International Journal of Oral Biology, Vol. 43, No. 3 September 30 2018, p. 129-132
Copyright ⓒ 2018, *The Korean Academy of Oral Biology*
http://dx.doi.org/10.11620/IJOB.2018.43.3.129
pISSN 1226-7155, eISSN 2287-6618

International Journal of Oral Biology

Antimicrobial Effect of Ethanol Extract of *Garcinia mangostana L.* against *Enterococcus faecalis* Isolated from Human Oral Cavity

Tae-Young Park[1], Yun Kyong Lim[2], Dae Sung Lee[3*] and Joong-Ki Kook[2*]

[1]*Department of Conservative Dentistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea*
[2]*Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea*
[3]*Medi Bio Lab Co., Ltd., Seoul 61452, Republic of Korea*

(received July 11, 2018; revised August 7, 2018; accepted August 9, 2018)

***Enterococcus faecalis* is a major causative agent of endodontic treatment failure. The purpose of this study was to investigate bactericidal effects of ethanol extract of *Garcinia mangostana L.* (mangosteen extract) on five strains of *E. faecalis* that were isolated from human oral cavities. The bactericidal effects of mangosteen extract were assessed by measurement of minimum bactericidal concentration (MBC) value. The cytotoxicity of mangosteen extract on immortalized human gingival fibroblasts, hTERT-hNOF, was determined based on cell counting method. The data revealed the MBC value of mangosteen extract against the *E. faecalis* strains was 4 μg/ml. Additionally, the cell viability of mangosteen extract on hTERT-hNOF was 83.7-89.1% at the 1 to 16 μg/ml. These findings indicated that mangosteen extract could be used as a root canal cleaner during management of endodontic treatment failure caused by *E. faecalis*.**

Key words: mangosteen extract, *Enterococcus faecalis*, bactericidal effect

*Correspondence to: Dae Sung Lee, Medi Bio Lab Co., Ltd., 28 Digital-ro 30-gil Guro-gu, Seoul 08389, Republic of Korea
Tel: +82-02-849-8917
E-mail: dsl2008@naver.com
ORCID : 0000-0003-2317-7848

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 309 Pilmun-daero, Dong-gu, Gwangju 61542, Republic of Korea
Tel: +82-62-230-6877, Fax: +82-62-224-3706
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr
ORCID : 0000-0003-2628-2870

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

근관 치료는 근관 성형 및 근관 세척, 근관 소독을 통해 이루어지며 근관 내 세균의 90% 이상이 기구의 기계적인 제거에 의해 이루어진다고 알려져 있다[1,2]. 그러나 잔존 세균이 협부(isthmus), 부근관, 상아세관 등에 남아 치근단 치주염을 일으킬 수 있다[3]. 치료된 치아에서 가장 흔하게 잔존하는 세균 종으로 *Enterococcus faecalis*가 있으며, 검출율은 90%에 이른다[4-6]. *E. faecalis*는 상아 세관으로 깊이 침투할 수 있고 근관에 생체막(biofilm)을 형성할 수 있으며 영양분 결핍에도 살아남을 수 있고 영양분이 재축적되면 다시 자랄 수 있다[7-9]. 또한, *E. faecalis*는 높은 알카리성 특성을 갖는 수산화칼슘에도 저항할 수 있어 클로르헥시딘(chlorhexidine), MTAD (mixture of a tetracycline isomer) 등 화학적으로 *E. faecalis*를 완전하게 제거하기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다[10-12].

망고스틴(*Garcinia mangostana L.*)은 인도네시아, 태국, 말레이시아 같은 동남아시아에서 광범위하게 재배되고 있다[13]. 망고스틴 내에 포함된 xanthone에 의해 다양한 약리학적 효과를 나타내며, 항염증작용, 항암작용, 항산화작용, 항

궤양작용, 항균작용을 나타낸다[14,15]. 특히, vancomycin resistant enterococci (VRE)와 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)와 같은 항생제 내성을 가진 세균들에게도 큰 항균효과를 가짐이 알려지면서 큰 관심을 받고 있다[16]. 현재, 망고스틴 과일 껍질에서 순수 분리한 알파-망고스틴(alpha-mangostin)에 대한 *E. faecalis* 1 균주(ATCC 29212)에 대한 항균능에 대한 보고가 있었다[17]. 하지만 천연물에서 단일 화합물을 추출하는 것은 산업화하기에는 경제적 및 시간적 제약이 있기 때문에 복합추출물을 사용하는 것이 경제적이라 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 망고스틴 에탄올 추출물에 대한 한국인 구강에서 분리 동정된 *E. faecalis*에 대한 항균능을 조사하여 향후 근관세척제로서의 사용 가능성과 적정 농도를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

세균 및 배양

본 연구에 사용된 *E. faecalis* KCOM 1083, *E. faecalis* KCOM 1161, *E. faecalis* KCOM 1162, *E. faecalis* KCOM 2816 및 *E. faecalis* KCOM 2823 등은 한국인의 구강에서 분리 동정된 것으로 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 그리고 *E. faecalis* KCTC 3206^{T}는 한국생명공학연구원 생명자원센터(Korean Collection for Type Culture, Daejeon, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 모든 균주들은 brain heart infusion (BHI; BD Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에 접종하여 37℃ 세균배양기(Model SW-900C, Sugong, Seoul, Korea)에서 배양하였다.

최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 측정

본 연구에서 사용한 망고스틴 에탄올 추출물(이하 망고스틴 추출물)은 Savesta 사(Gujarat, India)에 의뢰하여 추출하였으며, 이들은 alpha-mangostin (41.08%)을 포함한 플라보노이드(flavonoids)가 96.44% 함유되어 있다. 망고스틴 추출물은 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 녹여서 다음 실험들에 사용하였다.

MBC 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [18]에서 제시한 미세희석(micro-dilution) 법을 변형하여 사용하였다. 각 세균들을 앞에서 소개한 배지에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 세균배양기에서 배양한 후 1×10^6 CFU/ml가 되도록 희석하여 96-well plate에 분주하였다. 그 후 망고스틴 추출물 분말을 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 μg/ml 농도가 되도록 세균 배양액에 첨가하였다. 이때 음성대조군은 망고스틴 추출물 분말의 용매인 DMSO (Sigma-Aldrich)를 세균배양액에 1%를 첨가한 것으로 하고, 양성대조군은 ampicillin (Sigma-Aldrich) 최종 농도가 100 μg/ml가 되도록 세균배양액에 첨가한 것을 사용하였다. 이들을 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 세균배양액은 원액, 1,000배, 10,000배 희석하여 10 μl를 취하여 한천배지에 도말하였다. 이를 37℃에서 24시간 동안 배양한 뒤 형성된 군락수(colony forming unit; CFU)를 측정하였다. 음성대조군과 비교하여 99.9% 세균이 자라지 않는 최소 농도를 MBC 값으로 결정하였다. 각 반응은 3회 반복 실시하였다.

세포 독성 실험

본 연구에서 사용한 불멸화된 사람 치은섬유모세포(immortalized human gingival fibroblast, hTERT-hNOF)는 연세대학교 구강병리학 교실 김진 교수님으로부터 분양받아 사용하였다. hTERT-hNOF는 DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium / Nutrient Mixture F-12, 3:1 Mixture, Welgene, Gyeongsan, Korea)에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA) 및 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 혼합한 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2, 100% 습도가 유지되는 CO_2 세포배양기(Model MCO175, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하여 다음 실험에 사용하였다.

hTERT-hNOF를 24-well plate에 5×10^4 cells을 계대 배양한 후 80% confluence 되면, 망고스틴 추출물을 1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/ml로 최종 농도가 되도록 첨가하였다. 이를 24시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척 후 0.25% Trypsin-EDTA (Welgene, Gyeongsan, Korea)를 첨가하여 세포를 떨어뜨렸다. 여기에 배지를 첨가하여 세포를 현탁한 후 hemocytometer를 이용하여 현미경하에서 세포수를 세었다. 각 반응은 3회 반복 실시하였다. 그리고 생존한 세포수의 평균 및 표준편차를 계산하고 대조군(1% DMSO)에 대한 백분율을 산출하였다.

결 과

망고스틴 추출물 8 μg/ml 이상의 농도로 24시간 처리한 실험군에서 본 연구에서 사용된 모든 *E. faecalis* 균주들에 대한 살균율은 100%이었다(Table 1). 망고스틴 추출물 4 μg/ml 농도에서도 *E. faecalis* KCTC 3206^T 균주(55.6%)를 제외하고는 모두 24시간 처리한 실험군에서 100% 살균율을 보였다(Table 1).

망고스틴 추출물의 농도에 따른 hTERT-hNOF에 대한 세포 생존율을 측정한 결과, 본 시험에서 사용한 망고스

Table 1. Antimicrobial activity of ethanolic extract of mangosteen against *Enterococcus faecalis*

Strain	Inhibition of bacterial growth (%)						
	DMSO 1%	Concentration of mangosteen ethanolic extract (μg/ml)					
		0.5	1	2	4	8	16
KCOM 1083	0	0	0	0	100	100	100
KCOM 2823	0	0	0	0	100	100	100
KCOM 1161	0	0	0	0	100	100	100
KCOM 1162	0	0	0	0	100	100	100
KCOM 2816	0	0	0	0	100	100	100
KCTC 3206^T	0	0	0	0	0	100	100

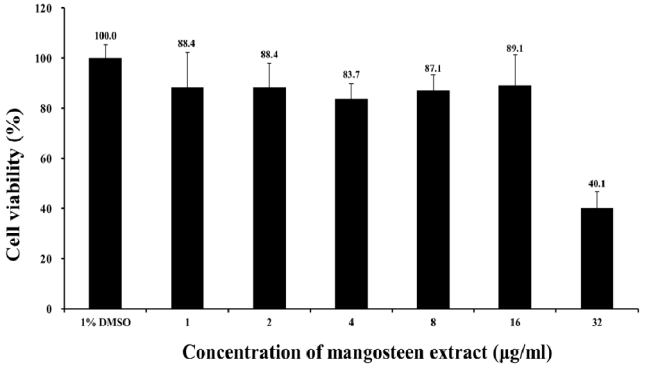

Fig. 1. Effect of ethanol extract of mangosteen on the cell viability of immortalized human gingival fibroblasts, hTERT-hNOF, using cell counting method.

틴 추출물 16 μg/ml 이하의 농도에서는 hTERT-hNOF 세포주의 생존율은 대조군에 비해 83.7-89.1%을 보여 세포독성이 없는 것으로 조사되었다(Fig. 1).

고 찰

연구 결과, 망고스틴 추출물의 *E. faecalis* 6균주들에 대한 24시간 배양 후 MBC 값은 한국인에서 분리 동정된 5균주들에 대해서는 4 μg/ml이었으며, 서양인에서 분리 동정된 *E. faecalis* KCTC 3206^T 균주에 대해서는 8 μg/ml이었다. 망고스틴 열매 껍질에서 순수 분리한 alpha-mangostin에 대한 *E. faecalis* ATCC 29212에 대한 MBC 값은 3.94 μg/ml로 보고되었다[17]. 본 연구에서 사용한 망고스틴 추출물에 함유된 alpha-mangostin의 농도가 41.08%인 점을 감안하면, 망고스틴 추출물 4 μg/ml에는 alpha-mangostin 1.64 μg/ml이 함유된 것이라 볼 수 있다. 즉, 한국인에서 분리 동정된 5균주의 *E. faecalis*는 서양인에서 분리 동정된 균주들(ATCC 29212 및 KCTC 3206^T)에 비해 alpha-mangostin에 대해 감수성(sensitivity)이 좋은 것은 것으로 조사되었다.

현재, 근관세척제로 주로 사용되는 차아염소산나트륨(NaOCl)과 클로르헥시딘의 *E. faecalis* ATCC 29212 균주에 대한 MBC 값은 각각 0.3125% (15.625 mg/ml) 및 0.0005% (0.005 mg/ml)인 것으로 조사되었다[17]. 차아염소산나트륨과 클로르헥시딘이 근관세척제로서 각광받고 있지만 두 물질을 병행 사용 시 파라클로로아닐린(parachloroaniline)이라는 적갈색의 침전물이 침전되기 때문에 동시에 사용하기 어렵다[19]. 또한, *Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Streptococcus salivarius, Streptococcus oralis* and *Lactobacillus acidophilus* 등의 구강 세균들에 대한 망고스틴의 MBC 값은 *E. faecalis* 균주에 대한 것에 비해 매우 높았다[20]. 즉, *S. mutans, S. sanguinis, S. salivarius* 균주에 대한 MBC 값은 200 mg/ml, *S. oralis* 균주에 대해서는 100 mg/ml, *L. acidophilus* 균주에 대해서는 50 mg/ml로 높게 나타났다[20]. 결과적으로 근관에 존재하는 모든 종류의 세균을 사멸시키기 위해 망고스틴을 근관세척제로 이용하기 위해서는 다른 근관세척제와 병용 사용이 필요할 것으로 보인다. 이러한 병용 사용을 위해서는 클로르헥시딘보다 *E. faecalis*에 대한 감수성도 좋고 침전물을 형성시키지 않을 차아염소산나트륨과 같이 사용하는 것이 효과적일 것이라 생각된다.

망고스틴의 hTERT-hNOF에 대한 세포독성 실험의 결과에 의하면 16 μg/ml 이하의 농도에서는 세포 독성이 없는 것으로 조사되었다(Fig. 1). Alpha-mangostin은 사람정상치은섬유모세포[21]와 사람치주인대세포[17]에 대한 세포독성 실험에서도 세포독성이 없다고 보고되었다. 즉, alpha-mangostin 15.76 μg/ml을 사람치주인대세포에 10분간 적용한 경우에 세포 독성이 존재하지 않았고[17], alpha-mangostin 4,000 μg/ml를 NHGF에 8시간 적용한 경우 세포 독성이 존재하지 않았다[21]. 하지만, 본 연구에서 망고스틴 추출물 64 μg/ml를 hTERT-hNOF에 24시간 투여한 경우 세포생존율이 40.1%이었다. 이러한 차이는 망고스틴 추출물에는 alpha-mangostin 이외의 세포 독성을 갖는 화합물이 존재하

기 때문인 것으로 생각된다. 다음 연구에서는 망고스틴 추출물을 물과 같은 다른 용매를 이용하여 추출한 후에 동일한 실험이 필요하리라 생각된다.

이러한 연구 결과를 종합할 때, 망고스틴은 근관치료 실패의 주요한 원인균이라 알려진 *E. faecalis*에 대한 항균능이 우수하면서도 치근단 주위 조직에 있는 정상 세포에 대한 독성이 적어 재근관치료 시 유용한 근관세척제로 사용 가능할 것으로 생각된다.

Conflict of Interest

Dae Sung Lee is a co-applicant on patent application 10-2018-0109825 entitled "Composition for cleansing root canal comprising garcinia mangostana extract."

References

1. Dalton BC, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. J Endod. 1998;24:763-767. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80170-2.
2. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. Int Endod J. 2013;46:1083-1087. doi: 10.1111/iej.12108.
3. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. J Endod. 2009;35:493-502. doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014.
4. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998;31:1-7. doi: 10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00111.x.
5. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003;36:1-11. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00603.x.
6. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. J Endod. 2006;32:173-177. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.037.
7. Siqueira JF Jr, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. J Endod. 1996;22:308-310. doi : 10.1016/S0099-2399(96)80265-2.
8. Distel JW1, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002;28:689-693. doi: 10.1097/00004770-200210000-00003.
9. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:234-239. doi: 10.1034/j.1399-302X.2003.00072.x.
10. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35:221-228. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00504.x.
11. Lima KC1, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod. 2001;27:616-619. doi: 10.1097/00004770-200110000-00004.
12. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an *in vitro* investigation. J Endod. 2003;29:400-403. doi: 10.1097/00004770-200306000-00005.
13. Pedraza-Chaverri J, Cárdenas-Rodríguez N, Orozco-Ibarra M, Pérez-Rojas JM. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Food Chem Toxicol. 2008;46:3227-3239. doi: 10.1016/j.fct.2008.07.024.
14. Obolskiy D1, Pischel I, Siriwatanametanon N, Heinrich M. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. Phytother Res. 2009;23:1047-1065. doi: 10.1002/ptr.2730.
15. Jindarat S. Xanthones from mangosteen (*Garcinia mangostana*): multi-targeting pharmacological properties. J Med Assoc Thai. 2014;97:S196-201.
16. Sakagami Y, Iinuma M, Piyasena KG, Dharmaratne HR. Antibacterial activity of alpha-mangostin against vancomycin resistant enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. Phytomedicine 2005;12:203-208. doi: 10.1016/j.phymed.2003.09.012.
17. Kaomongkolgit R, Jamdee K, Pumklin J, Pavasant P. Laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of alpha-mangostin when used as a root canal irrigant. Indian Journal of Dentistry. 2013;4:12-17. doi: 10.1016/j.ijd.2012.12.006
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. Ninth ed. CLSI document M7-A8. Wayne Pennsylvania USA; 2012.
19. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod. 2007;33:966-969. doi: 10.1016/j.joen.2007.04.001.
20. Janardhanan S, Mahendra J, Girija AS, Mahendra L, Priyadharsini V. Antimicrobial effects of *Garcinia Mangostana* on cariogenic microorganisms. J Clin Diagn Res. 2017;11:ZC19-ZC22. doi: 10.7860/JCDR/2017/22143.9160.
21. Kaomongkolgit R, Jamdee K, Chaisomboon N. Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. J Oral Sci. 2009;51:401-406. doi: 10.2334/josnusd.51.401.