

Nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào gamma delta T trên bệnh nhân ung thư phổi

Nguyễn Quý Linh^{*}, Tạ Thành Đạt¹, Lê Văn Toàn²,
Trần Văn Khánh¹, Hoàng Thị Mỹ Nhung³, Trần Huy Thịnh²

¹Trung tâm Nghiên cứu gen - protein, Trường Đại học Y Hà Nội

²Bộ môn Hóa sinh, Trường Đại học Y Hà Nội

³Bộ môn Sinh học tế bào, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 5/9/2019; ngày chuyển phản biện 9/9/2019; ngày nhận phản biện 11/10/2019; ngày chấp nhận đăng 4/11/2019

Tóm tắt:

Liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào lympho tự thân là một trong những liệu pháp điều trị kết hợp an toàn và khá hiệu quả cho nhiều loại ung thư hiện nay, trong đó có ung thư phổi. Mục đích của nghiên cứu là hoàn thiện quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa tế bào gamma delta T ($\gamma\delta$ T) trên bệnh nhân ung thư phổi. 10 bệnh nhân ung thư phổi được lựa chọn vào nghiên cứu, mỗi bệnh nhân được thu thập 10 ml máu, tiến hành tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, đánh giá hoạt tính miễn dịch. Kết quả cho thấy, số lượng tế bào $\gamma\delta$ T tách từ 10 ml máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi là $1,96 \times 10^4$ tế bào. Sau 14 ngày nuôi cấy, số lượng tế bào lympho thu được trung bình là $2,93 \times 10^8$, tỷ lệ sống trung bình đạt 90%, trong đó, tế bào $\gamma\delta$ T chiếm 83,2% quần thể tế bào thu được. Tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy thể hiện các hoạt tính miễn dịch như khả năng gây độc cho tế bào ung thư và tăng tiết các cytokine như IFN γ .

Từ khóa: liệu pháp miễn dịch tự thân, tế bào gamma delta T ($\gamma\delta$ T), ung thư phổi.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Ung thư phổi là bệnh có tỷ lệ mắc và tử vong hàng đầu trong số các loại ung thư trên thế giới. Theo ghi nhận của Globocan năm 2018 [1], số ca mới mắc ung thư phổi trên toàn thế giới là 2,1 triệu ca, chiếm 11,6% tổng số ca mắc ung thư; số ca tử vong do ung thư phổi là 1,76 triệu ca, chiếm 18,4% số ca tử vong do ung thư. Tại Việt Nam, theo Globocan năm 2018 [2], tỷ lệ mới mắc ung thư phổi xếp thứ hai đối với nam giới (chiếm 18,4%, sau ung thư gan) và xếp thứ ba đối với nữ giới (chiếm 9,4%, sau ung thư vú, ung thư đại trực tràng), có 164.671 ca mắc mới ung thư phổi và 114.871 người tử vong vì căn bệnh này. Trong bối cảnh đó, việc phát triển các phương pháp điều trị mới cũng như phối hợp các phương pháp điều trị nhằm nâng cao hiệu quả, cải thiện chất lượng sống, thời gian sống thêm không bệnh và sống thêm toàn thể với bệnh nhân ung thư phổi là điều hết sức có ý nghĩa.

Trên thế giới, liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân sử dụng tế bào lympho $\gamma\delta$ T được phát triển để điều trị nhiều loại ung thư, bao gồm cả ung thư phổi đã cho những kết quả ban đầu hứa hẹn [3, 4]. Tế bào $\gamma\delta$ T có thể nhận biết trực tiếp các phối tử không phải bản chất peptide mà không cần sự có mặt của phức hệ phù hợp mô chính (MHC). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tế bào $\gamma\delta$ T của người có thể nhận biết các phối tử được biểu hiện bởi các tế bào khối u và thể hiện độc tính mạnh với nhiều dòng tế bào ung thư [5]. Liệu

pháp miễn dịch sử dụng tế bào $\gamma\delta$ T tự thân đã được thử nghiệm và mang lại một số kết quả khả quan. Trong liệu pháp này, tế bào miễn dịch được tách từ máu ngoại vi của người bệnh, nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa trong môi trường đặc biệt rồi truyền trở lại vào cơ thể của chính bệnh nhân. Trong những nghiên cứu trước đây, một số kháng nguyên phospho đã được sử dụng để hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T. Kháng nguyên tổng hợp bromophydrin pyrophosphate (BrHPP) và 2-methyl-3-butenyl-1-pyrophosphate (2M3B1PP) đã được ứng dụng thành công trong việc tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T, được thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân ung thư biểu mô thận. Những thử nghiệm lâm sàng pha I cho thấy, liệu pháp miễn dịch tự thân sử dụng tế bào $\gamma\delta$ T cho những kết quả khả quan, hứa hẹn sẽ phát triển thành một liệu pháp điều trị ung thư có hiệu quả [6].

Hiện tại, Việt Nam vẫn đang trong giai đoạn tiếp cận với liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân trong điều trị ung thư và chưa có nhiều công trình nghiên cứu được công bố trong lĩnh vực này. Do đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu hoàn thiện quy trình phân lập, nuôi cấy hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T trên bệnh nhân ung thư phổi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn sử dụng zoledronate và IL-2 để hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T *in vitro* bởi vì hai hóa chất này đã được biết đến là có khả năng hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T cũng như đã được cấp phép sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng.

^{*}Tác giả liên hệ: Email: quylinh@hmu.edu.vn

Activation culture and proliferation of $\gamma\delta$ T cells from lung cancer patients

Quy Linh Nguyen^{1*}, Thanh Dat Ta¹, Van Toan Le²,
Van Khanh Tran¹, Thi My Nhung Hoang³, Huy Thinh Tran²

¹Center for Gene and Protein Research, Hanoi Medical University

²Department of Biochemistry, Hanoi Medical University

³Department of Cell Biology, University of Science,
Vietnam National University, Hanoi

Received 5 September 2019; accepted 4 November 2019

Abstract:

Autologous $\gamma\delta$ T lymphocyte-based immunotherapy is currently an efficacious and safe treatment method for various types of cancer, including lung cancer. The study was conducted on 10 lung cancer patients, and the $\gamma\delta$ T cells were isolated, activated, proliferated, and evaluated from 10 ml of blood of each patient. The number of $\gamma\delta$ T cells isolated from 10 ml peripheral blood was 1.96×10^4 cells. The number of cells after 14-day culture was 2.93×10^8 , and the cell survival rate was 90%. 83.2% of the cultured lymphocytes was $\gamma\delta$ T cells. The cultured $\gamma\delta$ T cells exhibited immune activities, such as cytotoxic activity and increased cytokine secretion.

Keywords: autologous immunotherapy, gamma delta T ($\gamma\delta$ T) cells, lung cancer.

Classification number: 3.1

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng

10 bệnh nhân ung thư phổi được lựa chọn vào nghiên cứu. Bệnh nhân trên 18 tuổi, chỉ số toàn trạng ECOG (thang điểm của Nhóm hợp tác ung thư Đông Âu - Eastern Cooperative Oncology Group) ≤ 3 . Bệnh nhân được khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội.

Các bệnh nhân có bệnh lý tự miễn, dùng thuốc ức chế miễn dịch, bệnh lý mạn tính kết hợp, bệnh lý ác tính dòng tế bào lympho T sẽ bị loại trừ khỏi nghiên cứu này.

Phương pháp

Phương pháp thu thập mẫu: 10 ml máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi được lấy vào ống chống đông heparin, bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong vòng 6 giờ.

Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

Kỹ thuật phân tách tế bào lympho từ máu ngoại vi: các tế bào

miễn dịch được tách bằng phương pháp ly tâm thay đổi tỷ trọng sử dụng Ficoll 1.077.

Kỹ thuật nuôi cấy hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T: sau khi phân lập, các tế bào được nuôi cấy trong môi trường AIM-V chứa 10% huyết thanh của bệnh nhân có bổ sung thêm cytokine IL-2 (600 IU/ml) và zoledronate (5 mM). Khi các tế bào ổn định, đạt mật độ nuôi cấy cần thiết (70-80%) sẽ được chuyển sang các điều kiện nuôi cấy tăng sinh số lượng lớn. Tổng thời gian nuôi cấy và hoạt hóa tế bào lympho $\gamma\delta$ T là 14 ngày.

Phương pháp xác định tỷ lệ tế bào sống sử dụng Trypan blue: tế bào sau khi phân lập từ máu ngoại vi và sau nuôi cấy được nhuộm với Trypan blue để đếm số lượng và xác định tỷ lệ tế bào sống.

Kỹ thuật phân loại tế bào nuôi cấy bằng Flow cytometry: dựa trên biểu hiện của các marker đặc hiệu trên bề mặt tế bào tương ứng với mỗi giai đoạn hoạt hóa và biệt hóa của mỗi loại tế bào lympho. Các marker được sử dụng là CD3, CD4, CD8, CD19, CD56. Các tế bào lympho được nhuộm với kháng thể kháng marker đặc hiệu cho từng loại tế bào và được đếm trên máy đếm dòng chảy tế bào BD FACS Canto II.

Kỹ thuật Realtime PCR xác định mức độ biểu hiện của gen IFN γ , V γ 9: RNA tổng số được tách chiết từ tế bào $\gamma\delta$ T bằng kit RNeasy mini kit (Qiagen), sau đó được tổng hợp cDNA bằng Revert first strand cDNA synthesis kit (Thermo fisher scientific, USA) để sử dụng làm khuôn cho phản ứng Realtime PCR sử dụng cặp mồi và probe đặc hiệu của gen IFN γ và gen V γ 9 (Thermo fisher scientific, USA) trên hệ thống máy QuantStudio3 (Thermo fisher scientific, USA).

Kỹ thuật ELISA đánh giá khả năng tiết IFN γ ra môi trường nuôi cấy: kỹ thuật này dựa trên nguyên lý của phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể, đồng thời sử dụng kháng thể gắn enzyme và chất phát màu mà qua đó có thể xác định được nồng độ của protein cần biết trong mẫu phân tích (ở đây chính là môi trường nuôi cấy). Nồng độ IFN γ trong môi trường nuôi cấy được định lượng bằng kỹ thuật ELISA sử dụng IFN γ human ELISA kit (Thermo fisher scientific, USA).

Kỹ thuật xác định khả năng gây độc của tế bào: tế bào ung thư phổi H640 được nhuộm với chất huỳnh quang Calcein-AM, sau đó rửa sạch. Tế bào ung thư được nuôi cấy với số lượng 1×10^4 sẽ được đồng nuôi cấy với tế bào miễn dịch $\gamma\delta$ T với các tỷ lệ lần lượt là 1:1, 1:10, 1:30 trong 2 giờ. Hoạt tính gây độc sẽ được xác định bằng tín hiệu huỳnh quang giải phóng ra môi trường, được đo bằng hệ thống Terascan VPC (Minerva Tech, Nhật Bản).

Xử lý số liệu: các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 20.0. Thống kê phân tích sử dụng t-test độc lập so sánh giữa hai nhóm.

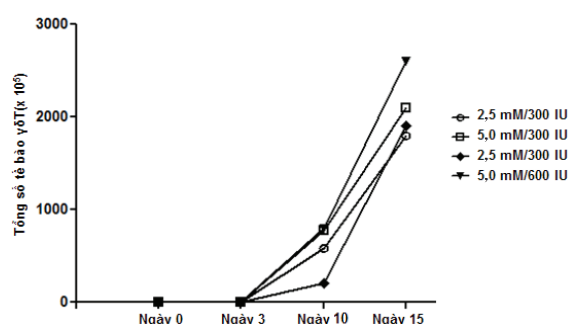
Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma delta T ($\gamma\delta$ T) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi” đã được Hội đồng đạo đức của Trường Đại học Y Hà Nội đồng ý thông qua giai đoạn thử nghiệm trên người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư.

Kết quả

Chuẩn hóa quy trình nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T trên bệnh nhân ung thư phổi

Sử dụng các nồng độ zoledronate và IL-2 khác nhau, lần lượt là 2,5 mM - 300 IU, 2,5 mM - 600 IU, 5 mM - 300 IU và 5 mM - 600 IU, tiến hành nuôi cấy và xác định tốc độ tăng trưởng của tế bào $\gamma\delta$ T tại một số thời điểm nuôi cấy. Kết quả được thể hiện ở hình 1. Số lượng tổng số tế bào thu được sau 14 ngày nuôi cấy tăng sinh đạt cao nhất tại nồng độ zoledronate - IL-2 là 5 mM - 600 IU. Số lượng tế bào đạt trên $2,6 \times 10^8$ tế bào là thỏa mãn yêu cầu cần đạt được. Tế bào lympho T đạt tỷ lệ cao nhất với 96,6% ở nồng độ zoledronate và IL-2 là 5 mM và 600 IU, trong đó tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T ở cả 3 điều kiện nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa đều đạt trên 95% tổng số tế bào T thu được. Như vậy, nồng độ zoledronate và IL-2 tối ưu cho nuôi cấy tăng sinh, hoạt hóa tế bào $\gamma\delta$ T lần lượt là 5 mM và 600 IU.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của tế bào $\gamma\delta$ T ở các nồng độ zoledronate/IL-2 khác nhau.

Số lượng tế bào lympho thu được sau tách chiết từ máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi

Bảng 1. Đặc điểm tế bào thu được sau phân lập từ máu ngoại vi.

	Số lượng tế bào	Tỷ lệ sống	Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T
BN01	$1,5 \times 10^4$	95%	5,1%
BN02	$1,8 \times 10^4$	94%	6,2%
BN03	$1,9 \times 10^4$	96%	5%
BN04	$1,2 \times 10^4$	95%	6,3%
BN05	$1,4 \times 10^4$	90%	6,4%
BN06	$2,4 \times 10^4$	98%	6,2%
BN07	$2,6 \times 10^4$	95%	6,1%
BN08	$1,9 \times 10^4$	92%	5,8%
BN09	$2,2 \times 10^4$	96%	6,5%
BN10	$2,7 \times 10^4$	97%	5,8%
TB	$1,96 \times 10^4$	94,8%	5,94%

TB: trung bình.

Bảng 1 cho thấy, số lượng tế bào lympho tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi trung bình là $1,96 \times 10^4$. Trong đó, tế bào $\gamma\delta$ T chiếm tỷ lệ trung bình 5,94%. Tỷ lệ tế bào sống đạt 94,8%.

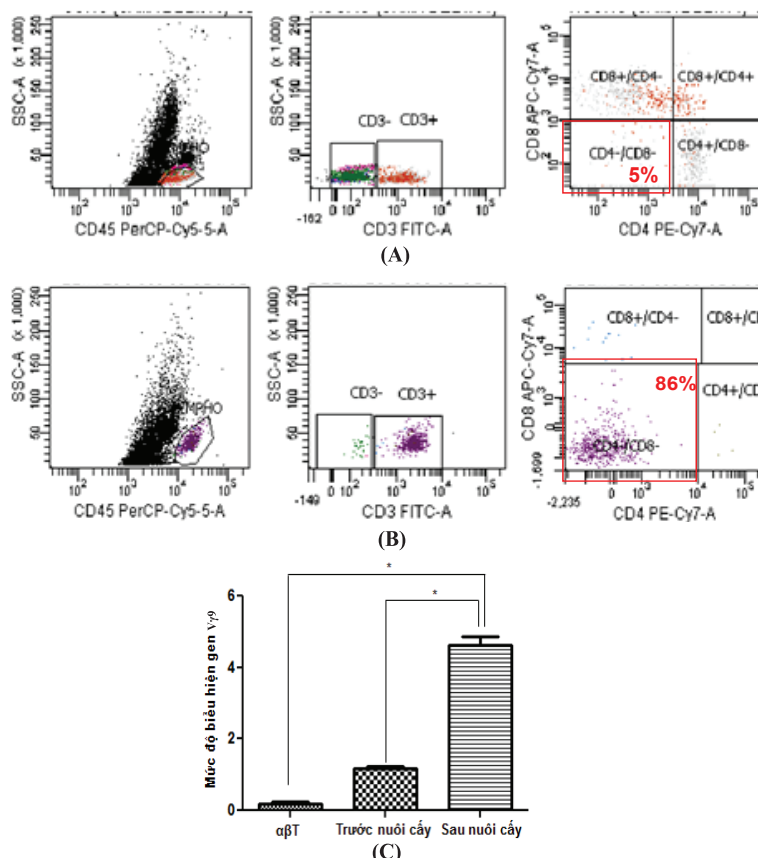
Số lượng tế bào lympho $\gamma\delta$ T tách từ bệnh nhân ung thư phổi thu được sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh

Bảng 2. Đặc điểm tế bào thu được sau nuôi cấy hoạt hóa.

	Số lượng tế bào	Tỷ lệ sống	Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T
BN01	$1,5 \times 10^8$	91%	81%
BN02	$4,5 \times 10^8$	89%	83%
BN03	$1,1 \times 10^8$	92%	86%
BN04	$1,6 \times 10^8$	93%	87%
BN05	$4,8 \times 10^8$	97%	84%
BN06	$2,5 \times 10^8$	96%	82%
BN07	$2,8 \times 10^8$	90%	83%
BN08	$3,7 \times 10^8$	78%	80%
BN09	$3,2 \times 10^8$	90%	85%
BN10	$3,6 \times 10^8$	90%	81%
TB	$2,93 \times 10^8$	90,6%	83,2%

TB: trung bình.

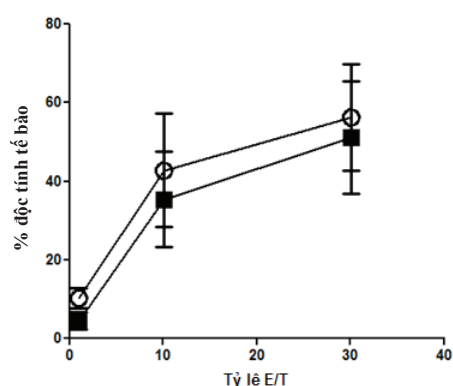
Bảng 2 cho thấy, số lượng tế bào trung bình thu được sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh là $2,93 \times 10^8$, tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T trung bình đạt 83,2% (hình 2). Quần thể tế bào thu được sau 14 ngày nuôi cấy biểu hiện ở mức độ cao gen $V\gamma 9$ mã hóa cho thụ thể bề mặt $V\gamma 9$ đặc trưng cho tế bào $\gamma\delta$ T (hình 2C). Kết quả này chứng minh quần thể tế bào thu được sau nuôi cấy chiếm tỷ lệ lớn là tế bào $\gamma\delta$ T. Tỷ lệ sống đạt 90,6%. So sánh với trước khi nuôi cấy, tế bào nhân lên trung bình 14.949 lần.



Hình 2. Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T thu được trước và sau nuôi cấy. (A) Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T thu được trước nuôi cấy; (B) Tỷ lệ tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy; (C) Biểu hiện của gen mã hóa cho thụ thể $V\gamma 9$ ở tế bào $\alpha\beta$ T, tế bào $\gamma\delta$ T trước và sau nuôi cấy. *: $p < 0,05$.

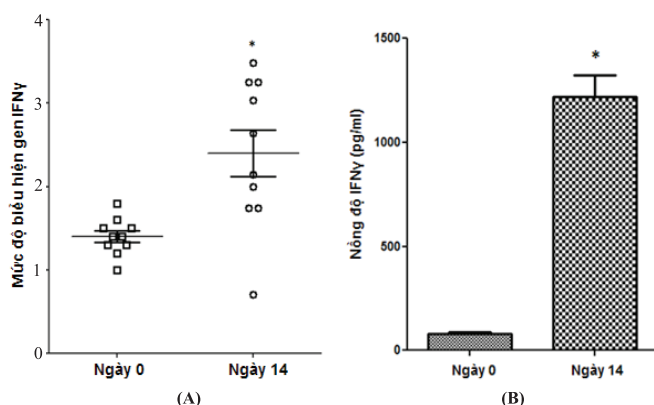
Đánh giá hoạt tính miễn dịch của tế bào $\gamma\delta T$ tách từ bệnh nhân ung thư phổi sau nuôi cấy

Hoạt tính gây độc cho tế bào ung thư H460 của tế bào $\gamma\delta T$ sau 14 ngày nuôi cấy được thực hiện trên hệ thống Terascan VPC. Tế bào $\gamma\delta T$ thu được từ người tình nguyện khỏe mạnh thể hiện độc tính khá cao với dòng tế bào ung thư phổi H460, đạt 42,6% ở tỷ lệ E/T 10:1 và 51,7% ở tỷ lệ E/T 30:1. Hình 3 cho thấy, tế bào $\gamma\delta T$ từ bệnh nhân ung thư phổi cũng thể hiện độc tính tương tự với dòng tế bào H460, đạt 38,8% ở tỷ lệ E/T 10:1 và 43,7% ở tỷ lệ E/T 30:1. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa độc tính đối với dòng tế bào ung thư H460 của tế bào $\gamma\delta T$ sau nuôi cấy hoạt hóa tăng sinh thu từ người tình nguyện khỏe mạnh và bệnh nhân ung thư phổi.



Hình 3. Hoạt tính gây độc của tế bào $\gamma\delta T$ sau 14 ngày nuôi cấy.

Thêm vào đó, chúng tôi cũng tiến hành kiểm tra khả năng tiết cytokine của tế bào $\gamma\delta T$ sau nuôi cấy bằng kỹ thuật Realtime PCR. Mức độ biểu hiện của gen IFN γ trong tế bào $\gamma\delta T$ sau khi nuôi cấy của bệnh nhân ung thư phổi cao hơn 2,40 lần so với trước khi nuôi cấy (hình 4A).



Hình 4. Mức độ biểu hiện của mRNA IFN γ trên tế bào $\gamma\delta T$ trước và sau nuôi cấy. (A) Biểu hiện ở mức độ mRNA IFN γ , (B) Khả năng tiết protein IFN γ . *: $p < 0,05$.

Không chỉ ở mức độ mRNA, nồng độ IFN γ do tế bào miễn dịch tiết vào môi trường nuôi cấy sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tăng cao hơn rõ rệt so với ngày đầu, đạt trung bình 1.217,29 pg/ml, so với trung bình 79,27 pg/ml trong môi trường nuôi cấy của tế bào trước nuôi cấy (hình 4B).

Bàn luận

Trước đây, phương pháp điều trị ung thư phổ biến được sử dụng bao gồm phẫu thuật, hóa trị và xạ trị. Đối với một số loại ung thư (như ung thư phổi), điều trị bằng thuốc trúng đích đang được đánh giá là có hiệu quả tốt. Trong những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch nổi lên như một phương pháp điều trị ung thư có triển vọng. Liệu pháp sử dụng tế bào miễn dịch tự thân nhận biết ung thư không phải dựa trên đặc điểm giải phẫu hay khả năng phân chia của tế bào ung thư mà dựa vào cơ chế của tế bào miễn dịch dùng để phân biệt mô lành và mô bệnh. Liệu pháp miễn dịch tự thân sử dụng tế bào lympho T là phương pháp hiệu quả để điều trị ung thư dựa vào sự truyền lại cơ thể bệnh nhân tế bào lympho đặc hiệu khối u.

Liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư sử dụng tế bào lympho T có những ưu điểm sau: 1) Đáp ứng miễn dịch của tế bào lympho T rất đặc hiệu, do đó có khả năng phân biệt mô lành và mô ung thư; 2) Tế bào lympho T có thể nhân lên với số lượng lớn, gấp hàng nghìn lần sau khi được hoạt hóa; 3) Đáp ứng miễn dịch của tế bào lympho T có thể di chuyển đến vị trí của kháng nguyên, có thể ứng dụng để điều trị những khối u đã di căn; 4) Tế bào lympho T có khả năng ghi nhớ, duy trì hiệu quả điều trị trong nhiều năm sau lần điều trị đầu tiên [7]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của tế bào $\gamma\delta T$ trong giám sát miễn dịch khối u. Những kết quả nghiên cứu trên chuột cho thấy, chuột thiếu hụt tế bào $\gamma\delta T$ nhạy cảm cao đối với các tác nhân gây ung thư da [8]. Trong các nghiên cứu lâm sàng, tế bào $\gamma\delta T$ cho thấy có khả năng thâm nhiễm vào nhiều loại khối u, bao gồm ung thư phổi, ung thư thận, ung thư tinh hoàn và ung thư vú. Trên quy mô phòng thí nghiệm (*in vitro*), nhiều nghiên cứu đã chỉ ra tế bào $\gamma\delta T$ thể hiện tính độc đối với các dòng tế bào ung thư, có khả năng tiết cytokine và tiêu diệt các tế bào ung thư vú, ung thư gan, ung thư buồng trứng hay ung thư đại trực tràng [9-12].

Số lượng tế bào bạch cầu tách được từ 10 ml máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi trung bình là $1,96 \times 10^4$. Điều này được giải thích là do tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu đều đang trong giai đoạn bệnh ổn định và chưa hoặc đã dừng điều trị bằng phóng xạ hay hóa chất. Tất cả các mẫu đều đạt tỷ lệ sống của tế bào trên 90%, trung bình 94,8%. Kết quả này tương đồng với những nghiên cứu tăng sinh hoạt hóa tế bào $\gamma\delta T$ sử dụng biposphonate kết hợp với cytokine đã được công bố trước đây. Burjanadzé và cộng sự (2007) [13] sử dụng phosphotism hoặc zoldronate kết hợp với IL-2 để nuôi cấy hoạt hóa và tăng sinh $\gamma\delta T$ trên bệnh nhân u tủy, sau 14 ngày nuôi cấy, thu được 88% tế bào là $\gamma\delta T$, số lượng tế bào $\gamma\delta T$ đạt $2,5 \times 10^6$, mức độ tăng sinh

gấp 300 lần so với ngày đầu nuôi cấy. Tương tự nghiên cứu này, Kondo và cộng sự (2011) [14] cũng sử dụng 5 mM zoledronate và 1.000 IU/ml IL-2, thu được 93,8% tế bào $\gamma\delta$ T, sau 14 ngày nuôi cấy thu được $2,2 \times 10^8$ tế bào, tăng 13.750 lần so với ngày đầu nuôi cấy. Tanaka và cộng sự (2018) [15] đã sử dụng PTA thay cho zoledronate để hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T trên tế bào ung thư vú và ung thư tuyến tiền liệt. Kết quả cho thấy, sử dụng PTA thu được $5,6 \times 10^8$ tế bào, trong đó 95,6% là tế bào $\gamma\delta$ T, tăng gấp 7.085 lần so với ngày đầu nuôi cấy. So sánh với các nghiên cứu tương tự trên thế giới cho thấy, quy trình tách chiết, hoạt hóa tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T áp dụng trong nghiên cứu này có hiệu quả tương đương và chất lượng đảm bảo để thực hiện những nghiên cứu tiếp theo.

Để kiểm tra khả năng gây độc của tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, chúng tôi đã sử dụng phương pháp đo độc tính tế bào [16]. Đồng thời nuôi cấy tế bào $\gamma\delta$ T thu được với dòng tế bào ung thư phổi H460 theo tỷ lệ số lượng tế bào miễn dịch và tế bào ung thư lần lượt là 1:1, 1:10 và 1:30. Kết quả cho thấy, tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy có khả năng ly giải tế bào ung thư khi số lượng tế bào miễn dịch $\gamma\delta$ T nhiều hơn số lượng tế bào ung thư từ 10 lần trở lên. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Kondo và cộng sự (2008) [5] khi nghiên cứu hoạt hóa, tăng sinh số lượng lớn tế bào $\gamma\delta$ T. Thêm vào đó, kết quả phân tích cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, biểu hiện gen IFN γ ở mức độ mRNA cũng như khả năng tiết cytokine IFN γ ra môi trường nuôi cấy tăng đáng kể so với ngày đầu nuôi cấy. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Kondo và cộng sự (2011) [14] nhận thấy biểu hiện gen IFN γ tăng mạnh trong tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy. Điều này chứng tỏ tế bào $\gamma\delta$ T sau nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh có khả năng thể hiện hoạt tính miễn dịch, kháng tế bào ung thư tương tự với tế bào $\gamma\delta$ T trong cơ thể.

Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thiện quy trình tách chiết, nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào $\gamma\delta$ T tách từ bệnh nhân ung thư phổi. Tế bào thu được sau nuôi cấy đảm bảo đủ số lượng, chất lượng cũng như thể hiện được hoạt tính miễn dịch tương tự như tế bào miễn dịch trong cơ thể.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả của nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma delta T ($\gamma\delta$ T) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi” (7/2018-12/2020) do Trường Đại học Y Hà Nội chủ trì, PGS.TS Trần Huy Thịnh làm chủ nhiệm đề tài. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, et al. (2018), “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries”, *CA Cancer J.*

Clin., **68**(6), pp.394-424.

[2] Global Cancer Observatory, <https://gco.iarc.fr/>.

[3] E.G. Iliopoulou, P. Kountourakis, M.V. Karamouzis, et al. (2010), “A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer”, *Cancer Immunol. Immunother. CII*, **59**(12), pp.1781-1789.

[4] Y.J. Yang, J.C. Park, H.K. Kim, et al. (2013), “A trial of autologous ex vivo-expanded NK cell-enriched lymphocytes with docetaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer as second- or third-line treatment: phase IIa study”, *Anticancer Res.*, **33**(5), pp.2115-2122.

[5] M. Kondo, K. Sakuta, A. Noguchi, et al. (2008), “Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy”, *Cytotherapy*, **10**(8), pp.842-856.

[6] L. Xiao, C. Chen, Z. Li, et al. (2018), “Large-scale expansion of V γ 9V δ 2 T cells with engineered K562 feeder cells in G-Rex vessels and their use as chimeric antigen receptor-modified effector cells”, *Cytotherapy*, **20**(3), pp.420-435.

[7] K. Perica, J.C. Varela, M. Oelke, et al. (2015), “Adoptive T cell immunotherapy for cancer”, *Rambam Maimonides Med. J.*, **6**(1), Doi: 10.5041/RMMJ.10179.

[8] M.S. Cruz, A. Diamond, A. Russell, et al. (2018), “Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in skin immunity and disease”, *Front. Immunol.*, **9**, Doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.

[9] E.S. Morrow, A. Roseweir, J. Edwards (2019), “The role of gamma delta T lymphocytes in breast cancer: a review”, *Transl. Res.*, **203**, pp.88-96.

[10] W. Tian, J. Ma, R. Shi, et al. (2018), “ $\gamma\delta$ T cell-mediated individualized immunotherapy for hepatocellular carcinoma considering clinicopathological characteristics and immunosuppressive factors”, *Oncol. Lett.*, **15**(4), pp.5433-5442.

[11] X. Chen, W. Shang, R. Xu, et al. (2019), “Distribution and functions of $\gamma\delta$ T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment”, *J. Transl. Med.*, **17**, article number 144 (2019).

[12] T. Ramutun, S. Buccheri, F. Dieli, et al. (2014), “ $\gamma\delta$ T cells as a potential tool in colon cancer immunotherapy”, *Immunotherapy*, **6**(9), pp.989-999.

[13] M. Burjanadzé, M. Condomines, T. Reme, et al. (2007), “In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma”, *Br. J. Haematol.*, **139**(2), pp.206-216.

[14] M. Kondo, T. Izumi, N. Fujieda, et al. (2011), “Expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells using zoledronate”, *J. Vis. Exp.*, (55), Doi: 10.3791/3182.

[15] Y. Tanaka, K. Murata-Hirai, M. Iwasaki, et al. (2018), “Expansion of human $\gamma\delta$ T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug”, *Cancer Sci.*, **109**(3), pp.587-599.

[16] A. Adan, Y. Kiraz, Y. Baran (2016), “Cell proliferation and cytotoxicity assays”, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **17**(14), pp.1213-1221.