

异硫氰酸荧光素在荧光标记领域的应用

张雪梅¹, 胡志宇²

(1. 昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214; 2. 昆明市中医医院 科教科, 云南 昆明 650031)

摘要: 异硫氰酸荧光素是近年来在荧光标记技术领域应用最广泛的荧光标记物, 借助于荧光显微镜、流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜等荧光检测技术和仪器, 可将其用于蛋白质、核酸、多糖、小分子药物及纳米粒、微球等靶向制剂的荧光标记及活性示踪。因此, 阐述了近 5 a 来异硫氰酸荧光素在荧光标记领域的应用进展, 并对其研究趋势和应用前景进行展望。

关键词: 异硫氰酸酯荧光素; 荧光标记; 示踪; 检测

中图分类号: R318.51; O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2015)06-0056-04

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2015.06.013

Application of Fluorescein Isothiocyanate in the Field of Fluorescent Labeling

ZHANG Xue-mei¹, HU Zhi-yu²

(1. Medical College, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China;

2. Department of Science and Education, Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yunnan Kunming 650031, China)

Abstract: Fluorescein isothiocyanate (FITC) is most widely used in the field of fluorescence labeling technology in recent years. With the help of Fluorescence microscope, flow cytometry, laser scanning confocal microscopy, it can be used in fluorescence labeling and activity tracer for protein, nucleic acid, polysaccharides, small molecule drugs and targeting agents such as nanoparticles, microspheres. So the application progress of the fluorescein isothiocyanate in recent five years in the field of fluorescent labeling technology is set forth and its research trends and application prospects are forecasted.

Key words: fluorescein isothiocyanate; fluorescence labeling; drug tracer; detection

异硫氰酸荧光素 (Flourescein isothiocyanate, FITC) 是一种在细胞生物学、免疫学、药物研究领域广泛应用的荧光素类标记物。FITC 是在荧光素的结构上引入异硫氰基 ($-N=C=S$) 得到的, 异硫氰基通过与被标记物如蛋白质的伯胺基团反应形成硫脲键, 成为牢固的荧光染料—蛋白质结合物, 从而实现目标分子的荧光标记。FITC 最大发射波长为 520 ~ 530 nm, 最大吸收波长为 490 ~ 495 nm, 在碱性溶液中具有强烈的黄绿色荧光, 加酸后沉淀析出, 荧光消失。FITC 性质稳定、荧光量子产率高、无毒、成本低, 对所处微环境的变化很灵敏, 适合作为探针分子。与抗体、蛋白质类结合可用于定性、定量检测, 与糖类结合则可用于糖类在体内的代谢研究, 亦可用于标示药物载体、聚合物微粒进行药物靶向性及示

踪研究。本文对近 5 a 来 FITC 在药物分析领域的应用进行综述, 主要侧重于天然药物及中药活性成分, 以期对中药研究提供一种参考方法。

1 FITC 在荧光标记领域的应用

1.1 用于蛋白质类药物的示踪研究

FITC 是用于标记生物相关蛋白质分子最广泛的一个荧光探针。通过与不同抗体结合后, 广泛用于治疗性抗体如 TCR (T 细胞抗原受体, T cell receptor) 的研究^[1], 也可与蛋白质类成分结合后观察其组织和细胞行为, Celine Hoffmann 等^[2] 用 FITC 标记人血浆纤维连接蛋白 (FN), 用 FITC/Fn 不同控释比为评价指标, 观察 FN 的组织和细胞行为。周新阳等^[3] 用 20 mg 天花粉蛋白与 0.4 mg FITC 反应制备

收稿日期: 2015-06-18

作者简介: 张雪梅 (1977—), 女, 云南昆明人, 讲师, 主要从事天然产物开发研究。

得到 FITC-天花粉蛋白标记物,通过观察天花粉蛋白进入黑色素瘤 B16 细胞的动态过程,发现孵育 6 h 时 FITC-天花粉蛋白对细胞 DNA 没有明显的损伤作用;而孵育 12 h 时对黑色素瘤 B16 细胞产生明显的细胞毒作用和凋亡. 张倩等^[4]制备了 FITC 与鹿茸蛋白混合物(PE)的荧光标记复合物 FITC-PE,观察到该标记蛋白在消化道中荧光强度及蛋白含量均会削减,但蛋白主要成分保持不变,相对分子质量小于 45 kD 的蛋白可以透过肠壁吸收入血.

双标记流式细胞术检测细胞凋亡是 FITC 的一项成熟应用. 用 FITC 标记磷脂结合蛋白 V (Annexin V), 再与 PI (碘化丙啶) 匹配使用, 可检测细胞凋亡, 称为 Annexin V-FITC/PI 双染色法. 国内研究者也利用该法观察到许多天然活性成分对不同细胞的凋亡作用. 饶远权等^[5]发现人参皂苷 Rg3 对肺腺癌 NCI-H1650 细胞增殖具有明显的抑制作用, 且呈时间剂量依赖关系. 李晓冬等^[6]检测到质量浓度为 150, 200 mg/L 的银杏叶提取物可诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡. 郭立达等^[7]发现姜黄素能显著抑制人结肠癌 LoVo 细胞的增殖并促进其凋亡. 申淑珍等^[8]观察丹参酮 II A 联合三氧化二砷 (ATO) 对人急性早幼粒细胞白血病细胞株 (NB4 细胞) 凋亡的作用.

1.2 多糖类成分的示踪及体内代谢研究

多糖由于自身缺少发色基团和荧光基团, 因此不能直接用紫外或荧光法进行检测. 而利用化学修饰将 FITC 连接到多糖分子上, 则可准确、灵敏的标记多糖, 该方法是研究多糖在体内分布、降解和吸收的一种重要方法.

胡锦涛等^[9]发现 FITC 荧光标记的壳聚糖 (脱乙酰度为 90%, 相对分子质量为 500 kD) 给小鼠灌胃后在血清中质量浓度非常低, 主要分布于肾脏, 多数以原形经粪便排泄, 部分分解的壳聚糖经尿液排泄. 王月慧等^[10]采用 FITC 标记 3 种相对分子质量 (3, 300 ~ 400, 700 kD) 的壳聚糖, 体外检测标记物的抑菌活性, 发现标记后的壳聚糖依然具有抑菌活性, 但因 FITC 标记时占据了壳聚糖的抑菌活性基团氨基, 使抑菌活性减弱. 陈忱等^[11]通过 FITC 与枸杞多糖的共价偶联, 成功对枸杞多糖进行荧光标记, 荧光取代度为 1.3%, 24 h 体外稳定性良好, 为研究枸杞多糖的代谢动力学提供了良好的荧光探针. 谢华通^[12]等采用凝胶色谱法观察 FITC 标记的麦冬多糖 (MDG-1) 在大鼠胃肠道内的含量变化, 结果表明,

MDG-1 在胃内不分解, 其主要代谢部位在肠道, 原因可能是肠道内环境及细菌共同作用的结果.

李福川等^[13]利用多糖具有的还原性末端, 通过对其半缩醛基的还原氨化反应先与酪胺 (Tyr) 共价偶联, 引入仲氨基, 再与 FITC 进行亲核反应, 完成对多糖的标记, 实现了对海洋多糖 911 的选择性荧光标记. 标记后的多糖抗凝活性无明显影响, 也无明显的细胞毒性. 康迪等^[14]也应用这一方法制备得到纯度达 99% 的 FITC-海胆黄多糖 (SEP) 荧光标记物, 并通过大鼠尾静脉注射后探索其血浆代谢情况. 对于具有还原末端多糖及寡糖, 这一标记方法通用型较强, 且在虫草多糖^[15]、小刺猴头菌多糖^[16]、树舌灵芝多糖^[17]、黄芪多糖^[18]等多糖荧光标记物制备的体内代谢研究均有应用.

1.3 药物载体的示踪研究

由于传统的药物载体不具备可观察性和可追踪性, 造成载体检测比较困难, 而将荧光纳米探针应用于药物载体可使该问题得到解决. 采用 FITC 对载体颗粒进行修饰, 制备复合荧光颗粒, 依靠标准仪器检测, 可高灵敏、高选择性地监测活细胞中的活性物质, 现已在标记、示踪、检测等领域广泛应用.

杨丽等^[19]用 FITC 共价结合醋酸淀粉, 制备得到一个荧光性质稳定、具有生物可降解性的淀粉荧光纳米微粒. 柳琳等^[20]制备的 FITC 标记的亲水性多肽类药物神经毒素自组装核壳型纳米粒 (NT-SAN) 经鼻黏膜给药后, 有助于提高 NT 的脑内浓度及生物利用度, 为研究适宜蛋白质多肽类等大分子药物经鼻黏膜给药的脑靶向新剂型提供了参考. 冯丽娜等^[21]制备了纳米药物载体 PAMAM-Ac-FITC-LCTP, 并将该载体与阿霉素连接, 经体内外实验观察到其对非小细胞肺癌 NCI-H460 具有良好的靶向性和缓释作用. 刘鉴峰等^[22]制备的多肽介导的肿瘤靶向药物载体 (G4-FITC-SP5-52) 在体外展示出良好的肿瘤靶向性. 高仕杰等^[23]用 FITC 标记的 TAT-PEG-阳离子脂质体, 具备跨膜、长循环及荧光示踪功能, 经尾静脉将其注入大鼠体内, 可清晰显示标记物在 MCF-7 细胞内外的情况.

FITC 标记复合物还可作为荧光分子探针, 用于外用药物传递系统研究. Heui Kyoung Cho 等^[24]用 FITC 标记聚氧化乙烯-聚 ϵ -己内酯-聚氧化乙烯共聚物 (PEO-PCL-PEO), 比较了未标记和标记后的共聚物在临界胶束浓度 (CMC)、紫外吸收、荧光性能、

结晶等性质的差异,发现低 HLB 值的荧光标记物能克服角质层的屏障作用,渗入无毛小鼠肌肤深层。

2 FITC 应用中存在的问题及其局限性

FITC 荧光标记的原理是利用异硫氰基与氨基形成共价结合,对于结构中无氨基的物质需要先衍生反应后再标记,如无氨基的多糖需要先与酪胺偶联产生氨基后再与 FITC 反应^[13]。由于紫杉醇亦无法直接标记,单玲玲等^[25]则使用谷氨酸作为 linker,先合成谷氨酸-紫杉醇复合物,再与 FITC 反应,最终得到紫杉醇-谷氨酸-FITC 复合物。因此,针对多数未具备氨基的化合物,选择何种载体或方法成功标记则有待进一步研究和探索。

另外 FITC 在光照下易发生猝灭,影响捕捉荧光图像,有时需要和抗猝灭剂一起使用。在穿透机体时 FITC 发射的黄绿色荧光会有部分被机体吸收,导致荧光强度降低。同时实验动物如裸鼠表皮及血液自发荧光较强,会对 FITC 荧光产生比较严重的干扰,使得用 FITC 标记的物质在活体成像时不明显,需要取裸鼠主要脏器及肿瘤进行脏器显像,才能得到明显的荧光显像效果^[26],这在一定程度上影响了 FITC 在活体成像领域的应用。

3 研究趋势及展望

FITC 作为一种应用广泛的荧光标记试剂,在天然药物开发领域应用空间巨大。国内学者通过 FITC 标记叶酸衍生物^[26]、抗体药物 Rituximab^[27]后,利用小动物活体荧光成像技术追踪观察其在荷瘤裸鼠主要脏器和肿瘤中的分布和代谢情况,能够准确地监测 FITC 标记物的动态分布情况,对分析抗肿瘤药物靶向效果具有指导意义。

此外, FITC 标记药物也被应用到临床血清药物检测领域。王小明等^[28]用 FITC 抗体包被发光板,将 FITC-T3 类似物与抗 FITC 抗体间接结合形成固相抗原,用抗人三碘甲腺原氨酸(T3)类似物取代 T3 作为竞争抗原,探索了一种非均衡竞争化学发光免疫分析法,此方法精密度好、灵敏度高,检测临床标本与使用进口试剂测定结果相关性良好。目前已有睾酮(T)^[29]、总甲状腺素(TT4)^[30]、孕酮(P)^[31]、雌二醇^[32]、雌三醇类似物(E3)^[33]等药物建立了相似的检测方法。利用 FITC 寻找快速、价格低廉、适用于临床应用的检测方法,将是其应用发展的趋势之一。

异硫氰酸荧光素量子产率高,荧光寿命长,借助生物光子学的技术手段可动态的观测整个过程,并进行定量测量,是一种有效、安全、灵敏度高的检测方法,在药物成分示踪、活性物质的检测、药物代谢过程研究、作用机制探讨、药物制剂开发等方面都将会有更广阔的应用前景。

[参考文献]

- [1] TAKAIA H, KATOA A, NAKAMURAB T, et al. The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies[J]. *Acta Histochemica*, 2011, 113:472-476.
- [2] HOFFMANN C, LEROY-DUDAL J, PATEL S, et al. Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling[J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 372:62-71.
- [3] 周欣阳, 张天一, 顾君一. 异硫氰酸荧光素标记动态观察天花粉蛋白对黑色素瘤 B16 细胞的损伤[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(29):5792-5796.
- [4] 张倩, 胡剑江, 周秋丽, 等. 荧光标记鹿茸蛋白提取胃肠道吸收离体实验研究[J]. *药学报*, 2011, 46(12):1526-1529.
- [5] 饶远权, 刘杏娥, 王廷祥, 等. 人参皂苷 Rg3 抑制肺癌 NCI-H1650 细胞增殖作用研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2013, 19(6):413-416.
- [6] 李晓冬, 王宝, 王建芳, 等. 银杏叶提取物对 U251 胶质瘤细胞的促凋亡作用[J]. *当代医学*, 2013, 19(14):1-2.
- [7] 郭立达, 焦振霞, 宋瑛, 等. 姜黄素诱导结肠癌 LoVo 细胞凋亡的作用及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13):2191-2196.
- [8] 申淑珍, 白晓川, 马云. 丹参酮 II A 联合三氧化二砷对 NB4 细胞凋亡的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2014, 36(2):178-182.
- [9] 胡锦涛, 张家骊, 程沁园, 等. 壳聚糖在小鼠体内的组织分布与排泄研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(5):611-615.
- [10] 王月慧, 余雄伟, 徐远阳, 等. 壳聚糖抑菌作用位点的研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(13):92-95.
- [11] 陈忱, 蔡慧珍, 唐华丽, 等. 枸杞多糖的组成分析及其荧光标记研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(10):2312-2315.
- [12] 谢华通, 王硕, 阮克峰, 等. 凝胶色谱法测定麦冬多糖 MDG-1 在大鼠胃肠道含量变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(13):139-145.
- [13] 李福川, 耿美玉, 李英霞, 等. 海洋硫酸多糖 911 的荧光标记研究[J]. *高等学校化学学报*, 2002, 23(9):1704-1708.
- [14] 康迪, 滕再进, 柯梦云, 等. 荧光标记法测定大鼠血浆中海

- 胆黄多糖研究[J]. 药物生物技术, 2012, 19(4): 343-347.
- [15] 唐惠玲, 陈涛, 王莹, 等. 虫草多糖荧光标记的方法学研究[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 279-281.
- [16] 吴宗翰, 杨扬, 杜金, 等. 小刺猴头菌多糖的荧光标记及其稳定性[J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 82-84.
- [17] 苏玲, 李雨婷, 王再林, 等. 树舌荧光多糖的制备及其在人大肠癌细胞 SWWC1116 中的定位[J]. 吉林大学学报: 理学版, 2013, 51(1): 140-144.
- [18] 陈小云, 谭晓斌, 孙娥, 等. 黄芪多糖口服吸收促进剂的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1243-1247.
- [19] LI Y, TAN Y, NING Z G, et al. Design and fabrication of fluorescein-labeled starch-based nanospheres[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86: 291-295.
- [20] 柳琳, 赵燕敏, 李范珠, 等. 神经毒素自组装核壳型纳米粒大鼠鼻黏膜给药脑内药动学研究[J]. 中国药杂志, 2011, 46(3): 203-207.
- [21] 冯丽娜, 刘金剑, 褚丽萍, 等. 新型多肽聚酰胺-胺型靶向药物载体的载药性能及细胞吸收和毒性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(8): 1385-1388.
- [22] 刘鉴峰, 刘金剑, 王德芝, 等. 肿瘤靶向药物载体的肿瘤细胞靶向性研究[J]. 天津医药, 2013, 41(4): 296-299.
- [23] 高仕杰, 刘洋. 多功能阳离子脂质体跨血脊髓屏障的实验研究[J]. 中国医药指南, 2014, 12(34): 45-47.
- [24] CHO H K, LONE S, KIM D D, et al. Synthesis and characterization of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled PEO-PCL-PEO triblock copolymers for topical delivery [J]. Polymer, 2009, 50: 2357-2364.
- [25] 单玲玲, 高贵珍, 曹稳根, 等. 紫杉醇前药的合成及其对肿瘤细胞活性抑制的研究[J]. 宿州学院学报, 2013, 28(6): 56-58.
- [26] 谢江, 朱建华. FITC 标记的叶酸衍生物的合成及显像研究[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(7): 1532-1536.
- [27] 张胜华, 程昕, 钟根深, 等. 活体成像分析异硫氰酸荧光素标记 Rituximab 在荷淋巴瘤裸鼠体内的生物分布[J]. 中华医学杂志, 2010, 33(6): 2367-2370.
- [28] 王小明, 孔海霞, 雷鹏, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争三碘甲腺原氨酸化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(8): 899-903.
- [29] 陈茶, 孔海霞, 雷鹏, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争睾酮(T)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 668-670.
- [30] 陈蕾, 孔海霞, 刘萍, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争总甲状腺素(TT4)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 663-665.
- [31] 曾建明, 雷鹏, 孔海霞, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争孕酮(P)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1813-1817.
- [32] 陈茶, 孔海霞, 雷鹏, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争雌二醇(E2)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(6): 676-678.
- [33] 曾建明, 雷鹏, 孔海霞, 等. 应用 FITC 系统建立非均衡竞争游离雌三醇(E3)化学发光法[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1806-1808.

~~~~~  
(上接第 51 页)

- [8] 汪东风, 王常红. 稀土在茶树上应用研究进展[J]. 稀土, 1996, 17(4): 46-50.
- [9] ANONYMOUS. Chinese consumption continues to increase in 3 years[J]. China Rare Earth Information Center News, 2003, 9: 2-3.
- [10] 林荣溪, 陈磊, 谢承昌, 等. 福建乌龙茶稀土来源初探[J]. 中国茶叶, 2010(11): 10-11.
- [11] 陈磊, 林锻炼, 高志鹏, 等. 稀土元素在茶园土壤和乌龙茶中的分布特性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2011, 40(6): 595-601.
- [12] 王兴进, 陈巧, 林丽容, 等. 闽东茶区茶叶稀土残留量分析[J]. 亚热带农业研究, 2013, 9(2): 115-118.
- [13] 王峰, 曹福亮. 江苏绿茶中稀土元素的组成特征及分布模式[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2012, 36(4): 71-74.
- [14] 聂刚, 梁灵, 李忠宏, 等. 陕南茶叶稀土元素产地特征研究[J]. 中国稀土学报, 2014, 32(6): 758-763.
- [15] 向丽萍, 王奥, 罗视文, 等. 贵州绿茶中的稀土元素含量特征[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(1): 197-199.
- [16] 杨婉秋, 葛丹丹, 刘丹丹. 云南省保山市不同种类茶叶中轻稀土元素分析[J]. 昆明学院学报, 2015, 37(3): 25-29.
- [17] 林昕, 黎其万, 和丽忠, 等. 基于稀土元素指纹分析判别普洱古树茶和台地茶的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2921-2925.
- [18] 唐偲雨, 刘毅, 王晶, 等. 重庆地区茶叶矿质元素产地特性研究[J]. 食品科学, 2013, 34(2): 227-230.
- [19] 刘宏程, 林昕, 和丽钟, 等. 基于稀土元素含量的普洱茶产地识别研究[J]. 茶叶科学, 2014, 34(5): 451-457.
- [20] 冉登培. 贵州地区茶叶微量元素分析及稀土影响因素探究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.