

異硫氰酸酯和螯合劑合併使用於清除化學誘導細菌持久細胞的評估

王作萍¹ 成佳綺³ 顏千惠³ 李欣蓉² 羅宏仁³

高雄榮民總醫院 ¹ 病理檢驗部 ² 內科部感染科
³ 輔英科技大學 醫學檢驗生物技術系

細菌抗藥性在目前為嚴重的公共衛生問題。細菌可以透過發展持久性及抗藥性來抵禦抗生素以提高生存機會。細菌持久細胞 (bacterial persisters cell) 其特徵是少部分細菌細胞會處於休眠狀態，導致其代謝活動降低，並提高對抗生素的耐藥性，雖然與其他細菌種群在表型上不同，但在基因上相同的細菌型態，在細菌產生抗藥性及慢性感染復發中扮演著重要角色。因此我們計畫透過合併 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 來提高異硫氰酸酯 (isothiocyanates, ITCs) 類藥物的抗菌效果。其中 EDTA 是一種螯合劑，已證實可以增加細菌外膜的滲透性。而 ITCs 是天然抗菌分子，可有效抑制許多病原菌的生長。我們同時評估 EDTA 與 ITCs 聯合使用在對抗細菌持久性和細菌生長之抑制作用。實驗中細菌對抗菌劑的敏感性是由最低抑菌濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 測定。化學誘導細菌持久細胞則是利用 carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) 誘導使 *Pseudomonas aeruginosa* 進入持久性表型。並在單獨 sub-MIC ITCs 與合併 EDTA 的情況下，透過存活數來評估對細菌持久細胞的殺菌效果。最後以生長抑制作用，觀察前述抗菌藥物對細菌之抑制效果。結果顯示在 CCCP 誘導下 *P. aeruginosa* 所形成的細菌持久細胞數量比未經處理的細菌多約 100 倍，以 MIC 確認細菌持久細胞對 ITCs 類藥物並未產生抗藥性，存活數試驗中可見 sub-MIC 的 Benzyl isothiocyanate (BITC) 或 indole-3-carbinol (I3C) 合併 EDTA 使用後以劑量和時間依賴性方式測定，發現亦顯著降低細菌持久細胞的存活數。因此最後結果顯示，ITCs 合併 EDTA 可有效地根除 CCCP 誘導的 *P. aeruginosa* 細菌持久細胞。這結果提供一種對抗細菌持久細胞的策略，亦可能有助於防止細菌之反覆感染。(**感控雜誌 2024;34:71-84**)

關鍵詞：多重抗藥細菌、異硫氰酸酯、綠膿桿菌、外膜、細菌持久細胞

民國 112 年 4 月 15 日受理
民國 112 年 6 月 15 日修正
民國 113 年 4 月 3 日接受刊載

通訊作者：羅宏仁
通訊地址：高雄市大寮區進學路 151 號
通訊電話：07-7811151

DOI: 10.6526/ICJ.202404_34(2).0001

中華民國 113 年 4 月第三十四卷二期

前 言

綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 為常造成醫療照顧相關感染之伺機性病原菌。由於抗生素的濫用，導致現今臨床面臨著多重抗藥性 (multidrug resistance, MDR) 菌的問題。MDR 定義為細菌對於三種以上抗生素產生抗藥性 [1]。目前細菌抗藥的機制包含：對抗生素進行化學修飾與水解、限制抗生素進入細胞質、改變抗生素之標的位置、外膜通透性改變以及主動外排幫浦 (efflux pump) 等。除上述幾種機制外，研究顯示細菌亦可透過形成細菌持久細胞 (bacterial persisters cell) 及生成生物膜 (biofilm) 來提高對藥物的耐受性 (tolerance) [2-4]。

細菌持久細胞為一種呈現休眠狀態的細菌亞群 (sub-group)，當細菌處於不利條件下，例如飢餓狀態或高濃度抗生素之環境，少部分的細菌會隨機形成亞群，這些細菌亞群具備著雖存活 (viable) 但低度生長、複製及代謝的特性，卻也因此可以耐受高濃度的抗菌藥物而不被殺死。細菌持久細胞對於抗生素有較高之耐受性，若其一旦恢復生長與代謝活性狀態時即恢復其對抗生素的感受性 [5, 6]。目前研究顯示細菌持久細胞形成原因包含了 DNA (deoxyribonucleic acid) 損傷、限制營養 (nutrient starvation)、影響群體感應 (quorum-Sensing)、氧化壓力 (oxidative stress) 以及處在極端 pH 值

環境等 [5, 7]。另外發現形成生物膜所造成的營養不利環境亦有助於形成細菌持久細胞，因此產生生物膜的細菌通常對於大部分的抗生素具有較高的耐受性 [8]。當細菌營養受限制時能提高耐藥性，其主要因素是因代謝活性減少使 DNA 複製、蛋白質以及肽聚糖 (peptidoglycan) 合成等活性降低，使抗生素的標的減少，同時生物膜亦可協助逃避宿主免疫系統，使細菌能在逆境環境存活 [6, 8]。而在臨床上發現當細菌持久細胞形成時，常會造成治療困難，則是因其可藉由降低代謝維持在逆境環境下生存的特性，因而造成反覆性或持續性感染，從而導致最終治療失敗 [5]。因此，在臨床治療時，若抗生素無法有效清除細菌 (包含細菌持久細胞)，殘存下來的菌株隨時有機會發展產生更具威脅性的抗藥性菌種，我們不得不謹慎面對此一威脅。

革蘭氏陰性菌細胞壁外膜 (outer membrane) 的組成包含一層脂多醣體 (Lipopolysaccharide)，其結構穩定性與二價陽離子有關 [9]，在限制抗生素進入細菌體的抗藥機制扮演重要角色。透過形成通透屏障 (permeability barrier)，使疏水性 (hydrophobic) 物質及大分子無法通過，是革蘭氏陰性菌對抗生素之內源性抗藥機制 (intrinsic resistance) [9, 10]。儘管外膜可為細菌提供對抗菌藥物之物理性保護，研究顯示，透過外膜通透分子 (membrane-active molecules) 促進抗菌

藥物進入細胞質，可提高藥物對細菌的抑制效果 [11]。例如以具有提高滲透活性的表面活性蛋白 (surfactin)，改變磷脂雙層結構，使外膜上出現孔洞，提高藥物進入細胞質之效率，以提高抗菌之效果 [12]。除了一般外膜通透劑 (membrane-active agents) 外，ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 也具有外膜通透作用，能整合二價陽離子之作用，因此可造成革蘭氏陰性菌外膜的不穩定，進而釋出脂多醣體，當外膜結構受到破壞，致使疏水性抗菌分子更容易通透細菌外膜，而達到抑制細菌的目的 [9]。

異硫氰酸酯 (isothiocyanates, ITCs) 類藥物是源自於十字花科的硫代葡萄糖苷 (glucosinolates) 經 myrosinase 水解之產物，被證實具有抗菌效果 [13]。此類植源性代謝產物包含 benzyl isothiocyanate (BITC)、phenyl ethyl isothiocyanate (PEITC) 以及 indole-3-carbinol (I3C) 等 [13-16]。因為多數抗菌藥物的低滲透能力常導致無法有效穿過細菌所分泌之胞外多醣，研究顯示 ITCs 類藥物能較有效的通過胞外多醣，因 ITCs 類藥物具有 $-N=C=S$ 基團可藉由結合細菌細胞膜外部蛋白後滲透至細菌細胞質中，對於細菌細胞膜的電位和疏水性造成干擾，使細胞膜結構不穩；也有報告指出 ITCs 可以形成活性的硫氰酸酯自由基 (reactive thiocyanate radicals) 對細菌的蛋白質合成等進行修飾，進而達到抗菌作用 [14, 15]。

有研究提出使用 ITCs 類藥物合併碳青黴烯類 (carbapenem) 後，其結果顯示對於非碳青黴烯類抗藥性之細菌具有有效之協同作用，顯示 ITCs 抗菌的機制可能與影響細菌外膜有關 [14]。因此我們希望本研究能探討此一抗菌機制在合併外膜通透劑後能夠增加對臨床抗藥菌株之抑制效果。

由於自然發生的細菌持久細胞數量稀少，目前實驗中的細菌持久細胞大多透過化學誘導進行，包括使用 CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) 或高劑量抗生素 (≤ 10 倍 MIC) 進行誘導，亦可透過抑制細菌的代謝活性使 ATP 合成下降、或是透過將細菌處於營養限制 (nutrient starvation) 的環境而被誘導成細菌持久細胞 [17, 18]。

在本研究中我們計畫評估上述天然抗菌藥物對細菌持久細胞是否具有抑制作用，並評估 ITCs 與外膜通透劑之合併，是否能提高 ITCs 藥物的抗菌效果。

材料方法

一、實驗菌株與藥物製備

本次所使用菌株是綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*) 標準菌株 ATCC 27853。菌株接種於 3 mL LB 培養液 (Difco™ LB broth; BD CO., USA) 於 37°C 隔夜培養。BITC、I3C、PEITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) 以 95% 酒精配置成 1 M 之 stock solution；

EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) 配置成 500 mM pH8.0 之 stock solution，所有試劑都保存於 4°C。

二、化學誘導細菌持久細胞 (bacterial persisters) 產生

將 *P. aeruginosa* 菌株培養於 LB 培養液中 37°C，18 小時後，各別加入 100 µg/mL 及 200 µg/mL 之 CCCP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA) 培養 3 小時，然後以 1700 g，10 min 離心取 950 µL 上清液加入等量 normal saline 進行洗滌。將菌液濃度調整至 1×10^6 CFU/mL，再加入 ciprofloxacin (最終濃度 2.5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA)，培養於 37°C，3 小時後，以 1700 g，10 min 離心移除上清液，清除未形成細菌持久細胞的 *P. aeruginosa*；再以 normal saline 洗滌一次 (1700 g, 10 min)，接著進行平板計數 (Viable plate count)，計算出細菌持久細胞菌落數 (CFU/mL)。

三、以最低抑菌濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC)

試驗比較 *P. aeruginosa* 及其細菌持久細胞之藥物感受性

將 *P. aeruginosa* 及其細菌持久細胞之菌株接種於 3 mL LB 培養液中，培養 37°C，18 小時，而後調整菌液濃度至 1×10^6 CFU/mL，ITCs 類藥物則進行兩倍連續稀釋至最終實驗濃度範圍 (1/8-2 × MIC BITC, I3C)。聚苯乙烯 (Polystyrene) 之 96 孔平

底盤 (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™ 96-Well)，以 LB 培養液作為陰性對照組，加入不同濃度之 ITCs 類藥物和 LB 培養液作為空白對照，而實驗組則加入 10 µL ITCs 類藥物及 10 µL 菌液 (1×10^6 CFU/mL) 共同培養 37°C，24 小時，培養結束後使用 ELISA reader (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader；BioTek，USA) 波長 595 nm 進行吸光值 (optical density；O.D 值) 測量。

四、存活數 (survival number)

將經 CCCP 化學誘導之細菌持久細胞分別以單獨 ITCs 藥物 (濃度 1/8-1/2 MIC BITC, I3C) 或與 EDTA 合併 (濃度 1/8-1/2 MIC BITC+EDTA, I3C + EDTA)，添加或無鎂離子 (Mg^{2+} , 10 mM) 之條件下，培養 37°C，1 小時後，以轉速 1700 g，離心 10 min 移除上清液，再以 normal saline 洗滌一次 (1700 g, 10 min)，取 200 µL 菌液進行平板計數，分析細菌存活數狀態。

五、生物膜合成試驗 (biofilm formation assay)

將 *P. aeruginosa* ATCC27853 分別以單獨 ITCs 藥物 (1/4 MIC) 或與 EDTA (1/4 MIC) 合併培養 24 小時後，以結晶紫 (crystal violet) 染色法定量生物膜含量，分析 ITCs 單獨或合併 EDTA 後對生物膜的合成活性影響 [19]。

六、生長抑制試驗 (growth inhibition assay)

將菌液調整為最終濃度 1×10^5 CFU/mL 培養於 LB 培養液，並加入單獨 ITCs 藥物 (1/8-1/2 MIC BITC, I3C) 或與 EDTA 合併 (1/8-1/2 MIC BITC+EDTA, I3C+EDTA)，分別於 37 °C 培養 0、2、4、6、8、24 小時後，以波長 600 nm 測量其 OD 值進行生長抑制分析。

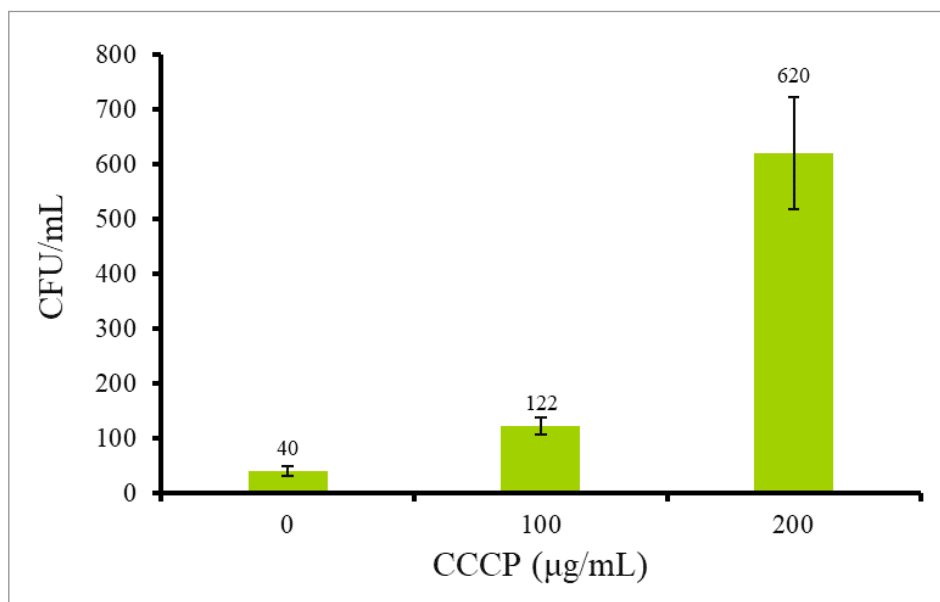
七、統計分析

實驗結果是以學生 T 檢定 (student's T-test) 進行平均值的比較， $p < 0.05$ 代表結果具有顯著差異。

結果

一、評估不同濃度 CCCP 誘導細菌持久細胞之效果

為了測定 CCCP 誘導細菌持久細胞的較佳條件，我們以不同濃度 (100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) CCCP 進行培養 3 小時，並測定誘導成功之細菌持久細胞，圖一實驗結果顯示，與對照組 (未處理 CCCP) 相比，在 CCCP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 誘導之 *P. aeruginosa* 細菌持久細胞數量為 122 CFU/mL，其已呈現有意義的增加 ($p = 0.0032$)；而提高 CCCP 濃度至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 誘導後的細菌持久細胞則增加至 620 CFU/mL ($p = 0.0031$)；與 CCCP (100



圖一 定量 CCCP 誘導產生的 *P. aeruginosa* 細菌持久細胞

說明：將隔夜培養之 *P. aeruginosa* 菌液以不同濃度 CCCP (0, 100 與 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 培養，經過 3 小時後加入 ciprofloxacin (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 去除未形成細菌持久細胞的 *P. aeruginosa*，並以平板計數法進行細菌持久細胞計數。* $P < 0.05$

µg/mL) 誘導後的細菌持久細胞做比較，CCCP (200 µg/mL) 之濃度所誘導的細菌持久細胞，明顯增加約五倍 ($p = 0.0034$)，為取得最大的細菌持久細胞進行後續分析實驗，爾後皆以 CCCP (200 µg/mL) 進行誘導反應。

二、藥物敏感性試驗

為排除 ciprofloxacin 無法清除之細菌是 *P. aeruginosa* 所產生之突變株產生藥物之抗性，我們比較 CCCP 誘導前、後之 *P. aeruginosa* 對幾種抗菌藥物之感受性。表一結果顯示 CCCP 誘導前的 *P. aeruginosa* 對 BITC、I3C、PEITC 以及 EDTA 的 MIC 結果分別為 25、6.25、50 以及 25 mM；CCCP (200 µg/mL) 誘導後 BITC、I3C、PEITC 以及 EDTA 的 MIC 結果為 12.5、12.5、50 以及 25 mM。可以發現使用 CCCP 處理後形成的細菌持久細胞與未經 CCCP 誘導之對照組的 MIC 屬於檢測值 2 倍差異的可接受範圍 [20]，證實 ciprofloxacin 無法清除之細菌是細菌持久細胞，並非

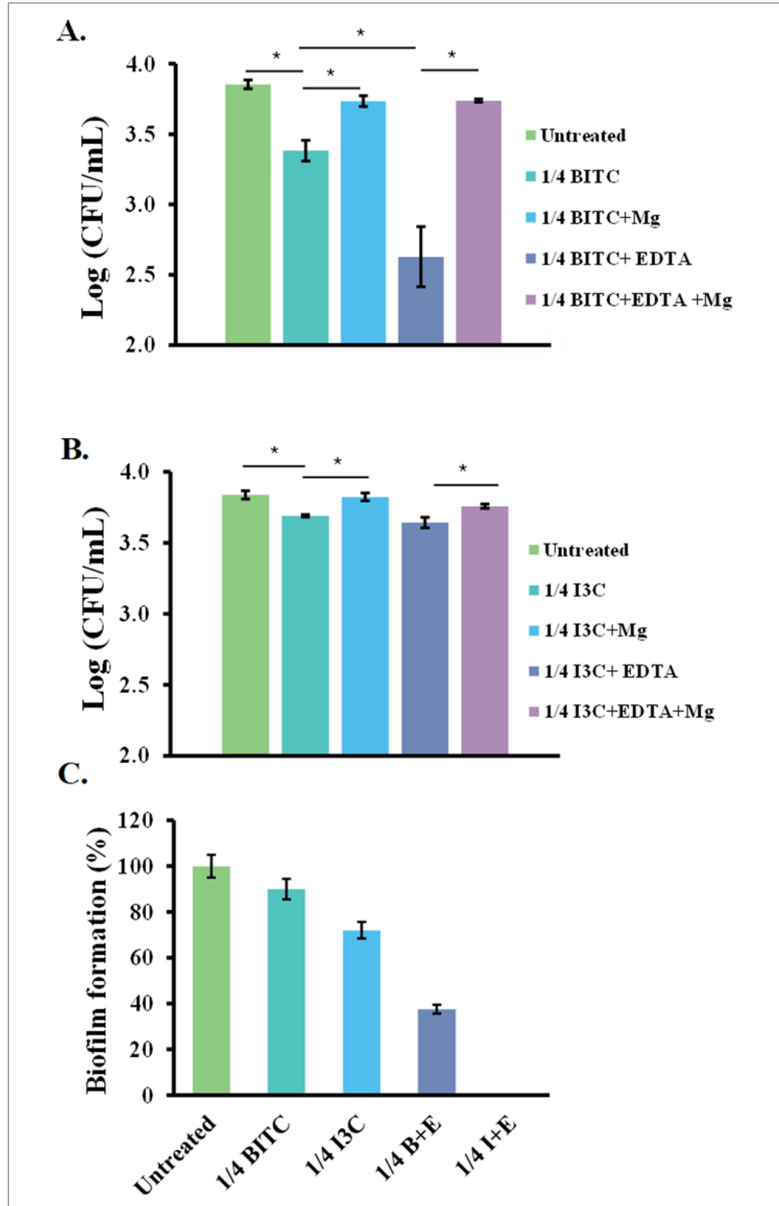
為細菌抗藥基因突變的影響而提高對 ciprofloxacin 的抗藥性。

三、單獨使用 ITCs 以及與 EDTA 合併對 *P. aeruginosa* 存活數以及細菌持久細胞存活數之評估與生物膜合成抑制分析

我們進一步探討，並證實 BITC、I3C 都具有毒殺細菌與抑制生物膜的能力 (圖二)，此抗菌作用在合併 EDTA，可以顯著增加 BITC 與 I3C 的殺菌作用，尤其是 BITC 的清除作用更可以提高一個指數左右 ($p = 0.104$)，並且 ITCs 合併 EDTA 後在生物膜合成上有看到顯著的抑制。為進一步探討 BITC 與 I3C 之抗菌作用是否與改變外膜通透性有關，我們以添加 Mg^{2+} 來提高外膜的穩定性 [21, 22]，進行細菌存活率分析，結果顯示，添加 Mg^{2+} 後，包括 BITC、I3C、BITC+EDTA 以及 I3C+EDTA 處理之細菌存活數的提高均具意義性 (p 值分別是 0.005, $p = 0.008$, $p = 0.08$ 與 $p = 0.034$) (圖二)，顯示上述藥物

表一 *P. aeruginosa* 及其細菌持久細胞對於測試藥物之最低抑菌濃度 (MIC)

ITCs (mM)	CCCP	
	Before CCCP-treated	After CCCP-treated (Bacterial persisters)
BITC	25	12.5 (2)
I3C	6.25	12.5 (2)
PEITC	50	50 (1)
EDTA	25	25 (1)



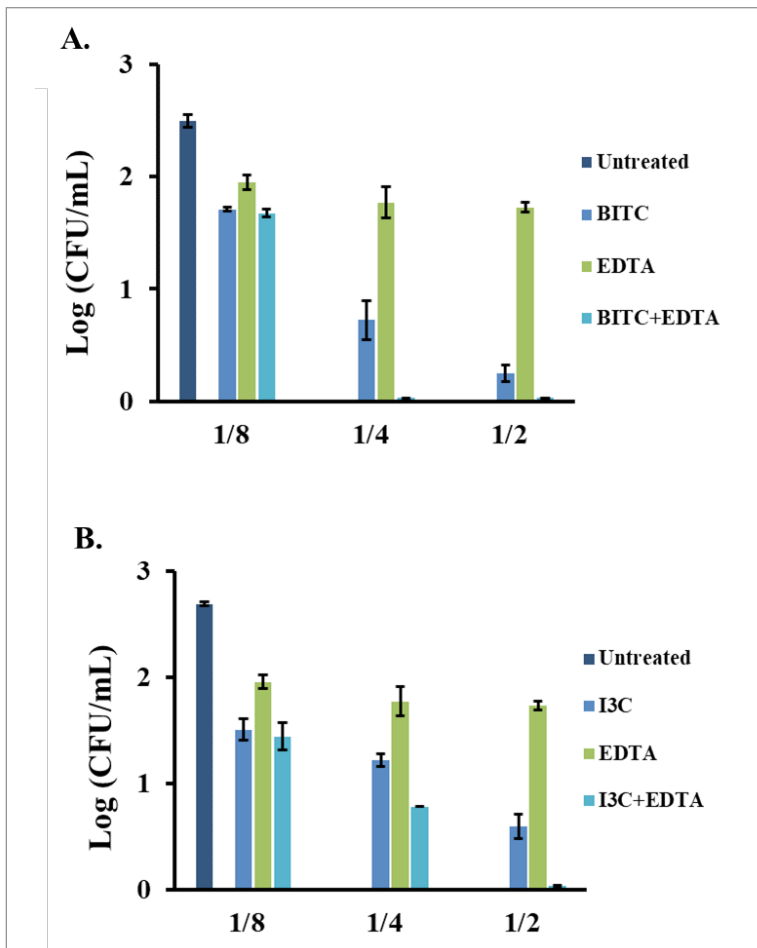
圖二 BITC 與 I3C 對 *P. aeruginosa* 之存活數分析與生物膜生長抑制

說明：(A) 分別以單獨 1/4 MIC BITC、1/4 MIC BITC 合併 EDTA 以及 1/4 MIC BITC 合併 EDTA 加 Mg^{2+} 作實驗組，未誘導成細菌持久細胞之 *P. aeruginosa* 為對照組。(B) 分別以單獨 1/4 MIC I3C、1/4 MIC I3C 合併 EDTA 以及 1/4 MIC I3C 合併 EDTA 加 Mg^{2+} 作實驗組，未誘導成細菌持久細胞之 *P. aeruginosa* 為對照組，結果以 Log (CFU/mL) 顯示。(C) 分別以單獨 1/4 MIC BITC、1/4 MIC BITC 合併 EDTA、1/4 MIC I3C 以及 1/4 MIC I3C 合併 EDTA 處理作為實驗組，未處理 *P. aeruginosa* ATCC 27853 作為對照組，並以結晶紫染色觀察生物膜生長抑制狀態。* 表示 $p < 0.05$ 。

以及合併策略的抑菌作用有關，透過 Mg^{2+} 穩定細菌外膜對於細菌的存活具有一定影響。

由於細菌持久細胞是細菌產生抗藥性的重要機制之一，我們進一步探討天然 ITCs 藥物 (BITC, I3C) 對細菌持久細胞之殺菌效果，並分析 EDTA 是否可以加強其殺菌效果。由結果可得知，單獨使用 1/2-1/4 MIC ITCs 對

於細菌持久細胞具有良好殺菌作用 (圖三)，雖然 EDTA 對細菌存活數無顯著影響。當與 ITCs 藥物 (BITC, I3C) 合併，都具有顯著加強對細菌持久細胞之殺菌作用 (圖三 B)。甚至可以使 BITC 次抑菌濃度 (sub-MIC; 1/2-1/4MIC) 對細菌持久細胞之殺菌作用降低至實驗方法之偵測極限以下 (圖三 A)。



圖三 BITC 與 I3C 對 *P. aeruginosa* 細菌持久細胞存活數之影響

說明：CCCP 誘導之細菌持久細胞以 (A) BITC (1/8-1/2 MIC) 或 BITC+EDTA (1/8-1/2 MIC)，或與 (B) I3C (1/8-1/2 MIC) 或 I3C+EDTA (1/8-1/2 MIC) 與於 37°C 培養反應，2 小時後經過 PBS 緩衝液洗滌兩次以移除藥物後，以平板計數法定量，結果以 log (CFU/mL) 顯示。

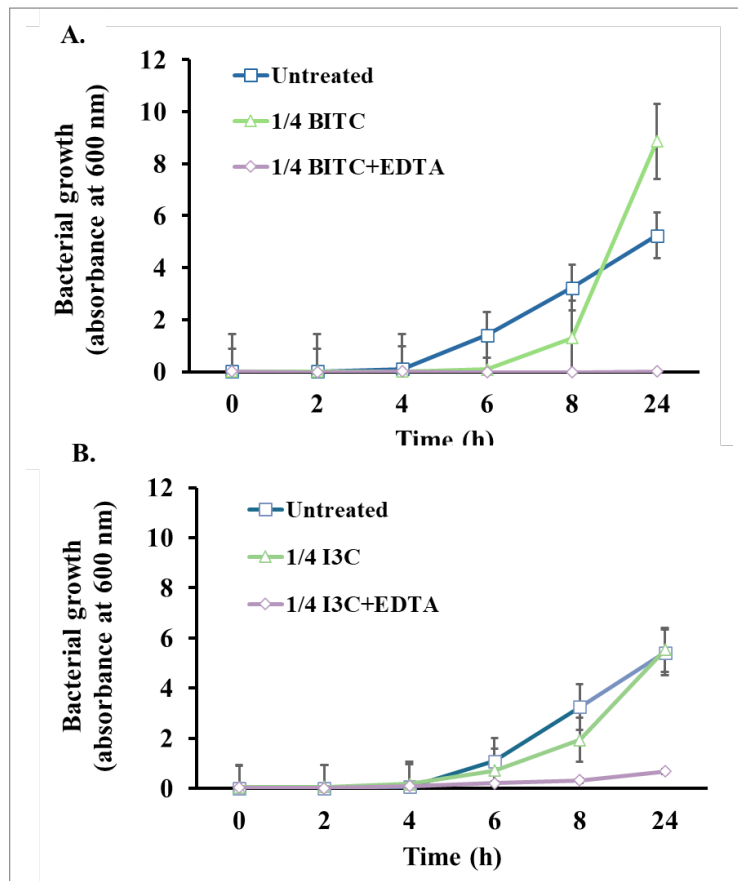
四、生長抑制實驗

為進一步評估在單獨使用 BITC 以及 I3C 及合併 EDTA 之條件下 *P. aeruginosa* 的生長能力的變化，我們進行細菌的懸浮生長動力學 (growth kinetic analysis) 分析其抑制作用。結果顯示 sub-MIC (1/4 MIC) BITC 以及 I3C 在培養 0-4 小時期間均具生長抑制能力，之後細菌即開始出現增殖現象 (圖四)，sub-MIC BITC 以及 I3C

與 EDTA 合併的結果顯示 BITC 以及 I3C 對細菌之生長抑制作用明顯提高，我們觀察到至 24 小時的結果顯示 *P. aeruginosa* 細菌皆未有明顯進一步增殖之現象。

討 論

在臨床 *P. aeruginosa* 感染多是因為住院病人使用侵入性醫療器械導



圖四 BITC 與 I3C 對 *P. aeruginosa* 之生長抑制作用

說明：細菌懸浮液以 (A) BITC (1/4 MIC) 或 BITC+EDTA (1/4 MIC) 或與 (B) I3C (1/4 MIC) 或 I3C+EDTA (1/4 MIC) 於 37°C 培養，分別於指定之間隔時間測定波長 600nm 之吸光值，結果以平均吸光值 ± 標準差顯示。

致。根據統計發現罹患囊性纖維化 (cystic fibrosis) 之病人在醫療照護相關感染 *P. aeruginosa* 的比例會隨病人年紀增長由 30% 增加至 70% [23]。而 *P. aeruginosa* 治療困難的原因與生物膜 (biofilm) 及細菌持久細胞的形成，使其對於抗生素的耐受提高有關 [24]。在產生抗藥的過程中，因細菌持久細胞有利於細菌突變而產生抗藥性，亦會導致臨床治療困難度增加 [25, 26]。

在抗菌藥物存在下，細菌可透過基因突變產生抗藥性或形成生物膜結構以提高其生存之機會 [7, 27]。此外仍有少部分細菌可透過形成細菌持久細胞，使其在高劑量抗生素存在下得以存活，並待藥物治療結束後，從高濃度藥物耐受性之細菌持久細胞再度轉換為對藥物具感受性之細菌 [7]。我們嘗試以化學誘導方式，探討抗菌藥物對細菌持久細胞的清除作用，結果顯示 CCCP 誘導前的 *P. aeruginosa* 對 BITC、I3C、PEITC 以及 EDTA 的 MIC 結果與使用 CCCP 處理後形成的細菌持久細胞的 MIC 並無明顯差異 (表一)，其中排除細菌持久細胞是因為抗藥基因突變的影響導致抗生素無法清除的假設。

目前許多研究致力於尋找具有抗菌活性之天然化合物，以減少後線抗生素使用。我們的研究顯示 BITC 與 I3C 都具有良好的抗菌活性 (表一)，而且也具有清除化學誘導之細菌持久細胞效果 (圖三)。由於高劑

量藥物使用對於人體造成健康上的負荷，為降低抗菌藥物使用劑量以及增加抗生素殺菌效果，目前已有學者建議合併抗菌藥物的策略 [28]。例如對於黏菌素 (colistin) 具抗藥性之革蘭氏陰性菌在 otilonium bromide (Ob) 合併 colistin 使用時，具有協同抗菌效果 (synergy)，可以有效降低 colistin 之 MIC 濃度至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，根據 CLSI 2020 年對於 colistin 藥敏試驗規範，Ob 合併 colistin 使用可有效的恢復具抗藥性革蘭氏陰性菌對 colistin 之感受性 [29]。革蘭氏陰性菌細胞壁外膜穩定性與二價陽離子有關 [9]，而 EDTA 具有螯合二價陽離子作用，可造成外膜結構被破壞，使脂多醣體釋出，導致疏水性藥物分子更容易通透 [9]，我們推測 EDTA 有效的提高天然 ITCs 藥物 BITC 以及 I3C 進入細胞質的作用。由於過去文獻顯示 Mg^{2+} 具有穩定細菌外膜的作用，我們發現外加 Mg^{2+} 後，細菌存活數可得到回復 (圖二)，可以推測 EDTA 提高天然 ITCs 的抗菌作用是與提高外膜的通透性有關。在生長抑制試驗 (growth inhibition assay) 的結果顯示，在單獨使用 sub-MIC 之 BITC 或 I3C 後，細菌的生長於 4-6 小時呈現被抑制之狀態，但在 24 小時後細菌恢復增殖能力，顯示細菌具有適應 BITC 或 I3C 能力，我們推測細菌可能透過逆境反應產生適應性 (adaptation)，或是長時間培養過程中發生變異進而恢復生長狀態。但若與 sub-MIC

之 EDTA 合併培養，至 24 小時後細菌生長狀態仍呈現被抑制狀態（圖四），顯示與 EDTA 之合併使用可以更有效抑制細菌生長，並且根據我們的實驗結果顯示，I3C 與 BITC 合併 EDTA 後可顯著抑制生物膜的合成。

I3C 目前抗菌機制仍不明確，根據文獻指出 I3C 針對革蘭氏陰性菌主要透過影響脂多醣體造成外膜通透性提高來達到抑菌效果 [16]，但與單獨 I3C 相比，加入 Mg^{2+} 後存活數僅有部分細菌存活數回升（圖 3B），我們推測 I3C 對於 *P. aeruginosa* 細菌持久細胞的主要抗菌機制可能並非全然與細菌外膜通透性有關，目前其他研究顯示 I3C 可能透過誘導產生活性氧物質 (reactive oxygen species; ROS) 的方式來達到抑制作用 [30]，但經由我們的實驗證實加入維生素 C 後，並未影響細菌的藥物感受性，因此 I3C 對於 *P. aeruginosa* 的抗菌機制仍待釐清。

誌 謝

本研究計畫感謝科技部 110 年度與 111 年度專題研究計畫（110-2637-B-242-004 和 111-2637-B-242-001）和高雄榮民總醫院（KSVGH 110-022 和 KSVGH 111-045）的經費補助。

參考文獻

1. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al:

- Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268-81.
2. Brauner A, Fridman O, Gefen O, et al: Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:320-30.
3. Munita JM, Arias CA, et al: Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4:10
4. Kunz Coyne AJ, El Ghali A, Holger D, et al: Therapeutic strategies for emerging multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther* 2022; 11: 661-82.
5. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:453-64.
6. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, et al: Antibiotic resistance and persistence-implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep.* 2020;21:e51034.
7. Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ: Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe* 2013;13:632-42.
8. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, et al: Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 2011;334:982-6.
9. Alakomi HL, Paananen A, Suihko ML, et al: Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:4695-703.
10. Nikaido H: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:593-656.
11. Sanchez-Carbonel A, Mondragón B, López-Chegne N, et al: The effect of the efflux pump inhibitor Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone (CCCP) on the susceptibility to imipenem and cefepime in clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2021;16:e0259915.
12. Carrillo C, Teruel JA, Aranda FJ, et al: Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1611:91-7.
13. Romeo L, Iori R, Rollin P, et al: Isothiocyanates: An overview of their antimicrobial activity against human infections. *Molecules* 2018;23:624.
14. Kaiser SJ, Mutters NT, Blessing B, et al: Natural isothiocyanates express antimicrobial activity against

- developing and mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fitoterapia* 2017;119:57-63
15. Borges A, Abreu AC, Ferreira C, et al: Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens. *J Food Sci Technol* 2015;52:4737-48
 16. Sung WS, Lee DG: Mechanism of decreased susceptibility for Gram-negative bacteria and synergistic effect with ampicillin of indole-3-carbinol. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1798-801.
 17. Zhang W, Yamasaki R, Song S, et al: Interkingdom signal indole inhibits *Pseudomonas aeruginosa* persister cell waking. *J Appl Microbiol* 2019;127: 1768-75.
 18. Narayanaswamy VP, Keagy LL, Duris K, et al: Novel glycopolymer eradicates antibiotic- and CCCP-induced persister cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2018;9:1724.
 19. O'Toole GA: Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* 2011;47:2437.
 20. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, et al: CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 2018;56: e01934-17.
 21. Hancock RE, Wong PG: Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:48-52.
 22. Clifton LA, Skoda MW, Le Brun AP, et al: Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir* 2015;31:404-12.
 23. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH: *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:39.
 24. Amato SM, Fazen CH, Henry TC, et al: The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol* 2014;5:70.
 25. Defraigne V, Fauvart M, Michiels J: Fighting bacterial persistence: Current and emerging anti-persister strategies and therapeutics. *Drug Resist Updat* 2018; 38:12-26.
 26. Van den Bergh B, Fauvart M, Michiels J: Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:219-51.
 27. Rather MA, Gupta K, Mandal M: Microbial biofilm: Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz J Microbiol* 2021;52:1701-18.
 28. Dufour V, Stahl M, Baysse C: The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology* 2015; 161:229-43.
 29. Tängdén T: Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Ups J Med Sci* 2014;119:149-53.
 30. Xu C, Liu C, Chen K, et al: Otilonium bromide boosts antimicrobial activities of colistin against Gram-negative pathogens and their persisters. *Commun Biol*, 2022;5(1):p.613.

Evaluation of the Combined Application of Isothiocyanates and Chelating Agents for Eliminating Chemically Induced Bacterial Persisters

Tso-Ping Wang¹, Chia-Chi Cheng³, Cian-Huei Yan³, Shin-Jung Lee², Horng-Ren Lo³

¹Department of Pathology and Laboratory Medicine, ²Division of Infectious Diseases,

Department of Internal Medicine, Kaohsiung Veterans General Hospital;

³Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Fooyin University

Infections caused by multidrug-resistant (MDR) bacteria pose a significant threat to public health. Bacterial persisters, which exhibit reduced metabolic activity and heightened resistance to antibiotics while being genetically identical to the rest of the bacterial population, are a distinct phenotype. These persistent bacteria play a crucial role in the recurrence of chronic infections. The study aimed to evaluate the combined effectiveness of EDTA and ITCs in combating bacterial persisters and preventing bacterial biofilm formation. EDTA acts as a chelating agent that enhances the permeability of the bacterial outer membrane, while ITCs are natural antibacterial molecules known to inhibit the growth of various pathogens. Bacterial persisters were enriched using a chemical-induced method involving exposure to Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). The susceptibility of bacteria to antimicrobial agents was determined through minimal inhibitory concentration (MIC) testing. The survival of bacterial persisters was evaluated by exposing them to sub-MIC levels of ITCs with or without EDTA. The number of persistent cells of *Pseudomonas aeruginosa* strain induced by CCCP was 100 times higher than that of untreated bacteria. There was no obvious difference in MIC values of antimicrobial compounds between CCCP-treated and untreated bacteria. However, the combined use of sub-MIC levels of benzyl isothiocyanate (BITC) or indole-3-carbinol (I3C) with EDTA led to a substantial reduction in the survival of persistent cells in a dose- and time-dependent manner. These findings suggest that the combined application of ITCs and EDTA effectively eliminated CCCP-induced bacterial persisters, offering a

promising strategy to combat these persisters and potentially prevent the recurrence of bacterial infections.

Key words: Multidrug resistant bacteria, isothiocyanates (ITCs), *Pseudomonas aeruginosa*, outer membrane, bacterial persisters