

Nuôi cấy *ex vivo* tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ phân lập từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người

Ex vivo expansion T CD4⁺ and T CD8⁺ isolated from human peripheral blood mononuclear cells

Phùng Thị Việt Anh¹, Võ Nguyễn Thanh Thảo¹, Nguyễn Đăng Quân^{1*}

¹Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

THÔNG TIN

DOI: 10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.17.2.2133.2022

Ngày nhận: 30/12/2021

Ngày nhận lại: 27/01/2022

Duyệt đăng: 08/02/2022

Từ khóa:

CD4⁺; CD8⁺; *ex vivo*; liệu pháp miễn dịch; tế bào đơn nhân máu ngoại vi

TÓM TẮT

Miễn dịch trị liệu hiện đang là phương pháp hấp dẫn trong điều trị bệnh ung thư. Các tế bào miễn dịch được phân lập, kích hoạt, tăng sinh *ex vivo*, và can thiệp về chức năng để sau đó truyền trở lại người bệnh. Ở nghiên cứu này, chúng tôi phân lập tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi người (PBMC), kích hoạt và nuôi cấy *ex vivo* hai quần thể tế bào này trong điều kiện sử dụng hạt từ phủ kháng thể CD3/CD28 ở tỉ lệ 01 hạt từ: 01 tế bào, bổ sung 30 U/mL IL-2 trong môi trường nuôi cấy. Số lượng tế bào được kiểm tra mỗi ngày bằng thuốc nhuộm Trypan Blue, tỉ lệ quần thể tế bào CD3⁺CD4⁺ và CD3⁺CD8⁺ được kiểm tra bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy flow cytometry. Kết quả sau 10 ngày nuôi cho thấy, quần thể tế bào T CD4⁺ có sự tăng mạnh số lượng tế bào, tăng hơn 30 lần so với ngày đầu, đạt 6.5×10^7 tế bào. Đối với tế bào T CD8⁺ cũng ghi nhận có sự tăng nhưng không đáng kể số lượng tế bào sau 10 ngày nuôi, đạt 3×10^6 tế bào. Kết quả flow cytometry cho thấy quần thể tế bào T CD4⁺ vẫn duy trì được tỉ lệ CD3⁺/CD4⁺ hơn 90% ở ngày quan sát thứ 04, trong khi đó, quần thể T CD8⁺ có sự tăng số tế bào tuy nhiên tỉ lệ CD3⁺/CD8⁺ chỉ đạt hơn 40% trong quần thể. Như vậy, nhóm nghiên cứu đã có thể phân lập và nuôi cấy thành công *ex vivo* tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺.

ABSTRACT

Immunotherapy is currently an attractive method in the treatment of cancer. Immune cells are isolated, activated, *ex vivo* proliferated, functionally manipulated, and then given back to the patient. In this study, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) were isolated, *ex vivo* activated and cultured under the conditions of using coated magnetic beads CD3/CD28 at the ratio of 01 bead: 01 cell supplemented with 30 U/mL IL-2 in the culture medium. The number of cells was counted every day by staining with Trypan Blue. The percentage of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ cell populations was confirmed by flow cytometry. After 10 days, the CD4⁺ T cell could proliferate strongly; the total cell number is approximately 6.5×10^7 cells, increasing more than 30 times

Keywords:

CD4⁺; CD8⁺; *ex vivo*; immunotherapy; Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)

compared with the cell number on the first day. For CD8⁺ T cells, there was also a slight increase in cell number, reaching 3×10^6 cells. Flow cytometry results showed that the CD4⁺ T cell population still maintained a CD3⁺/CD4⁺ population of more than 90% at day 04. In contrast, the CD3⁺/CD8⁺ ratio in the CD8⁺ population was only 40% even though the total cell number increased in this population. Taken together, these data indicated that we were able to isolate and culture *ex vivo* CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

1. Giới thiệu

Đáp ứng miễn dịch ở người là một hệ thống phức tạp và chuyên biệt liên quan đến hàng trăm loại tế bào và nhiều con đường tín hiệu khác nhau. Các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) là nhân tố quan trọng của hệ thống miễn dịch, do đó các nhà nghiên cứu và bác sĩ điều trị thường sử dụng PBMC trong các lĩnh vực liên quan đến miễn dịch học, bệnh truyền nhiễm, ung thư, vắc-xin, liệu pháp cấy ghép, ... Quần thể tế bào PBMC bao gồm phần lớn là các tế bào lympho (tế bào T, tế bào B), tế bào giết tự nhiên (NK cell) và monocyte (Kleiveland, 2015).

PBMC là yếu tố quan trọng và là công cụ mạnh mẽ thường được sử dụng trong nghiên cứu cơ bản cũng như trong các nghiên cứu lâm sàng liên quan đến sức khỏe và bệnh tật của con người. Việc tạo ra tế bào gốc đa năng (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs) từ một phần PBMC, việc sử dụng công nghệ chỉnh sửa bộ gene CRISPR/Cas9, việc biến đổi tế bào miễn dịch (tế bào T từ PBMC) thành tế bào biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khả năng CART có ý nghĩa lớn trong y học cá nhân ứng dụng liệu pháp tế bào. Thông qua quá trình xử lý, phân tách hiệu quả và thành công PBMC, các nhà nghiên cứu có thể hiểu và can thiệp chuyên biệt vào hệ thống miễn dịch của con người (Fesnak, June, & Levine, 2016; Hokayem, Cukier, & Dykxhoorn, 2016; Rohaan, Wilgenhof, & Haanen, 2019).

Để cung cấp đủ các tế bào miễn dịch đặc hiệu một cách hiệu quả, việc nuôi cấy tăng sinh *ex vivo* các tế bào miễn dịch là một bước rất quan trọng và tiên quyết để thành công. Để tăng sinh, các tế bào bạch cầu ban đầu cần được kích hoạt bởi hai nguồn tín hiệu hình thành từ sự tương tác giữa thụ thể tế bào T (TCR) với phức hợp trình diện kháng nguyên trên APC và sự tương tác giữa CD28 trên tế bào T với CD80 hoặc CD86 trên tế bào APC (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001). Các phương pháp gần đây sử dụng hạt từ tính phủ kháng thể kháng CD3/CD28 kết hợp với việc bổ sung interleukin-2 (IL-2) vào môi trường nuôi cấy để kích hoạt và tăng sinh tế bào. Các tế bào T cần các nhân tố tăng trưởng để tăng sinh, các nhân tố này thường có trong môi trường và huyết thanh. Một trong số đó là interleukin-2 (IL-2), liên kết với các thụ thể trên tế bào T và kích hoạt quá trình tăng sinh. Các nghiên cứu được công bố thường sử dụng khoảng từ 20 đến 10,000 U/mL IL-2 cho việc tăng sinh tế bào (Martkamchan, Onlamoon, Wang, Pattanapanyasat, & Ammaranond, 2016; Ross & Cantrell, 2018).

Quần thể T CD4⁺ và T CD8⁺ chiếm phần lớn trong PBMC và giữ chức năng khác nhau trong đáp ứng miễn dịch. Trong khi tế bào T CD4⁺ hỗ trợ hoạt động của các tế bào miễn dịch khác bằng cách giải phóng các cytokine, các tế bào T CD8⁺ tiêu diệt tế bào mục tiêu thông qua việc giải phóng các cytotoxin như perforin, granzymes và granulysin (Janeway & ctg., 2001). Việc phân lập và nuôi cấy *ex vivo* dạng quần thể tế bào này giúp nghiên cứu trực tiếp hơn về chức năng của chúng. Chưa có nhiều nghiên cứu trong nước về phân lập, nuôi cấy tăng sinh tế bào T ứng dụng trong các liệu pháp miễn dịch tế bào. Ở nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu tiến hành phân lập tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ từ quần thể PBMC, sau đó kích hoạt và tăng sinh bằng hạt từ tính phủ CD3/CD28 trong môi trường có bổ sung IL-2. Nghiên cứu giúp cung cấp thêm thông

tin về việc nuôi cấy và tăng sinh tế bào cho các nghiên cứu tiếp theo về liệu pháp miễn dịch tế bào trong điều trị bệnh sử dụng tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

03 tình nguyện viên có sức khỏe bình thường, không mắc các bệnh mãn tính và hiện không tiếp nhận bất cứ điều trị y khoa nào được kêu gọi trong nghiên cứu này. Tất cả các tình nguyện viên tham gia đều ký vào “Giấy xác nhận tự nguyện hiến máu cho mục đích nghiên cứu khoa học” được Giám đốc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đồng ý và xác nhận. Mỗi người hiến máu sẽ được bác sĩ chuyên môn thu nhận khoảng 15 - 20mL máu và đựng trong ống chống đông chứa EDTA.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi PBMCs

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được phân tách bằng phương pháp ly tâm đẳng tỉ trọng với Ficoll-Paque (Sigma) dựa trên quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất. Một cách ngắn gọn, máu sau khi pha loãng với PBS - EDTA 2mM theo tỉ lệ 1: 1 được chuyển nhẹ nhàng vào ống chứa sẵn 10mL Ficoll-Paque. Ly tâm 500g, 30 phút, nhiệt độ phòng. Thu nhận lớp giữa là lớp PBMC, bổ sung 10mL PBS, ly tâm 350g, 05 phút, nhiệt độ phòng. Lặp lại bước rửa trên thêm 01 lần, loại dịch và huyền phù tế bào thu được trong môi trường CTS AIM V (Gibco) bổ sung 5% Immune Cell SR (Gibco), 100 units/mL penicillin/ streptomycin (Gibco).

2.2.2. Phương pháp phân lập tế bào T CD4⁺

Tế bào T CD4⁺ được phân lập bằng bộ kit Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit (11331D, Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. 1×10^7 PBMC được ủ với hạt Dynabead chuẩn bị trong Buffer 1 (PBS, 0.1% BSA, 2mM EDTA) trong 20 phút, 4°C, xoay mẫu liên tục. Các hạt từ liên kết với tế bào T CD4⁺ sẽ được giữ lại bằng nam châm và rửa bỏ những tế bào không bám 03 lần với Buffer 1. Giải phóng phức hợp hạt từ-tế bào với 100μL DetachBead. Tế bào T CD4⁺ thu được nuôi trong môi trường CTS OpTmizer (Gibco) bổ sung 5% Immune Cell SR (Gibco), 2mM Glutamin (Sigma), 100 units/mL penicillin/ streptomycin (Gibco). Kiểm tra hiệu suất, thành phần tế bào phân lập bằng phương pháp nhuộm Trypan blue và phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS, flow cytometry).

2.2.3. Phương pháp phân lập tế bào T CD8⁺

Tế bào T CD8⁺ được phân lập bằng bộ kit Dynabead Untouched Human CD8 T cell Kit (11348D, Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hòa 1×10^7 PBMC trong 100μL Isolation Buffer, bổ sung 20μL heat inactivated FBS/FCS và 20μL Antibody Mix, ủ 20 phút ở 4°C, xoay đều, sau đó bổ sung 1mL Isolation buffer, ly tâm 350g, 4°C, 08 phút, hòa cạn tế bào với 100μL Isolation Buffer và bổ sung 100μL hạt từ đã chuẩn bị, ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng, xoay mẫu liên tục. Hạt từ sau đó được loại bỏ bằng nam châm, tế bào T CD8⁺ thu được được nuôi trong môi trường CTS OpTmizer (Gibco) bổ sung 5% Immune Cell SR (Gibco), 2mM Glutamin (Sigma), 100 units /mL penicillin/ streptomycin (Gibco). Kiểm tra hiệu suất, thành phần tế bào phân lập bằng phương pháp nhuộm Trypan blue và phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS, flow cytometry).

2.2.4. Phương pháp phân tích quần thể tế bào

Tế bào T CD4⁺/CD8⁺ sau khi phân lập và nuôi tăng sinh sẽ được phân tích thành phần T CD3⁺, T CD4⁺ và T CD8⁺ bằng cách nhuộm với kháng thể kháng CD4-PE, CD3-FITC (CD3/CD4/CD45 Tritest, 342413, Becton-Dickinson), CD8-FITC (MHCD0801, Invitrogen). 1×10^5 tế bào được rửa với PBS và huyền phù trong 100μL FACS buffer (PBS, 0.1% BSA), bổ sung

kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng. Các mẫu sau đó được phân tích bằng hệ thống máy FACS Aria III - BD.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

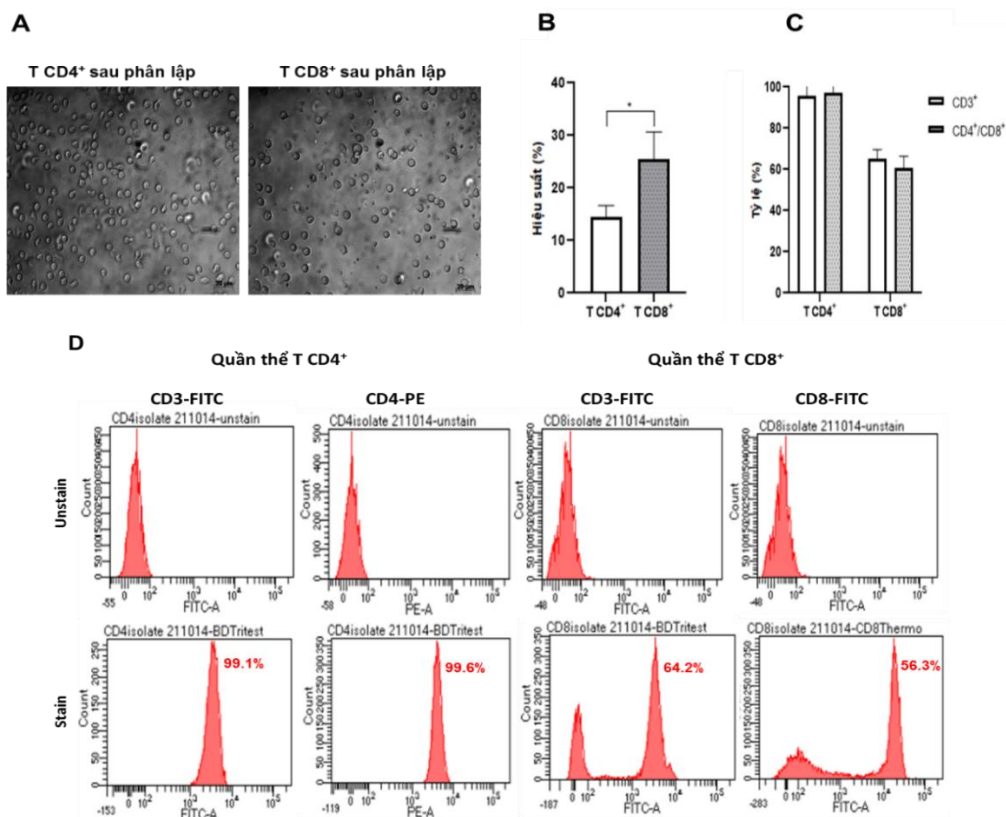
Thí nghiệm được lặp lại 03 lần với 03 lần lấy mẫu khác nhau. Kết quả được phân tích và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel và GraphPad Prism 9 phương pháp t-test, độ tin cậy 95%.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả nghiên cứu

3.1.1. Kết quả phân lập T CD4⁺ và T CD8⁺ từ PBMC

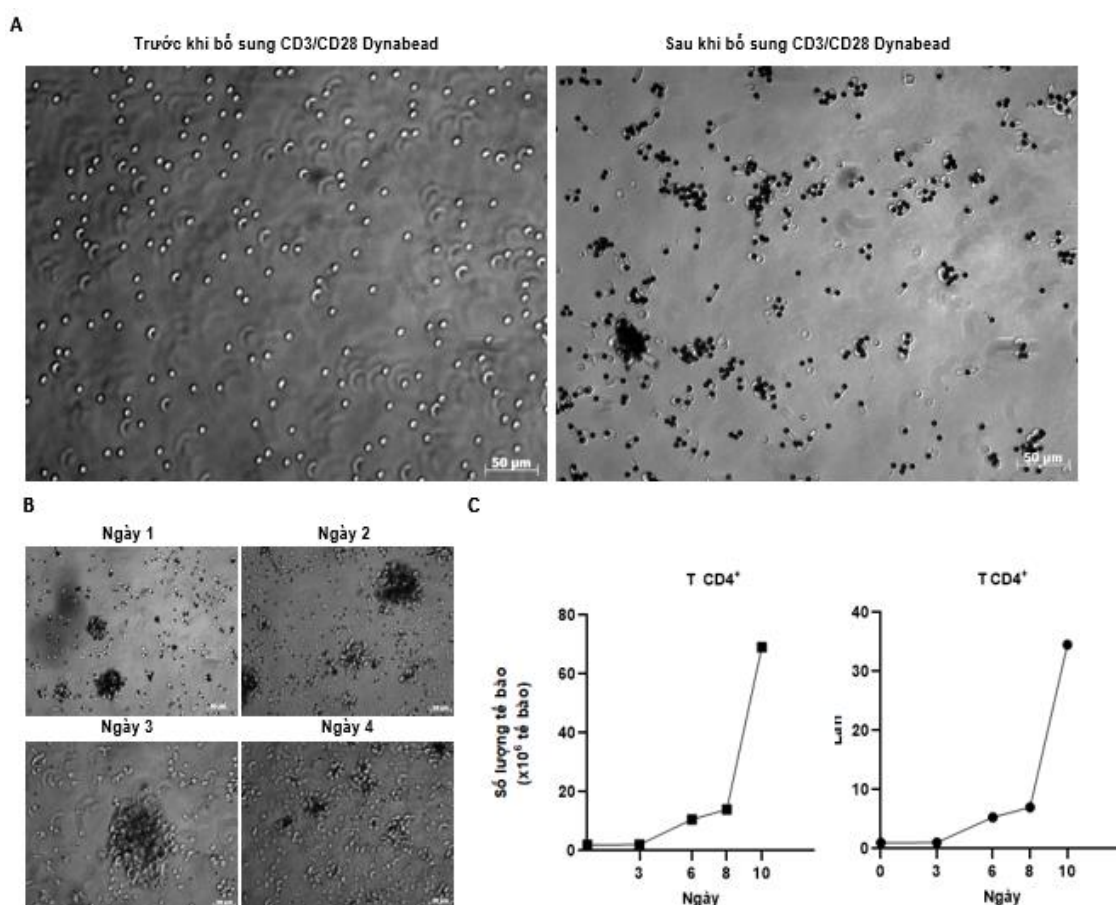
Máu thu nhận từ tình nguyện viên sẽ được tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) với Ficoll-Paque và sử dụng để phân lập quần thể T CD4⁺ và T CD8⁺. Kết quả các lần phân lập cho thấy số lượng tế bào thu nhận cao hơn có ý nghĩa ở mẫu phân lập T CD8⁺, đạt khoảng 25% so với mẫu phân lập T CD4⁺ đạt khoảng 12% (Hình 1B). Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy đối với mẫu phân lập T CD4⁺ thì hình thái tế bào đồng nhất, các tế bào ở dạng hình tròn, và không có tế bào chết khi kiểm tra với nhuộm Trypan Blue. Trái lại, đối với mẫu phân lập T CD8⁺ cho thấy bên cạnh phần lớn các tế bào dạng hình tròn, vẫn xuất hiện những dạng tế bào có kích thước nhỏ hơn (Hình 1A). Sự khác biệt này có thể là do sự khác biệt về nguyên tắc phân lập của bộ kit sử dụng, trong khi bộ kit tách T CD4⁺ là bộ kit lựa chọn dương tức là phân lập trực tiếp các tế bào có biểu hiện CD4⁺, bộ kit tách T CD8⁺ lại dựa trên nguyên tắc lựa chọn âm là loại bỏ những tế bào không biểu hiện CD8⁺. Kết quả này cũng phù hợp khi chúng tôi phân tích flow cytometry tỉ lệ tế bào CD4⁺ và CD8⁺ khi quan sát thấy gần như 100% tế bào là CD4⁺ khi tách bằng bộ kit tách CD4, ngược lại chỉ có khoảng 56% tế bào là CD8⁺ trong số tế bào thu nhận được sau tách với bộ kit tách CD8 (Hình 1C).



Hình 1. Kết quả phân lập T CD4⁺ và T CD8⁺ từ PBMC. (A) Hình chụp dưới kính hiển vi (40X) tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ sau phân lập; (B) Đồ thị biểu diễn số lượng tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ sau phân lập; (C) Phân tích tỉ lệ tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ trong quần thể tế bào sau phân lập (* $p < 0.05$)

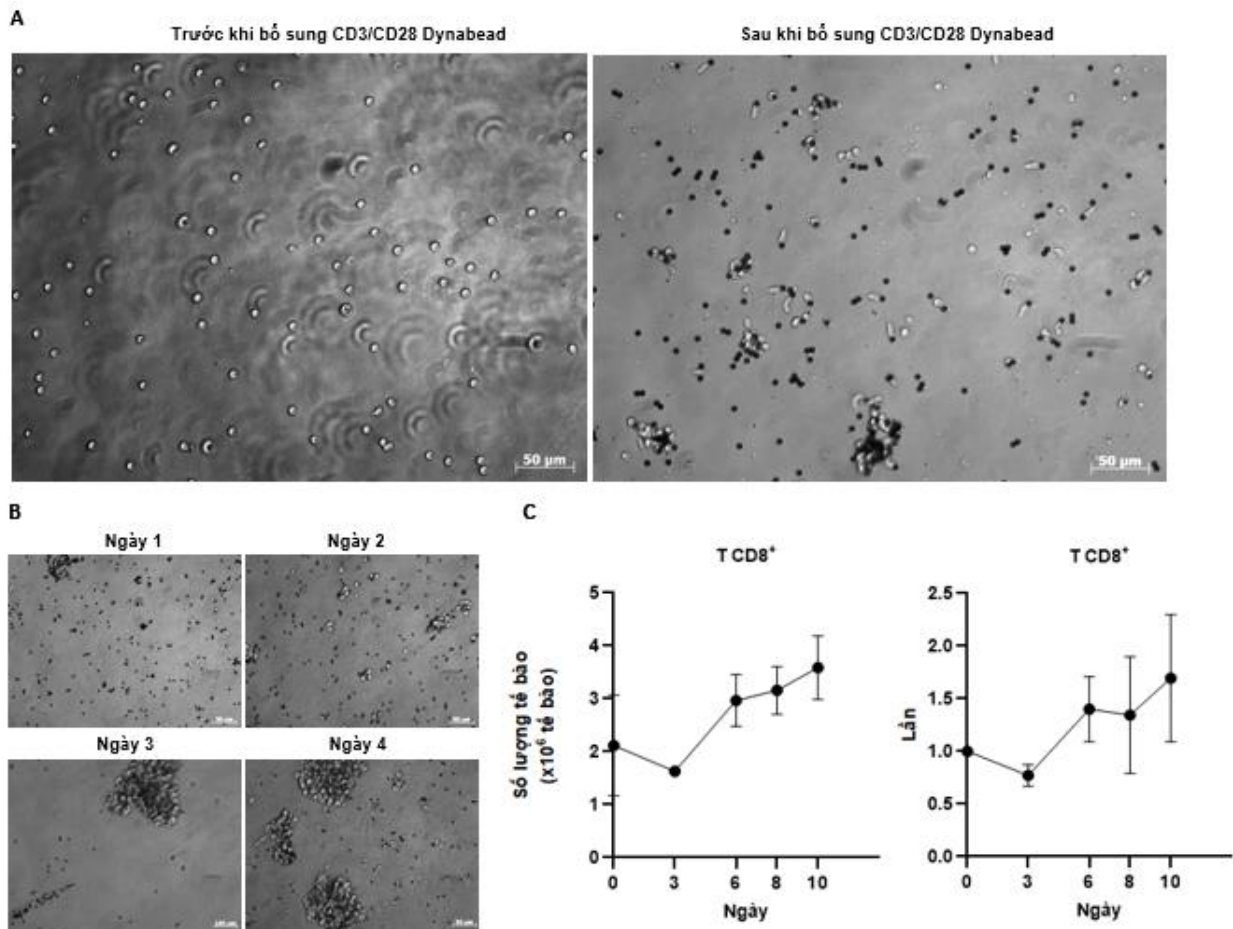
3.1.2. Kết quả nuôi tăng sinh tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺

Chúng tôi tiến hành kích hoạt và tăng sinh tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ sử dụng hạt từ phủ kháng thể CD3/CD28 với tỉ lệ hạt từ: tế bào là 1: 1 kết hợp bổ sung 30 U/mL Interleukin-2 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Dynabead Human T activator CD3/CD28, 11131D, Invitrogen). Sau 10 ngày nuôi, nhìn chung cả 02 quần thể T CD4⁺ và T CD8⁺ đều được kích hoạt thành công thông qua việc hình thành các cụm tế bào và số lượng cụm tế bào tiếp tục tăng qua các ngày nuôi cấy (Hình 2B, 3B). Kết quả này tương đồng với công bố của Ghaffari và cộng sự (2021) khi cho thấy có sự hình thành các cụm tế bào trong vòng 02 giờ đầu tiên sau kích hoạt, và tỉ lệ hạt từ: tế bào càng cao thì số lượng các cụm tế bào càng nhiều. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, khi được kích hoạt bằng hạt từ phủ CD3/CD28, tế bào có xu hướng bám vào hạt từ, tăng kích thước, và hình dạng tế bào kéo dài thay cho dạng hình tròn như bình thường (Hình 2A, 3A).



Hình 2. Kích hoạt và tăng sinh tế bào T CD4⁺. (A) Hình chụp tế bào T CD4⁺ dưới kính hiển vi (20X) trước và sau khi bổ sung hạt từ; (B) Hình chụp cụm hạt từ-tế bào T CD4⁺ dưới kính hiển vi (20X) trong 04 ngày nuôi; (C) Sơ đồ thể hiện số lượng tế bào và số lần tăng tế bào T CD4⁺

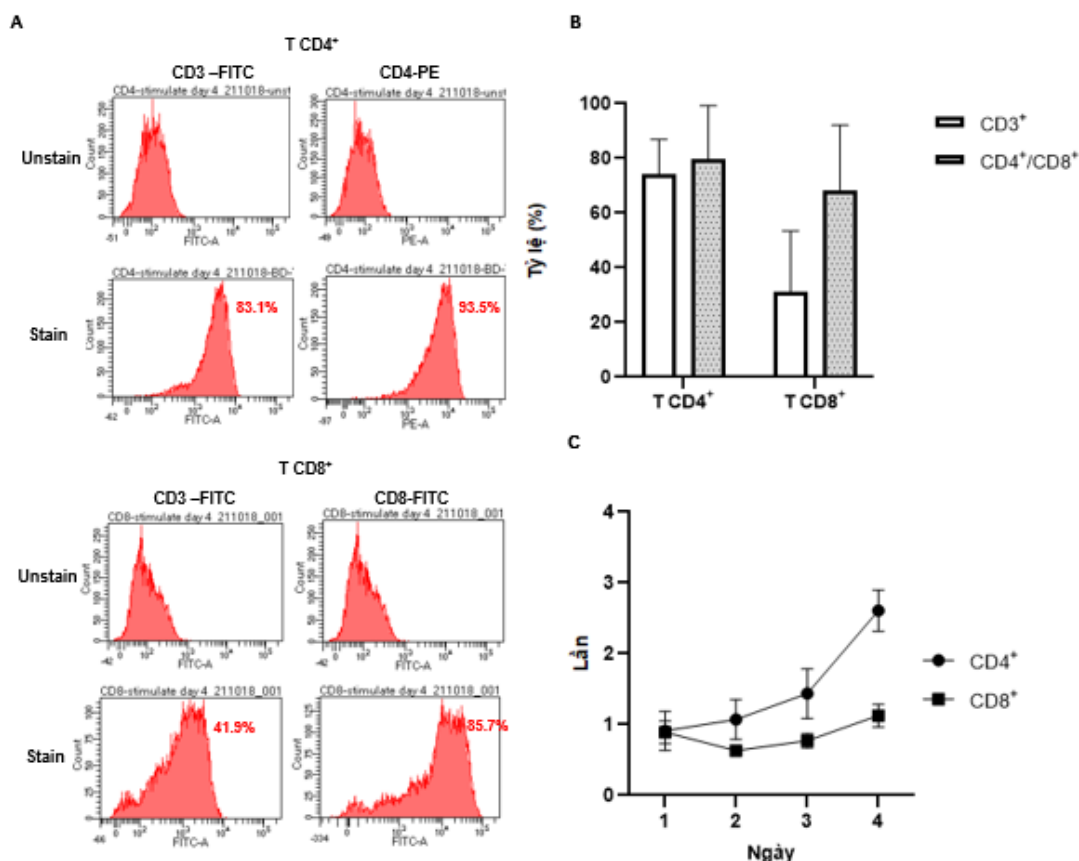
Trong 03 ngày đầu nuôi cấy, không thấy có sự khác biệt về số lượng tế bào ở cả 02 quần thể T CD4⁺ và T CD8⁺, và tế bào bắt đầu tăng sinh mạnh mẽ ở các ngày tiếp theo. Đáng chú ý, vào ngày thứ 10 nuôi cấy, tế bào T CD4⁺ có sự tăng đáng kể số lượng tế bào đạt 6.5×10^7 tế bào, tăng hơn 30 lần so với ngày đầu (Hình 2C). Trái lại, tế bào T CD8⁺ tăng sinh rất chậm và chỉ tăng 02 lần sau 10 ngày nuôi so với ban đầu (Hình 3C).



Hình 3. Kích hoạt và tăng sinh tế bào T CD8⁺. (A) Hình chụp tế bào T CD8⁺ dưới kính hiển vi (20X) trước và sau khi bổ sung hạt từ; (B) Hình chụp cụm hạt từ-tế bào T CD8⁺ dưới kính hiển vi (20X) trong 04 ngày nuôi; (C) Sơ đồ thể hiện số lượng tế bào và số lần tăng tế bào T CD8⁺

3.1.3. Đánh giá quần thể tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ sau 04 ngày nuôi cấy

Với mục đích thu nhận lượng lớn tế bào T CD4⁺ và CD8⁺ dùng để chuyển gene bằng phương pháp điện biến nạp. Theo công bố của Zhang, Qiu, Zhang, và Chen (2018), thời điểm tối ưu cho việc sốc điện thường vào ngày thứ 03 hoặc thứ 04 sau khi nuôi kích hoạt, do đây là khoảng thời gian tế bào bước vào phase log nên sẽ tăng sinh mạnh và sức sống cao nhất. Vào ngày thứ 04, quần thể tế bào T CD4⁺ bắt đầu tăng sinh mạnh và đạt số lượng tăng khoảng 2.5 lần so với ngày đầu, trong khi đó, tế bào T CD8⁺ vẫn không thấy có sự khác biệt về số lượng. Kết quả phân tích tế bào bằng flow cytometry cho thấy quần thể tế bào T CD4⁺ vẫn đảm bảo hơn 90% tế bào là CD4⁺, và tỉ lệ CD3⁺/CD4⁺ tương đồng nhau, trái lại, ở quần thể CD8⁺ có sự giảm tỉ lệ tế bào CD3⁺ trong khi tỉ lệ CD8⁺ lại tăng lên. Điều này có thể liên quan đến sự chưa thuần nhất quần thể tế bào T CD8⁺ sau phân lập, sự tăng sinh của các tế bào miễn dịch khác trong quần thể này ảnh hưởng đến tỉ lệ CD3⁺ và CD8⁺ như kết quả biểu diễn.



Hình 4. Đặc điểm quần thể tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ sau 04 ngày nuôi. (A) Kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy (flow cytometry) quần thể T CD4⁺ T CD8⁺ khi nhuộm với CD3-FITC, CD4-PE, CD8-FITC; (B) Đồ thị thể hiện tỉ lệ các quần thể CD3⁺/CD4⁺ và CD3⁺/CD8⁺; (C) Đồ thị so sánh tỉ lệ tăng sinh của quần thể CD4⁺, và CD8⁺ sau 04 ngày nuôi

3.2. Thảo luận

Tế bào T có vai trò quan trọng trong liệu pháp miễn dịch tế bào chống lại các tế bào nhiễm bệnh cũng như tế bào ung thư. Việc phân lập và nuôi cấy *ex vivo* tế bào T là bước quan trọng để thu nhận đủ số lượng tế bào để có thể can thiệp hoặc biến đổi chức năng của chúng. Các phương pháp phân lập khác nhau sẽ ảnh hưởng đến sự kích hoạt và tăng sinh quần thể tế bào T mong muốn. Nghiên cứu của Onlamoon và cộng sự (2013) cho thấy sự khác biệt giữa 03 phương pháp phân lập tế bào T CD4⁺ bao gồm phương pháp lựa chọn âm từ máu, lựa chọn dương từ PBMC và lựa chọn âm từ PBMC. Điểm thú vị là, cả 03 phương pháp đều thu nhận được phần lớn là tế bào T CD4⁺, phương pháp lựa chọn âm từ PBMC tuy cho thấy số tế bào thu nhận là cao nhất nhưng hơn một nửa trong số đó lại không phải là các tế bào T CD3⁺ so với 02 phương pháp còn lại. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân lập T CD8⁺ của chúng tôi. Khi sử dụng bộ kit theo nguyên tắc lựa chọn âm, tỉ lệ quần thể tế bào CD3⁺ thu nhận được thấp hơn so với tỉ lệ CD3⁺ thu nhận trong mẫu phân lập T CD4⁺ sử dụng bộ kit với phương pháp lựa chọn dương, với tỉ lệ CD3⁺ lần lượt là 64% và 99%.

Trong quy trình tăng sinh tế bào, mật độ nuôi cấy ban đầu là một trong những yếu tố quyết định vì chúng ảnh hưởng trực tiếp đến sự tương tác tế bào - tế bào trong môi trường nuôi cấy, và trong trường hợp của tế bào T, tế bào cần có sự tương tác với APC hoặc các tác nhân kích hoạt, và trao đổi các cytokines. Mật độ quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng đến sự tăng sinh tế bào, và tỉ lệ cân bằng giữa tế bào/không gian/diện tích là mấu chốt. Ma và cộng sự đã so sánh các mẫu nuôi tế bào với mật độ đầu vào là 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 tế bào/mL trong đĩa 06 giếng với

2mL môi trường nuôi và kết luận rằng 1×10^6 cell/mL cho kết quả tốt nhất (Ma, Wang, Lo, Gomes, & Junghans, 2010). Tham khảo kết quả các nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng mật độ nuôi cấy ban đầu là 1×10^6 tế bào/mL để nuôi cấy tăng sinh tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ và nhận thấy có sự tăng sinh đáng kể số lượng tế bào T CD4⁺ sau 10 ngày nuôi cấy đạt hơn 30 lần so với số lượng tế bào ban đầu. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả kích hoạt tế bào T CD4⁺ phân lập từ người nhiễm HIV tăng sinh khoảng 37 lần trong vòng 02 tuần, và kích hoạt PBMC từ người khỏe mạnh tăng sinh khoảng 56 lần trong vòng 03 tuần (Levine & ctg., 1998).

Các hạt từ phủ kháng thể CD3/CD28 hiện có thể được dùng thay thế cho tế bào APC để kích hoạt tế bào T. Tỷ lệ hạt từ so với tế bào cũng là yếu tố quan trọng liên quan đến sự kích thích và tăng sinh tế bào. Shi và cộng sự (2013) so sánh khả năng tăng sinh ở các tỷ lệ 1:5, 1:1 và 3:1 trong 01 tuần nuôi cấy và báo cáo rằng tỷ lệ tăng sinh tốt nhất là 3:1, và tỷ lệ tăng sinh thấp nhất là 1:5. Điều này cho thấy sự khác nhau về cường độ tín hiệu kích thích cung cấp bởi hạt từ phủ CD3/CD28 sẽ dẫn đến sự khác nhau trong tỷ lệ tăng sinh của các tế bào miễn dịch. Việc giảm tỷ lệ hạt từ-tế bào xuống còn 0,1:1 B:C dẫn đến tăng sinh tế bào NK, trong khi đó, cường độ kích thích tăng 0,5:1 dẫn đến tăng sinh tế bào T CD8⁺, và tăng cường độ kích thích lên 1:1 hạt từ-tế bào giúp quần thể tế bào T CD4⁺ tăng sinh (Martkamchan & ctg., 2016). Một nghiên cứu cho thấy việc nuôi chung các quần thể tế bào T khác nhau sẽ giúp tế bào tăng sinh tốt hơn việc nuôi riêng từng nhóm tế bào vì các thuộc tính autocrine và paracrine, ví dụ như sự tiết IL-1 từ monocyte và IL-2 từ macrophage là các yếu tố kích thích sự tăng sinh tế bào T (Trickett, Kwan, Cameron, & Dwyer, 2002). Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi nuôi riêng quần thể tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ với sự kích hoạt của hạt từ tỷ lệ 1:1 cho thấy chỉ có quần thể T CD4⁺ có sự tăng mạnh số lượng tế bào, ngược lại quần thể T CD8⁺ tăng số lượng rất chậm, chỉ đạt gấp đôi sau 10 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên khi chúng tôi nuôi tăng sinh PBMC thì lại cho thấy sự tăng mạnh số tế bào T CD8⁺, điều này cho thấy có thể sự tăng sinh của tế bào T CD8⁺ đòi hỏi nhiều yếu tố hỗ trợ từ các tế bào khác trong hệ thống miễn dịch hơn. Cần khảo sát thêm các điều kiện về tỷ lệ hạt từ - tế bào, nồng độ Interleukin-2, mật độ nuôi ban đầu, và các yếu tố đồng kích thích khác để tối ưu hóa quy trình nuôi tăng sinh ex vivo tế bào T CD8⁺.

4. Kết luận

Quần thể tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺ được kích hoạt bằng hạt từ phủ kháng thể CD3/CD28 ở tỷ lệ 01 hạt từ : 01 tế bào, bổ sung 30 U/mL IL-2. Số lượng tế bào T CD4⁺ tăng hơn 30 lần sau 10 ngày nuôi cấy, đạt 6.5×10^7 tế bào. Đối với tế bào T CD8⁺ cũng ghi nhận có sự tăng không đáng kể số lượng tế bào, đạt 3×10^6 tế bào. Như vậy chúng tôi đã có thể phân lập và nuôi cấy thành công ex vivo tế bào T CD4⁺ và T CD8⁺.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi nguồn kinh phí sự nghiệp khoa học và công nghệ được Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cấp thông qua đề tài mã số YD01/18-20. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

- Fesnak, A. D., June, C. H., & Levine, B. L. (2016). Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(9), 566-581. doi:10.1038/NRC.2016.97
- Ghaffari, S., Torabi-Rahvar, M., Aghayan, S., Jabbarpour, Z., Moradzadeh, K., Omidkhoda, A., & Ahmadbeigi, N. (2021). Optimizing interleukin-2 concentration, seeding density and bead-to-cell ratio of T-cell expansion for adoptive immunotherapy. *BMC Immunology*, 22(1), 1-9.

- Hokayem, J. El, Cukier, H. N., & Dykxhoorn, D. M. (2016). Blood derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, challenges and the road ahead. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 6(5), 1-6. doi:10.4172/2161-0460.1000275
- Janeway, C. A., Travers, P., Jr., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th ed.). New York, NY: Garland Science.
- Kleiveland, C. R. (2015). Peripheral blood mononuclear cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The impact of food bioactives on health* (pp. 161-167). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.
- Levine, B. L., Cotte, J., Small, C. C., Carroll, R. G., Riley, J. L., Bernstein, W. B., ... June, C. H. (1998). Large-scale production of CD4⁺ T cells from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation. *Journal of Hematotherapy*, 7(5), 437-448. doi:10.1089/SCD.1.1998.7.437
- Ma, Q., Wang, Y., Lo, A. S. Y., Gomes, E. M., & Junghans, R. P. (2010). Cell density plays a critical role in *Ex Vivo* expansion of T Cells for adoptive immunotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (2010), 1-13. doi:10.1155/2010/386545
- Martkamchan, S., Onlamoon, N., Wang, S., Pattanapanyasat, K., & Ammaranond, P. (2016). The effects of Anti-CD3/CD28 coated beads and IL-2 on expanded T cell for immunotherapy. *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 25(5), 821-828. doi:10.17219/ACEM/35771
- Onlamoon, N., Boonchan, M., Unpol, P., Khunweeraphong, N., Sukapirom, K., Ammaranond, P., & Pattanapanyasat, K. (2013). Influence of cell isolation method on the optimization of CD4⁺ T cell expansion using anti-CD3/CD28 coated beads. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 31(2), 99-105. doi:10.12932/AP0222.31.2.2013
- Rohaana, M. W., Wilgenhof, S., & Haanen, J. B. A. G. (2019). Adoptive cellular therapies: The current landscape. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 474(4), 449-461. doi:10.1007/S00428-018-2484-0
- Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and function of Interleukin-2 in T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 36, 411-433. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-042617-053352
- Shi, Y., Wu, W., Wan, T., Liu, Y., Peng, G., Chen, Z., & Zhu, H. (2013). Impact of polyclonal anti-CD3/CD28-coated magnetic bead expansion methods on T cell proliferation, differentiation and function. *International Immunopharmacology*, 15(1), 129-137. doi:10.1016/J.INTIMP.2012.10.023
- Trickett, A. E., Kwan, Y. L., Cameron, B., & Dwyer, J. M. (2002). *Ex vivo* expansion of functional T lymphocytes from HIV-infected individuals. *Journal of Immunological Methods*, 262(1/2), 71-83. doi:10.1016/S0022-1759(02)00018-2
- Zhang, Z., Qiu, S., Zhang, X., & Chen, W. (2018). Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1-9. doi:10.1186/S12896-018-0419-0/FIGURES/5

