세포의 배양은 CO2 incubator (Shellab Co., U.S.A.)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경 (Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량 및 SRB정량은 ELISA reader (Spectra Max 250, U.S.A.)를 사용하였다.

4. 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4℃ 냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에틸알콜로 동량희석하였으며, 각각 1 : 1 (mg/ml)로 희석한 시료는 실험농도에 적합하도록 10배 serial dilution하여 10^{-2} ~ 10^{-5} mg/ml 농도를 실험에 사용하였다.

5. 세포배양

어성초 추출물에 대한 독성경감작용을 측정하기 위하여 NIH 3T3 섬유모세포를 사용하였다. 배양액으로는 MEM (Gibco, U.S.A.)에 10% fetal bovine serum (Gibco, U.S.A.)과 penicillin G (25 unit/ml), streptomycin (0.25 μg/ml)를 첨가하여 사용하였다. 각 세포의 배양은 온도 37℃, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기 (CO2 incubator, Shellab, U.S.A.)를 사용하였다. 실험을 위하여 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여, 세포수가 5×10^4 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

6. MTT정량분석법

Mosmann의 방법[10]에 따라 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여, 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. NIH

3T3 섬유세포에 대한 카드뮴의 MTT_{50} (midpoint inhibition value) 농도를 결정하였다. 수복효과 실험은 6개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT_{50}량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT_{50}군, MTT_{50}량과 각각의 어성초 추출물의 10^{-2}~10^{-5} mg/ml 농도를 배양액에 넣어 배양한 군은 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후, 분석당일 조제한 MTT (Sigma) 50 ㎍/ml가 함유된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치후, MTT formazan을 용해한 후 분광광도계 ELISA reader (520 nm)로 흡광도를 측정하여 MTT50군과 비교하였다.

7. SRB정량 분석법

Skehan 등[11]의 방법에 따라, 세포를 5×10^4 cells/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 SRB_{50} 농도를 결정하였다. MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB_{50}군 및 실험군으로 하여 어성초 추출물이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후, 0.4% sulforhodamine B를 200 ㎕씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1.0% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 nM Tris base로 결합된 protein stain을 녹인 후, 흡광도는 분광광도계 ELISA reader (520 nm)로 측정하여 SRB50군과 비교하였다.

8. 세포의 광학현미경적 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위하여, NIH 3T3 섬유모세포는 MTT정량 및 SRB정량을 하기전에 도립현미경으로 관찰하고, 사진을 촬영하였다.

9. 통계학적 해석

실험결과의 통계학적처리는 Student's t-test를 이용하였으며, p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

NIH 3T3 섬유모세포를 카드뮴으로 처리한 후 어성초 (Houttuynia cordata Thunberg)를 물과 유기용매로 추출한 추출물을 처리한 후, 카드뮴에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 Fig. 1, 2와 같다. NIH 3T3 섬유모세포를 카드뮴으로 처리한 후, MTT 및 SRB의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 마이크로몰농도에 대한 흡광도를 비례적으로 측정한 결과, MTT 및 SRB의 흡광도는 카드뮴의 농도에 의존하여 감소하였으며, IC_{50} (inhibitory concentration)인 MTT_{50}은 33.04 μM이며, SRB50은 54.72 μM이었다.12,13) NIH 3T3 섬유모세포에 대한 Cd_{50} 농도는 33.04 μM 카드뮴과 어성초 추출물 6종류와 어성초 상품 2종류를 처리하여 카드뮴에 대한 섬유모세포의 재생효과는 다음과 같은 결과를 얻었다. 물 추출물에서 10^{-2} mg/ml~10^{-3} mg/ml 농도[9], 에틸 아세테이트 추출물에서는 10^{-2} mg/ml농도, 헥산에서는 10-2 mg/ml농도, 메탄올에서는 10^{-4} mg/ml~10^{-2} mg/ml농도, 어성초 팩 10^{-2} mg/ml농도에서 카드뮴에 대한 추출물의 섬유모세포의 재생효과는 통계적으로 유의성 ($p<0.001$)이 나타났다 (Fig. 1). Fig. 1에서 보는 바와같이 어성초 헥산 추출물과 에틸 아세테이트 추출물에서 카드뮴을 처리하지않은 control군과 Cd_{50}처리군 에 헥산과 에틸 아세테이트추출물의 처리농도가 증가할수록 카드뮴에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과의 경향은 증가하였다. 클로르포름 추출물은 10^{-2} mg/ml~ 10^{-5} mg/ml농도까지 NIH 3T3 섬유

모세포의 카드뮴에 대한 재생효과의 증가폭은 거의 일정하게 나타나는 현상을 볼 수 있었으며, 물 추출물에서는 농도증가에 따른 흡광도의 증가변화가 낮게 나타났다. 메탄올 추출물에서는 Cd_{50}에서 10^{-4} mg/ml농도까지 흡광도의 증가폭이 높게 나타났으나 그 이상의 농도에서는 물 추출물의 흡광도와 유사하게 증가하였다. 물 추출물과 메탄올 추출물의 10^{-2} mg/ml농도가 되면 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과 (100%)가 높은 것으로 나타났으나, 에탄올 추출물과 어성초 팩의 경우에는 추출물의 농도증가에 따른 흡광도의 증가율이 낮게 나타났다. 어성초 차의 경우에는 10^{-5} mg/ml농도에서는 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생이 나타나지 않았으나 10^{-3} mg/ml농도 이후에 흡광도의 증가율이 나타나기 시작하였다. 실험결과를 종합해보면 추출물의 10^{-2} mg/ml농도에서 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 대조군에 대하여 메탄올 추출물 = 물 추출물 (100%) > 에탄올 추출물 (92.3%) > 헥산 추출물 (90.4%) > 클로르포름 추출물 (82.5%) > 에틸 아세테이트 추출물 (77.9%) > 어성초 팩 (68.5%) > 어성초 엑기스차 (57.7%)순으로 감소하여 나타났지만, 에틸 아세테이트 추출물의 농도증가에 따른 흡광도의 증가율은 다른 추출물보다 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 가장 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 1).

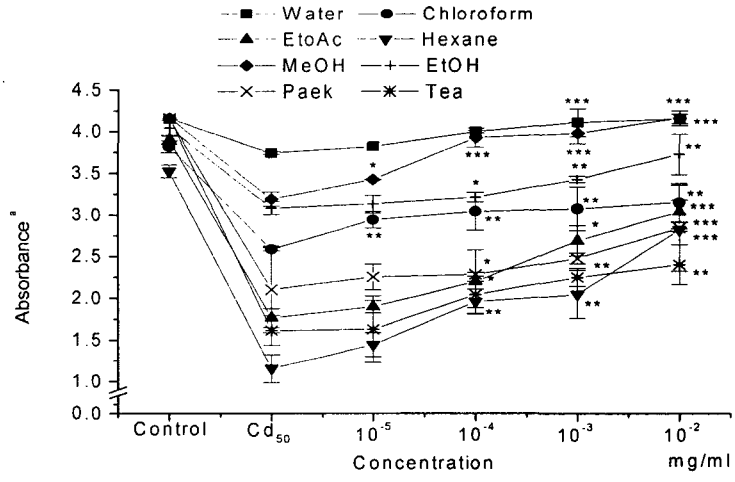

Fig. 1. The MTT absorbance of solvent extracts of *Houttuynia cordata* Thunberg on NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (Cd_{50}). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value; *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 (Student's t-test)

핵내 단백질인 sulforhodamine B protein량을 측정하는 방법인 SRB 정량을 측정한 결과, NIH 3T3 섬유모세포에 카드뮴을 처리한 후, 어성초추출물에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 어성초의 물 추출물에서 10^{-2} mg/ml농도, 클로르포름 추출물과 에틸 아세테이트 추출물에서는 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml농도, 메탄올 추출물 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-4} mg/ml농도, 에탄올 추출물에서 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-3} mg/ml농도에서 카드뮴에 대한 어성초 추출물의

NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 통계적인 유의성 ($p<0.001$)이 나타났다 (Fig. 2). 어성초의 에탄올 추출물에서는 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 나타나지 않았으나, 에틸 아세테이트 추출물에서는 Cd_{50} 군과 10^{-5} mg/ml 처리군은 카드뮴독성에 대한 재생효과가 높게 나타났으며, 10^{-2} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml 농도에서는 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 일정하게 증가하였으며, 10^{-2} mg/ml 농도에서 재생효과가 가장 높았다. 클로르포름 추출물에서도 에틸 아세테이트 추출물과 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생은 비슷한 경향을 보였지만, 메탄올 추출물의 경우에는 물 추출물의 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과와 비슷한 경향이 관찰되었다. 물 추출물과 헥산 추출물은 10^{-4} mg/ml농도 이상이 되면 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생의 변화는 일정하게 나타나는 것을 알 수 있다. 메탄올 추출물에서는 10^{-3} mg/ml농도와 10^{-4} mg/ml농도는 거의 변화가 없는 것으로 나타났으나, 10^{-5} mg/ml농도에서는 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 증가하는 경향을 알 수 있다. 어성초 팩은 각 투여농도에 따라 NIH 3T3 섬유모세포의 카드뮴 독성에 대한 재생효과가 증가하는 경향을 보인 반면 어성초 엑기스차의 경우에는 카드뮴 독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과는 10^{-3} mg/ml ~ 10^{-5} mg/ml농도까지는 증가하는 경향을 거의 일정하다가 10^{-2} mg/ml농도에서 증가폭이 크게 나타났다. 각 추출물에서 SRB 분석법보다 MTT 분석법에서 카드뮴독성에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 재생효과가 민감하게 나타나는 것을 알 수 있다 (Figs. 1, 2).

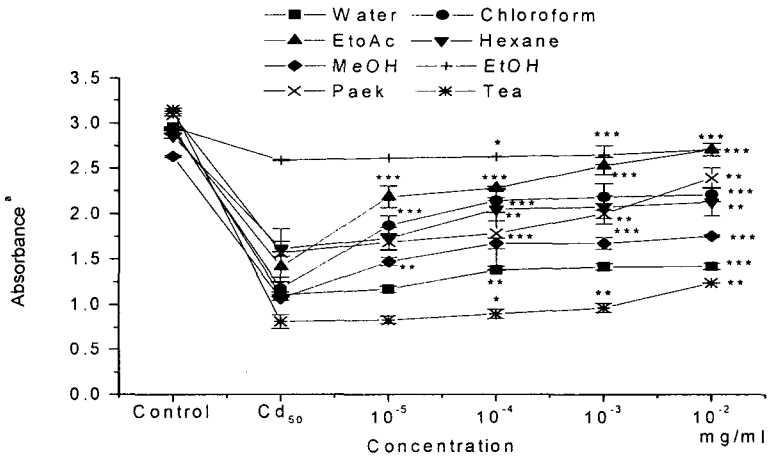

Fig. 2. The SRB absorbance of solvent extracts of *Houttuynia cordata* Thunberg on NIH 3T3 fibroblasts treated with cadmium (Cd_{50}). Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvested with trypsin-EDTA. [a]The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments. Significantly different from the control value; *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 (Student's t-test)

Table 1에서 보는 바와같이, 어성초를 물과 유기용매로 추출하여 추출물을 NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과, MTT 정량분석법에서는 클로르포름 추출물, 에틸 아세테이트 추출물에서는 유사한 IC_{50} 측정값을 얻어, 다른 추출물에 비교하면 세포독성이 높게 나타났지만, 어성초 엑기스차와 메탄올 추출물은 똑같은 IC_{50} 측정값으로 비교적 세포독성이

높게 나타났다. NIH 3T3 섬유모세포에 대한 세포독성을 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법으로 IC_{50}을 측정한 결과는 EAHC > CHHC > MTHC = THC > WHC > ETHC > HXHC = PAHC 순서로 세포독성이 감소되었다. 따라서 어성초 추출물에 대한 NIH 3T3 섬유모세포의 세포독성은 극성이 낮은 용매로 추출한 어성초의 헥산 추출물과 어성초 팩은 가장 낮은 세포독성 (IC_{50} ; MTT_{50} = 0.127 mg/ml, SRB_{50} = 0.254 mg/ml)을 관찰할 수 있었다.

Table. 1. The cytotoxic activities of solvent extracts of *Houttuynia cordata* Thunberg on NIH 3T3 fibroblasts. Comparison of IC_{50} for solvent extracts of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} on NIH 3T3 fibroblasts by the MTT assay and the SRB assay

Solvent extract [a]	IC_{50} (mg/ml) [b]	
	MTT assay	SRB assay
WHC	0.105	0.193
CHHC	0.046	0.109
EAHC	0.036	0.104
HXHC	0.127	0.254
MTHC	0.051	0.175
ETHC	0.117	0.207
PAHC	0.127	0.254
THC	0.051	0.175

Plant extracts: WHC ; water extract of Houttuynia cordata Thunberg. CHHC ; chloroform extract of Houttuynia cordata Thunberg. EAHC ; ethyl acetate extract of Houttuynia cordata Thunberg. HXHC ; hexane extract of Houttuynia cordata Thunberg. MTHC ; methanol extract of Houttuynia cordata Thunberg. ETHC ; ethanol extract of Houttuynia cordata Thunberg. PAHC ; commercial pack of Houttuynia cordata Thunberg. THC ; commercial tea of Houttuynia cordata Thunberg.

a. Each extract was examined in four concentrations in four sets of experiments.
b. IC_{50} represents the concentration of an extract required for 50% inhibition of cell growth.

세포의 광학현미경적 관찰에서는 대조군을 24시간 배양하면 well 바닥이 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, NIH 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있다 (Fig. 3-1). IC_{50} (MTT_{50} 및 SRB_{50})의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소하였고, 세포의 형태가 원형으로부터 변형되는 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 3-2). IC_{50}농도의 카드뮴과 어성초의 에틸 아세테이트 추출물의 10^{-2} mg/ml 농도로 처리한 군에서는 IC_{50}군에 비하여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다 (Fig. 3-3). 본 실험결과에 의하면, 카드뮴에 대한 세포독성을 어성초의 에틸 아세테이트 추출물이 재생효과가 있는 것으로 인정된다.[9] 이에 어성초의 에틸 아세테이트 추출물이 카드뮴 독성에 대한 해독물질이 함유되어 있을 것으로 판단되어, 에틸 아세테이트 추출물을 분리하여 분광화학적인 방법으로 분자구조를 규명하는 노력을 계속할 계획이다.

결 론

카드뮴이 NIH 3T3 섬유모세포에 미치는 세

포독성을 검정하고, 카드뮴 IC_{50} (MTT_{50}, SRB_{50})에 의하여 손상된 NIH 3T3 섬유모세포를 수복시킬 수 있는 생리활성물질을 규명하고자 본 연구를 수행하였다. 실험은 배양액만으로 배양한 군을 대조군, 세포독성 시험에 의하여 결정된 IC_{50} 농도의 카드뮴과 어성초 6종의 추출물과 상품 2종을 각각 배양액에 넣어 배양한 군을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 군은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT 흡광도, SRB 흡광도의 양을 측정하고, 광학 현미경적 관찰을 실시하였다. 어성초의 에틸 아세테이트 추출물에서 카드뮴독성에 대한 재생효과가 우수하게 나타났으며, 광학현미경적 소견에서도 세포의 재생이 뚜렷하였다.

감사의 말씀

본 연구는 어성초 팩과 엑기스차를 제공하여 주신 보광영농법인에게 감사를 드리며, 2001년도 원광대학교 교비연구비와 일부 두뇌한국 21 사업지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

참고 문헌

1. Probstle, A., Lotter, H., Wagner-Redecker, W., Matthiesen, U. and Bauer, A.: Identification of lipophilic constituents with anti-inflammatory activity from Houttuynia cordata. Planta Med, 59, A663 (1993).
2. Nishiya. H., Ishiwata. K., Komatsu. K., Nakata. O., Kitamura. K. and Fujh. S.: Platelet aggregation inhibitors from Jyu-yaku (Houttuyniae Herb). Chem. Pharm. Bull, 36(5) 1902 (1988).
3. Hayashi. K., Kamiya. M. and Hayashi. T.: Virucidal effects of the steam Distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. Planta Med, 61, 237 (1995).
4. Pröbstle. A. and Bauer. A.: Aristolactams and a 4,5-dioxoaporphine derivative from Houttuynia cordata. Planta Med. 58, 568 (1992).
5. Borthakur, M., Singh, R, S. and Bora, P.: In vitro Regeneration of Houttuynia cordata: A medicinal herd. Planta Med. 56, 677 (1999).
6. 이정호, 박낭규, 양은영, 이현옥, 한동민, 백승화: 어성초 추출물의 세포독성과 항균효과 (IV). 대한예방한의학회지, 4 (1). 144 (2000).
7. 김근영, 정동욱, 정희종: 어성초의 화학성분 및 항미생물 활성. 한국식품과학회지, 29(3), 400 (1997).
8. 이시진: 본초강목, 호북. 문광도서유한공사, 하권, p. 14 (1982).
9. Lee, J. H., You, I. S., Kim, J. S., Lee, K. N., Chung, W. Y., Han, D. S. and Beak, S. H.: The inhibitory effects of Houttuynia cordata THUMB against cadmium induced cytotoxicity (II). Kor. J. Pharm. Korea. 44, 432 (2000).
10. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65, 55 (1978).
11. Skehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M. R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82, 1107 (1990).

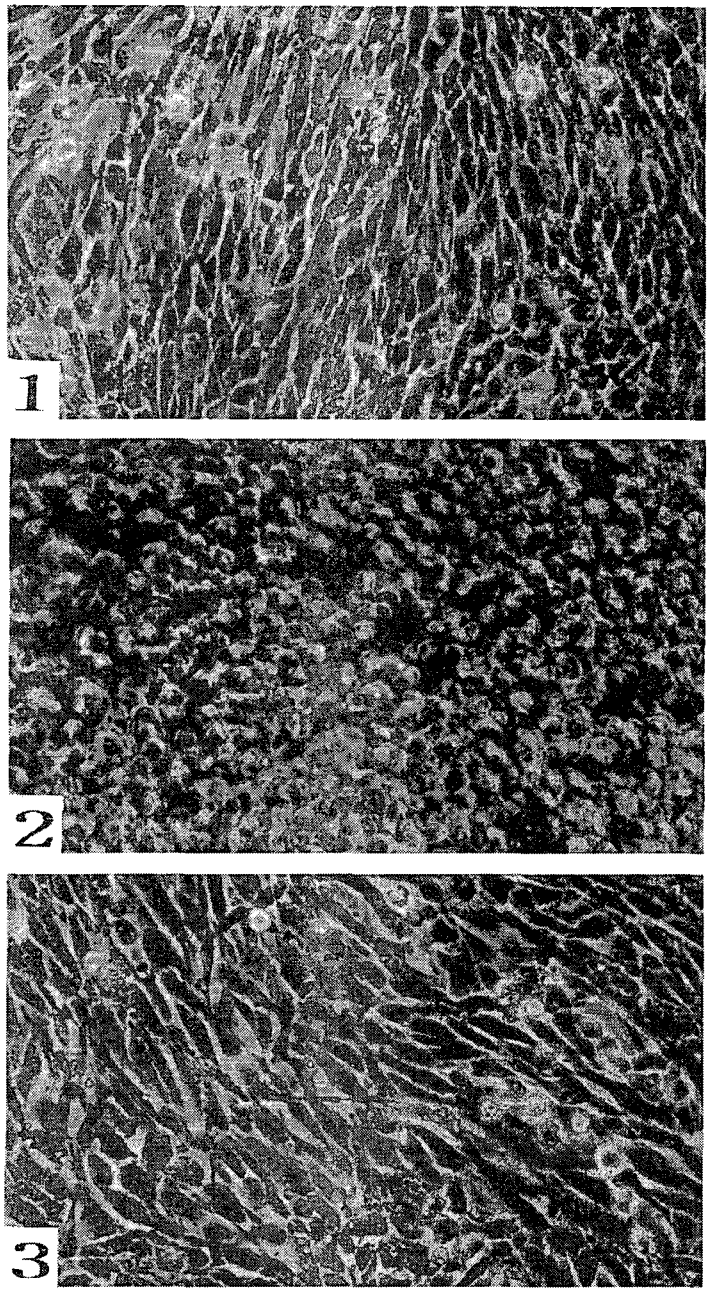

Fig. 3. Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts treated with MTT for additional 3hrs after incubation with unmodified medium (control) for 2 days (×200). Most cells had abundant cytoplasm and showed well-spread morphology (1). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the Cd_{50} concentration for 2 days (×200). Most cells were formed round type and number of cells were decreased (2). Inverted photomicrograph of NIH 3T3 fibroblasts after incubation in the medium containing Cd_{50} concentration plus 10^{-2} mg/ml concentration of *Houttuynia cordata* for 2 days (×200). Most cells were showed regenerative and number of cells were increased (3).