制具有重要意义。多种因素决定乙型肝炎应采用免疫介导的治疗策略，免疫控制在慢性乙型肝炎的治疗过程中发挥重要的作用。若能抑制 Treg 细胞的增生和分化，或阻断其调控途径，如剔除 Treg 细胞的过继治疗，抗 CD25 单抗的治疗，阻断 CTLA-4 的治疗或针对特异性转录因子 FoxP3 的基因治疗等，或许能够阻断其免疫抑制功能，提高表位特异性 CTL 的免疫效应，为乙型肝炎的治疗寻找到新的策略。

参考文献

[1] Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells[J]. J Exp Med, 2004, 199(10): 1401-1408.

[2] Bisikirska B, Colgan J, Luban J, et al. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands $CD8^+$ T cell population and induces $CD8^+CD25^+$ Tregs[J]. J Clin. Invest, 2005, 115(10): 2904-2913.

[3] Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring $CD4^+CD25^+$ regulatory T cell[J]. Trends immunol, 2004, 25(7): 374-380.

[4] Shevach EM. Control of T cell activition by $CD4^+CD25^+$ T suppressor T cells[J]. Immunol Rev, 2001, 182(3): 59-67.

[5] Hugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. $CD4^+CD25^+$ T immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor[J]. Immunity, 2002, 16(2): 311-323.

[6] Sakaguchi S. Naturally arising FoxP3-expressing $CD25^+CD4^+$ regulatory T cell in immunological self tolerance and non-self[J]. Nat immunol, 2005, 6(4): 345-352.

[7] Suffa I, Reckling SK, Salay G, et al. A role for CD103 in the retention of $CD4^+CD25^+$ Treg and control of Leishmania major infection[J]. J Immunol, 2005, 174(9): 5444-5455.

[8] Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intinal $CD103^+$ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans[J]. J Exp Med, 2008, 205(9): 2139-2149.

[9] Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells[J]. Immunity, 2004, 21(4): 503-513.

[10] Wang R, Wan Q, Kozhaya L, et al. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces FoxP3 expression[J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2705.

[11] Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al. Human $CD8^+$ $CD25^+$ thymocytes share phenotypic and functional features with $CD4^+CD25^+$ regullatory thymocytes[J]. Blood, 2003, 102(12): 4107-4114.

[12] Franzese O, Kennedy P, Gehring A, et al. Modulation of the $CD8^+$-T-cell response by $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2005, 79(6): 3322-3328.

[13] Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, et al. Cutting edge: human $CD4^+CD25^+$ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells[J]. J Immunol, 2004, 172(8): 4676-4680.

[14] 吕峰，浩玉峰，崔明芳，等. 慢性 HBV 感染患者外周血 CD4CD25 调节性 T 细胞表达及其临床意义[J]. 实用肝脏病杂志，2010，13(1)：13-15.

[15] 刘佩芝，詹爱琴，季榕，等. 慢性乙型肝炎患者外周血 $CD4^+$ $CD25^+$ 调节性 T 细胞、白细胞介素-10 水平及其临床意义[J]. 肝脏，2009，14(2)：124-125.

[16] Xu D, Fu J, Jin L, et al. Circulating and liver resident $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 739-747.

[17] 颜学兵，赵爽，周培培，等. 慢性乙型肝炎患者调节性 T 细胞检测及调控因素研究[J]. 中国医学检验杂志，2009，2(8)：47-49.

[18] Nan XP, Zhang Y, Yu HT, et al. Circulating $CD4^+CD25$ high regulatory T cells and expression of PD-1 and BTLA on $CD4^+$ T cells in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Viral Immunol, 2010, 23(1): 63-70.

[19] Yang G, Liu A, Xie Q, et al. Association of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B[J]. Int Immunol, 2007, 19(2): 133-140.

（收稿日期：2010-07-10）

·综　　述·

量子点及其在肿瘤诊断中的应用研究进展

陈　栋 综述，罗　阳，黄　庆，府伟灵△ 审校

（第三军医大学西南医院检验科，重庆 400038）

关键词：量子点；　肿瘤；　诊断

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.026　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1673-4130(2011)05-0589-03

肿瘤是一种恶性疾病，严重威胁着人类的健康，其高死亡率与复发率已经引起广大学者的高度重视。研究一种可以对肿瘤进行早期诊断而且具有高敏感性与特异性的技术显得尤为重要[1-3]。目前诊断肿瘤的方法主要有以下几种：(1)影像诊断法，如 CT、X 线、超声成像、MRI 以及 PET 用于各部位肿瘤的检测；(2)实验室诊断法：如肿瘤标志物用于部分肿瘤的筛查；(3)其他，如内镜用于消化道肿瘤的检测，乳房造影法用于乳腺癌的检测。这些检测方法存在诸如敏感性及特异性低、费用高等缺点。近年来，量子点(quantum dot，QD)以其独有的特性在肿瘤的诊治中显示出诱人的应用前景。本文就 QD 的结构特点、光电特性、肿瘤诊断中的应用及其存在问题等内容作一综述，并对其应用前景进行展望。

1　QD 的结构及合成修饰[4-6]

1.1　QD 的结构　QD 又称半导体纳米晶体(semiconductor nanocrystal)，是由核心与外壳组成的，直径一般为 2～10 nm。其核心多为Ⅲ～Ⅴ族及Ⅱ～Ⅵ族元素组成的金属与非金属化合物，外壳则由另一种材料构成。目前以 CdSe/ZnS 核壳的 QD 为生物学研究的首选。

△　通讯作者，E-mail：weilingfu@yahoo.com。

1.2 QD 的合成　目前 QD 合成的方法主要有 3 种，第 1 种为化学混匀法，即将 QD 合成的前体分子或者离子在溶液中混匀进行反应；第 2 种方法为蚀刻法，就是用电化学方法从半导体材料上将 QD“雕刻”下来；第 3 种方法为合成法，就是用 QD 的分子前体在气相中反应，然后沉积于基质的薄膜上形成，其中化学混匀法是当今合成 QD 的主要方法。

1.3 QD 的修饰　大多数 QD 的合成是在表面活性剂存在的有机相中进行的，有利于单个稳定的 QD 形成。但是，这种方式合成的 QD 不易溶于水，必须对其表面进行修饰增强水溶性，便于生物学研究，修饰方法主要有 3 种：(1)“帽子交换法”，就是用双功能配体替换三辛基氧膦(trioctyl phosphine oxide，TOPO)帽子；(2)“聚合硅壳包裹法”，即用带有极性基团的纳米硅壳将 QD 包裹。(3)“表面修饰法”，在 TOPO 表面通过配体连接一些多聚体来增强其水溶性。总之，即将 QD 的疏水性表面向亲水性表面转化。大多数用于生物学研究的 QD 探针具有靶定功能，为此，QD 同样必须进行表面修饰，即与合适的配体相连接构成探针，现有的配体包括抗体、适体、肽、小分子配体、核酸以及生物素等。连接方式主要有 2 种：第 1 种为静电吸引；第 2 种为共价结合。迄今 QD 的修饰已经取得较大的进展，然而还存在一些问题，如修饰后 QD 由于空间位阻影响与靶分子的有效结合、配体之间特异性不强、两者之间的连接力随时间延长而减弱等。

2　QD 的特性

QD 属于纳米材料，具有不同于现有荧光染料的光学特性。主要包括以下几个方面：(1)摩尔吸光系数大。能够高效地吸收激发光子，发出更强的荧光，对低浓度肿瘤标志物的检测非常有用。(2)荧光性质稳定。约为有机染料的 1 000 多倍，可长时间进行生物体内肿瘤成像。(3)荧光寿命较长。比有机染料高出 1 个数量级，检测中利用时间延迟法可使信噪比值最大化，获取最佳的荧光图像。(4)激发光谱宽，发射光谱窄。QD 的长波长光谱激发可避免生物体自身荧光发射，减弱背景信号。此外，还有 QD 在红外光区尤其是在 650～900 nm 范围内对深层组织进行荧光成像的报道[7]。(5)可谐调光谱。QD 的带隙能量与 QD 的半径相关，半径越小能量越大。改变 QD 的半径和成分就可以对 QD 的荧光光谱进行调节。

3　QD 在肿瘤诊断中的应用

作为新型荧光染料的 QD 最早将其用于生物样本的标记。近几年，随着对 QD 荧光标记技术研究的不断深入，现已用于肿瘤组织、细胞及标志物的检测与成像中。

3.1 体内肿瘤定位成像　QD 具有很强的荧光稳定性，随着其制备及表面修饰技术的不断发展，开始将其用于生物体内肿瘤的定位成像研究。2004 年 Xiao 和 Gao[9] 首次对小动物体内肿瘤进行了活体成像，他们将 QD 与前列腺膜抗原抗体相结合的复合物通过皮下注射到小鼠体内，观察到了肿瘤生长部位的强荧光信号，并将此荧光信号与绿色荧光蛋白做了对比，发现 QD 荧光强度与持续时间都优于绿色荧光蛋白。此方法虽然解决了体内成像的问题，然而仅限于体表。由于 QD 的光谱具有可谐调性，其峰值发射波长可以通过半径进行调节，而波长较长的光谱有利于穿透相对较厚的组织。基于这一理论，同年 Kim 等[9] 将 QD 的发射光调节到近红外，成功地将其用于猪前哨淋巴结的成像，对距离皮肤 1 cm 深的淋巴结进行了实时观测。2007 年 Kobayashi 等[10] 根据 QD 多色成像的特性，用 5 种不同波长的 QD 对小鼠体内不同位点的淋巴管成功进行显像，利用这项非侵袭性技术可以观察到不同的肿瘤细胞转移路径，同时也为体内多部位肿瘤成像提供了理论基础。如果 QD 能用于体内肿瘤细胞或者位点的长期监测，将会对肿瘤的早期诊治产生深远的影响。但是 QD 的长期效应未知，目前还不能用于临床。不过有学者[11] 已经开始进行生物相容性更好的超敏感 QD 探针用于小动物体内长期成像的应用研究，并且取得了相应的成果。

3.2 肿瘤标志物检测　肿瘤标志物在肿瘤检测中具有重要作用，但因其诊断的敏感性低而难以广泛应用。目前，具有优良光电特性的新型纳米荧光 QD 与肿瘤标志物相结合为肿瘤诊断提供了新的契机。2003 年，Wu 等[12] 首次将 QD 用于特异性生物标志物 Her2 的标记并且成功地用单光源对 2 种靶物质同时进行了成像。据此，2007 年 Yezhelyev 等[13] 对小鼠体内乳腺肿瘤的 5 种标志物同时进行了检测，再次证实了 QD 在多种物质同时成像方面的优势。目前，用 QD 检测的还有卵巢肿瘤标志物 CA125、前列腺肿瘤标志物 PSA、表皮生长因子受体 EGFR、甲胎蛋白 AFP 等。之前，学者利用 QD 对肿瘤标志物主要是进行定性检测。2008 年，Xiao 等[14] 提出了 1 种新的 QD 检测系统，他们将机体内提取的 IgY 抗体与 QD 结合起来成功进行了乳腺肿瘤标志物 Her2 和前列腺肿瘤的标志物 Telomerase 的半定量检测。结果还发现前列腺肿瘤标志物 Telomerase 与肿瘤的分期成一定的相关性，但是由于实验中病例比较少，所以这个发现有待进一步证实。2010 年 Hu 等[15] 利用 QD 结合的微流控芯片对血清中肿瘤标志物进行了超敏感检测，但血清中蛋白的非特异性结合无法克服，这是其美中不足的地方。

3.3 肿瘤转移的检测　肿瘤能够通过脉管系统进行局部或者远处转移，它是造成晚期肿瘤患者难以治愈的主要原因。随着对 QD 研究的不断深入，越来越多地发现 QD 在肿瘤转移的检测方面具有巨大的潜力[16]。有学者通过标记有 CdSe/ZnSQD 的乳腺肿瘤细胞发出的荧光观察到了肿瘤细胞的迁移过程，同时还对其进行形态动力学分析，为肿瘤细胞侵袭能力的研究提供了 1 个新的手段。Ballou 等[17] 透过皮肤清楚地看到注射到肿瘤中的 QD 快速转移到前哨淋巴结的过程，再次有力地证实了 QD 可以用于肿瘤转移方面的研究，同时进一步说明前哨淋巴结在肿瘤转移扩散中的重要作用。此项研究便于外科医生分析肿瘤患者淋巴结中是否有肿瘤细胞的侵入，并且有助于手术中找到前哨淋巴结并行切除。2008 年 Chen 等[18] 首次将 QD 用于动物体内肝肿瘤肺转移的检测，他们用 AFP 抗体对 QD 进行修饰，然后将此复合物注射到肝肿瘤肺转移模型的小鼠尾静脉中，小鼠全身成像显示出 QD 探针集中于肺肿瘤转移灶，此项研究证实了 QD 可用于肿瘤转移灶的检测。目前，尽管 QD 对肿瘤转移的研究不断深入，但是能真正地将其用于临床还需要作出更多的研究。

3.4 其他物质的检测　最近有报道 QD 在肿瘤相关的其他一些领域也发挥着重要作用。Cai 等[19] 利用连接有整联蛋白的三肽段 QD 结合物作为特异性的工具在近红外区对整联蛋白受体成功进行了靶定检测，通过其表达水平对肿瘤进行了分型分度。Gao 等[20] 阐明利用多功能性的 QD 对单个活细胞的基因、蛋白质以及小分子药物进行多种成像与检测。还有学者将 QD 与特异性识别癌细胞的糖结合蛋白抗体进行融合，将这种复合物加到癌细胞中，在体外对正常细胞与癌细胞进行区别[21]。此外，QD 还可以作为造影标记物在 MRI 和 PET 显像中起作用。

4　QD 存在的问题

QD 在肿瘤诊断中的应用潜力很大，但也存在一些问题。首先，QD 的代谢与毒性仍然困扰着大多数学者。有报道[22]称 QD 在进入体内之后会被肝脏、脾脏、淋巴系统非特异性吸收，如何清除与代谢仍然不是很清楚，但可以通过改变颗粒的大小及其表面的包被解决这一问题。研究还发现 QD 进入体内一段时间后主要集中于肾脏与肝脏，这就预示着 QD 可以在体内进行降解，但是否存在特异性的机制仍然需要进一步验证[23]。QD 应用于临床之前，最重要的就是其核心重金属的毒性问题。目前发现 QD 的毒性与多种因素有关系，如：颗粒的大小、电荷、表面被覆层、浓度、化学组成和胶体稳定性等。另外，氧化和紫外光等也可使 QD 外壳破坏，释放出重金属元素，其是否有长期毒性还有待进一步深入研究。其次，QD 存在“眨眼”的现象，造成单个荧光 QD 稳定性较差，不利用临床研究[24]。鉴于此，近年来也有非眨眼 QD 研究的报道[25]。另外部分学者也提出了利用眨眼的这个特性进行特异性检测的构想。还有一些诸如 QD 的表面修饰会造成 QD 空间位阻增大，以及理化性质改变的问题，限制了其在生物医学中的应用。

5 展　　望

随着对 QD 研究的不断深入，学者们发现作为新型荧光染料的 QD 在肿瘤诊断中发挥的作用越来越大。尽管 QD 用于生物医学方面的研究处于刚刚起步的阶段，研究内容也仅限于探索性地进行体内成像、标志物的检测以及细胞的追踪等，但其应用前景是非常广阔的。目前，由于对 QD 的理化特性尤其是其毒性与代谢方面的研究还不够深入，严重制约其在临床研究中的广泛应用。既便如此，短期内 QD 的肿瘤诊断研究也必然会有新的飞跃。目前 QD 的肿瘤标志物检测已经取得了一定的进展，如何对血清中的肿瘤标志物进行更为准确的定量，并且将其与肿瘤的分期分级联系起来以利于临床医生采用合适的治疗方式，这是今后 QD 对肿瘤检测的重要研究方向之一。

参考文献

[1] Choi YE, Kwak JW, Park JW. Nanotechnology for early cancer Detection[J]. Sensors, 2010, 10(1): 428-455.

[2] Xiao Y, Gao X. Use of IgY antibodies and semiconductor nanocrystal detection in cancer biomarker quantitation[J]. Biomark Med, 2010, 4(2): 227-239.

[3] 罗阳，高维寅，张雪，等. 量子点的光学特征及其在检验医学中的应用[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(3)：245-247.

[4] Mansur HS. Quantum dots and nanocomposites[J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2010, 2(2): 113-129.

[5] Parak WJ, Pellegrino T, Plank C. Labeling of cells with quantum dots[J]. Nanotechnol, 2005, 16(2): 19-25.

[6] Lieleg O, Lopez-Garcia M, Semmrich C, et al. Specific integrin labeling in living cells using functionalized nanocrystals[J]. Small, 2007, 3(9): 1560-1565.

[7] Peng CW, Li Y. Application of quantum dots-based biotechnology in cancer diagnosis: current status and future perspectives[J]. J Nanomaterials, 2010, http://ww. hindawi. com/journals/jnm/2010/676839. html.

[8] Gao XH, Cui YY, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. Nature Biotechnol, 2004, 22(8): 969-976.

[9] Kim S, Lim YT, Soltesz EG, et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping[J]. Nature Biotechnol, 2004, 22(1): 93-97.

[10] Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, et al. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots[J]. Nano Lett, 2007, 7(6): 1711-1716.

[11] Yong K-T, Roy I, Ding H, et al. Biocompatible near-infrared quantum dots as ultrasensitive probes for long-term in vivo imaging applications[J]. Small, 2009, 5(17): 1997-2004.

[12] Wu X, Liu H, Liu J, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots[J]. Nat Biotech, 2003, 21(1): 41-46.

[13] Yezhelyev MV, Al-Hajj A, Morris C, et al. In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots [J]. Adv Mater, 2007, 19(20): 3146-3151.

[14] Xiao Y, Gao X, Gannot G, et al. Quantitation of Her2 and telomerase biomarkers in solid tumors with IgY antibodies and nanocrystal detection[J]. Int J Cancer, 2008, 122(10): 2178-2186.

[15] Hu M, Yan J, He Y, et al. Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip[J]. ACS Nano, 2010, 4(1): 488-494.

[16] Wang J, Liu G, Wu H, et al. Quantum-dot-based electrochemical immunoassay for high-throughput screening of the prostate-specific antigen[J]. Small, 2008, 4(1): 82-86.

[17] Ballou B, Ernst LA, Andreko S, et al. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models[J]. Bioconjug Chem, 2007, 18(2): 389-396.

[18] Chen LD, Liu J, Yu XF, et al. The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Biomaterials, 2008, 29(31): 4170-4176.

[19] Cai WB, Shin DW, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects [J]. Nano Lett, 2006, 6(4): 669-676.

[20] Gao X, Chung LW, Nie S. Quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging[J]. Methods Mol Biol, 2007, 374: 135-145.

[21] Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, et al. Quantum dots as photosensitizers[J]. Nature Biotechnol, 2004, 22 (11): 1360-1361.

[22] Choi HS, Ipe BI, Misra P, et al. Tissue- and organ-selective biodistribution of NIR fluorescent quantum dots[J]. Nano Lett, 2009, 9(6): 2354-2359.

[23] Omarova A, Phillips CJC. A meta-analysis of literature data relating to the relationships between cadmium intake and toxicity indicators in humans[J]. Environ Res, 2007, 103(3): 432-440.

[24] Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors[J]. Environ Health Persp, 2006, 114(2): 165-172.

[25] Wang X, Ren X, Kahen K, et al. Non-blinking semiconductor nanocrystals[J]. Nature, 2009, 459(7247): 686-689.

（收稿日期：2010-09-20）