

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ PHỔI A549 CỦA TẾ BÀO DIỆT TỰ NHIÊN IN VITRO

Nguyễn Thị Thuý Mậu^{1,2}, Trần Huy Thịnh¹, Đỗ Thị Thảo³, Trần Văn Khánh¹
Đỗ Thị Lệ Hằng², Lê Ngọc Anh², và Nguyễn Thanh Bình^{1,4,✉}

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội

³Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

⁴Bệnh viện Nhi Trung ương

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá hoạt tính gây độc của tế bào diệt tự nhiên (NK) được lấy từ bệnh nhân ung thư phổi đối với dòng tế bào ung thư phổi A549. Hai mẫu tế bào NK1 và NK2 (E) được hoạt hoá, tăng sinh in vitro và sau đó tiến hành đồng nuôi cấy với tế bào ung thư phổi A549 (T) với tỉ lệ E:T là 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1 trong 24 giờ và 48 giờ. Kết quả đồng nuôi cấy trong 24 giờ: ở tỉ lệ tế bào E:T lần lượt là 1:1, 2:1, 5:1 thì khả năng gây độc của tế bào NK vẫn yếu với tỉ lệ tế bào A549 sống hơn 90%. Tuy nhiên, ở tỉ lệ 10:1, 20:1 thì khả năng gây độc của tế bào NK thể hiện rõ rệt với tỉ lệ sống của tế bào A549 thấp nhất là 11,54%. Khi đồng nuôi cấy trong 48 giờ, tỷ lệ sống của tế bào A549 giảm nhiều nhất là 0,53% với tỉ lệ E:T là 20:1. Do đó, tỉ lệ sống của dòng tế bào ung thư phổi A549 bị ảnh hưởng rõ rệt, theo thời gian và theo tỉ lệ đồng nuôi cấy với tế bào NK.

Từ khóa: Tế bào diệt tự nhiên, ung thư phổi, tế bào A549.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những thập niên gần đây, đã có rất nhiều báo cáo về tầm quan trọng của hệ thống miễn dịch trong việc kiểm soát ung thư và do đó liệu pháp miễn dịch đang ngày càng thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu.^{1,2} Như một phần quan trọng trong hệ thống giám sát miễn dịch, tế bào diệt tự nhiên (NK) có khả năng gây độc với nhiều loại tế bào ung thư khác nhau ở lần tiếp xúc đầu tiên.³ Tế bào NK là tế bào dạng lympho hạt lớn, bên trong hạt chứa perforin và granzym, diệt tế bào đích khi tế bào đích giảm hoặc không biểu hiện phức hợp hòa hợp mô chủ yếu lớp I (MHC-I). Chúng chiếm tỷ lệ 10 - 15% tổng số tế bào lympho trong máu, được xác định bởi sự biểu hiện dấu ấn bề mặt CD16, CD56 và không biểu hiện bề mặt của

tế bào lympho T là CD3. Tế bào NK chia làm 2 phân lớp dựa vào mật độ thụ thể CD56 trên bề mặt: CD56dim và CD56bright. Tế bào NK trong máu ngoại vi chủ yếu là CD56dim, chiếm tới 90% với chức năng chính là gây độc tế bào, trong khi CD56bright có mặt ở hầu hết các hạch lympho với khả năng điều hoà miễn dịch và tiết số lượng lớn các cytokin như INF γ , TNF- α , IL-10, IL-13, GM-CSF.⁴ Với chức năng kiểm soát miễn dịch của cơ thể, tế bào NK giúp loại bỏ tế bào bất thường như các tế bào chuyển dạng ác tính, tế bào bị nhiễm virus, tế bào gắn với kháng thể và tế bào bị stress mà không gây tổn thương đến các tế bào bình thường của cơ thể.⁵ Phân tử MHC-I được biểu hiện ở tất cả các tế bào có nhân bình thường của cơ thể được coi là dấu ấn tự thân và không bị tấn công bởi tế bào NK. Nhiều tế bào ác tính hay tế bào nhiễm virus giảm biểu hiện MHC-I trên bề mặt để tránh sự phát hiện và tấn công của tế bào T gây độc T CD8, nhưng những tế bào

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thanh Bình

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenthanhbinh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 26/07/2023

Ngày được chấp nhận: 22/08/2023

bất thường này lại nhạy cảm với tác động tế bào NK. Ngoài ra, tế bào NK có thể nhận diện phân tử mã hóa tác nhân gây bệnh không biểu hiện trên tế bào bình thường hay các protein tự thân được tăng cường biểu hiện trên các tế bào chuyển dạng ác tính, nhiễm virus nhờ các thụ thể hoạt hóa của chúng. Bên cạnh đó, NK còn có thụ thể với phần Fc của IgG nên còn tham gia vào phức hợp gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).⁶

Song song với những tiến bộ của khoa học kĩ thuật, nền y học hiện đại đã cho ra đời nhiều phương pháp trị liệu miễn dịch dựa trên tế bào NK thông qua các hoạt động như chỉnh sửa tế bào NK, tăng độ nhạy cảm và gây độc của tế bào NK với các khối u ác tính, tăng sinh tế bào NK *in vitro* cũng như điều khiển quá trình di chuyển của chúng đến các khối u.² Ở trong điều kiện sinh lý, mô phổi có một số lượng đáng kể các tế bào NK, đây có thể là các tế bào chống ung thư quan trọng của mô phổi. Do đó, các liệu pháp miễn dịch dựa trên tế bào NK có thể mang hiệu quả đáng kể trong điều trị ung thư phổi.⁷ Một trong các liệu pháp đó, không thể không kể đến đó là liệu pháp miễn dịch tự thân. Liệu pháp này được chứng minh có độ an toàn cao và tránh được hiện tượng thải loại của hệ thống miễn dịch của cơ thể bởi các tế bào được lấy ra từ chính cơ thể người bệnh. Khi phối hợp điều trị với các phương pháp truyền thống như hoá trị, điều trị đích và sử dụng kháng thể đơn dòng, liệu pháp này đã cho những kết quả đầy hứa hẹn.⁸ Để có được các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng trên bệnh nhân như hiện nay, trước đó các nhà nghiên cứu đã phải tiến hành rất nhiều thử nghiệm để đánh giá khả năng gây độc của tế bào NK *in vitro*. Trong đó, hầu hết các thử nghiệm này đều được tiến hành thông qua việc đồng nuôi cấy tế bào đích (tế bào ung thư) và tế bào hiệu ứng (tế bào miễn dịch) với các tỷ lệ khác nhau và đánh giá theo thời gian.

Mỗi phương pháp đánh giá độc tính đều có những ưu và nhược điểm riêng, do đó, tùy từng điều kiện sẵn có của phòng thí nghiệm mà có thể sử dụng các phương pháp khác nhau.^{9,10} Tại Việt Nam, hiện tại có rất ít nghiên cứu thử nghiệm liệu pháp miễn dịch tự thân dựa trên tế bào NK trong điều trị bệnh nhân ung thư phổi. Đặc biệt hơn, cũng chưa có nghiên cứu nào đánh giá độc tính của tế bào NK trên dòng tế bào ung thư phổi *in vitro*. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu thử nghiệm đánh giá hoạt tính gây độc dòng tế bào ung thư phổi A549 của tế bào miễn dịch diệt tự nhiên ở bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Kết quả của thử nghiệm sẽ là những căn cứ có giá trị và là tiền đề quan trọng giúp cho các nhà nghiên cứu tiến hành các thử nghiệm tiếp theo trên động vật và con người.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Tế bào ung thư phổi người dòng A549

- Dòng tế bào A549 do GS. TS. Chi-Ying Huang, Trường National Yangming Chiaotung, Đài Loan cung cấp.

- Tế bào A549 được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 2 mM L - glutamin (Gibco), 1% kháng sinh (Antimycotic - antibiotic của Gibco) và 10 % huyết thanh (FBS - Gibco). Tế bào được nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong 2 - 3 ngày. Sau thời gian đó tế bào được cấy chuyển bằng cách sử dụng Trypsin - EDTA 0,025% (GIBCO) theo tỉ lệ 1:3.

Tế bào diệt tự nhiên (NK)

20 ml máu ngoại vi được lấy từ bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ, sau đó các tế bào miễn dịch được tách bằng phương pháp ly tâm thay đổi tỷ trọng sử dụng Ficoll. Các tế bào miễn dịch trong thời gian đầu được nuôi cấy trong các điều kiện nuôi cấy cơ bản, mật độ tế bào tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy từ 5×10^5 - 2

10^6 tế bào/ml. Các tế bào được hoạt hoá trong môi trường AIM-V có chứa 10% huyết thanh của bệnh nhân, có bổ sung cytokin IL-2, IL-12, IL-18 với nồng độ thích hợp. Sau giai đoạn nuôi cấy hoạt hóa, tế bào chuyển sang giai đoạn tăng sinh và được nuôi cấy trong môi trường bổ sung IL-2. Đánh giá chất lượng tế bào thu được thông qua kỹ thuật nhuộm Trypan blue và đếm bằng buồng đếm tế bào. Định danh tế bào bằng cách sử dụng kháng thể đặc hiệu của chúng và đếm bằng máy đếm dòng chảy tế bào Novocyte Flow Cytometer. Hai mẫu NK1 và NK2 có tỉ lệ sống lần lượt tại thời điểm thử nghiệm là 95% và 91% với tỷ lệ tế bào NK chiếm 60 - 70%, còn lại là tế bào NK-T, tế bào T và các tế bào khác.

2. Phương pháp

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian: 02/2022 - 02/2023.

- Địa điểm: Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn Dịch, Trường Đại học Y Hà Nội; Đơn vị tế bào trị liệu; Bệnh viện K Trung ương.

Phương pháp MTT để đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư phổi A549 của tế bào miễn dịch NK

Chuẩn bị tế bào:

- Loại bỏ môi trường trong chai nuôi cấy tế bào A549 sau đó rửa tế bào bằng PBS trước khi cho 1mL Trypsin - EDTA vào chai nuôi để làm tế bào bong tách khỏi đáy giếng. Tiếp theo, cho vào chai nuôi 5 mL môi trường vào chai tế bào, hút lên đầy xuống nhẹ nhàng rồi chuyển tế bào vào ống falcon. Ly tâm hỗn dịch tế bào ở 1000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó loại bỏ môi trường. Thêm vào ống 5mL môi trường mới, đếm số lượng tế bào trong ống, thêm môi trường để pha loãng tế bào đến nồng độ 1×10^5 tế bào/mL.

- Nuôi cấy tế bào A549 trên đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^4 tế bào/giếng trong 100 μ L môi trường nuôi cấy của tế bào, ủ trong tủ ẩm ở

37°C, 5% CO₂, trong 24 giờ.

- Sau 24 giờ, khi tế bào A549 bám dính dưới đáy giếng, hút bỏ môi trường, thu được đĩa số 1.

- Kí hiệu tế bào

+ Tế bào A549: tế bào đích (target): T.

+ Tế bào NK1/NK2: tế bào hiệu ứng (effector): E.

Thiết kế nghiên cứu

- Thí nghiệm tiến hành trên đĩa số 1 (giếng đồng nuôi cấy, giếng chứng), đĩa số 2 (giếng đối chứng nền):

- Giếng đồng nuôi cấy: bổ sung 100 μ L môi trường nuôi cấy tế bào E mới và 100 μ L tế bào E với tỷ lệ E:T là 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1.

- Giếng chứng: bổ sung 200 μ L môi trường nuôi cấy tế bào E mới, giếng chỉ có tế bào T, không cho tế bào E.

- Giếng đối chứng nền: tiến hành trên đĩa số 2 bao gồm 100 μ L môi trường tế bào E mới và 100 μ L tế bào E ở các nồng độ khác nhau như đĩa số 1.

- Mỗi giếng đều được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác.

- Đồng nuôi cấy trong 24 giờ và 48 giờ ở tủ ẩm ở 37°C, 5% CO₂.

- Sau 24 giờ hoặc 48 giờ, loại bỏ môi trường nuôi cấy ở tất cả các giếng, rửa tế bào bằng 200 μ L PBS sau đó thêm 100 μ L MTT (0,5 mg/mL trong môi trường nuôi cấy) vào mỗi giếng, và ủ trong 4 giờ ở tủ ẩm 37°C, 5% CO₂.

- Sau 4 giờ, loại bỏ môi trường, tinh thể formazan được hòa tan bằng 100 μ L (DMSO) 100%. Giá trị OD đo ở bước sóng 540nm bằng máy quang phổ BioTek.

- Phần trăm sống sót của tế bào khi có mặt mẫu thử sẽ được xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ sống sót} = \frac{OD(E/T) - OD(\text{background})}{OD(\text{negative}) - OD(\text{background})}$$

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. So sánh thống kê tỉ lệ tế bào sống giữa các tỉ lệ đồng nuôi cấy tế bào E và T với đối chứng được thực hiện bằng phân tích One-way ANOVA trên phần mềm Graphpad Prism 5. Sự

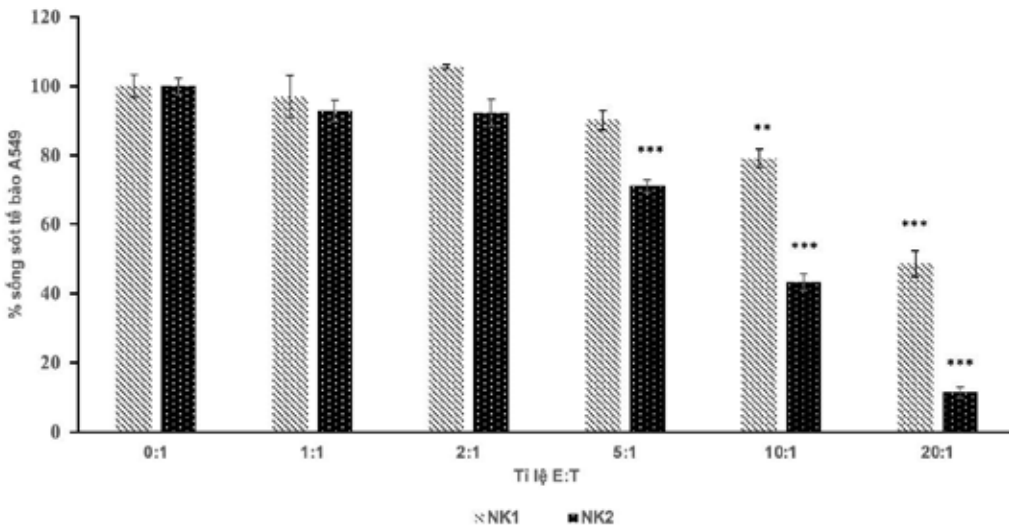
khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này thuộc đề tài đã được thông qua Hội đồng đạo đức tại Trường Đại học Y Hà Nội, mã số 1818/HMUIRB, ngày 03/08/2018.

III. KẾT QUẢ

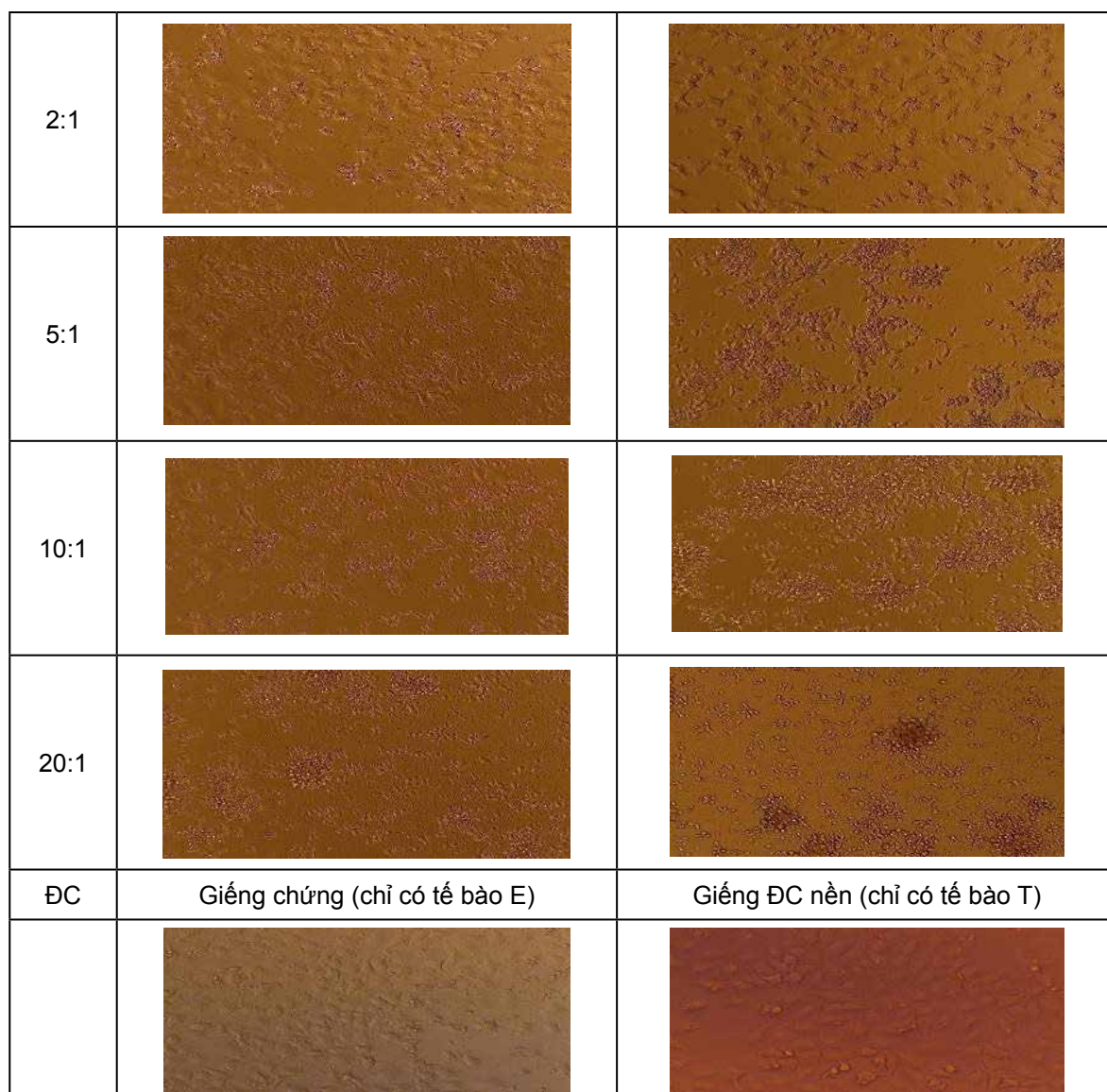
1. Tác dụng kháng tế bào ung thư phổi A549 của tế bào miễn dịch NK ở thời điểm 24 giờ



Biểu đồ 1. Tỉ lệ sống của tế bào A549 sau khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ở thời điểm 24 giờ

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với đối chứng - không đồng nuôi cấy)

Tỉ lệ E:T	NK1	NK2
1:1		

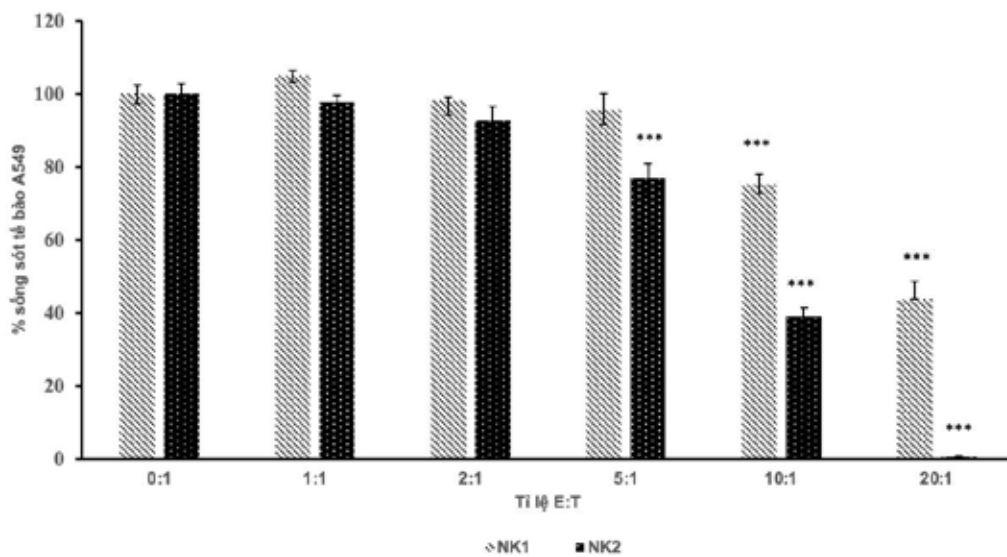


Hình 1. Hình ảnh tế bào sau 24 giờ đồng nuôi cấy của tế bào A549 và tế bào NK (Vật kính 10X, DC: đối chứng)

Tác dụng gây độc tế bào ung thư phổi A549 của tế bào NK tại thời điểm sau 24 giờ được thể hiện ở Biểu đồ 1 và Hình 1. Kết quả cho thấy, khi xử lý tế bào trong 24 giờ với tỉ lệ tế bào E:T lần lượt là 1:1, 2:1, 5:1 thì khả năng gây độc của tế bào NK vẫn yếu, với tỉ lệ sống tế bào A549 hơn 90%, ngoại trừ mẫu NK2 với tỉ lệ tế

bào E:T là 5:1 có tỉ lệ sống thấp hơn là 71,1% ($p < 0,001$). Tuy nhiên, khi tỉ lệ tế bào E:T thay đổi lần lượt là 10:1, 20:1 thì khả năng gây độc của tế bào NK thể hiện rõ rệt. Cụ thể là, tỉ lệ sống của tế bào A549 giảm thấp nhất là 11,54% ($p < 0,001$) với mẫu NK2 ở tỉ lệ E:T là 20:1.

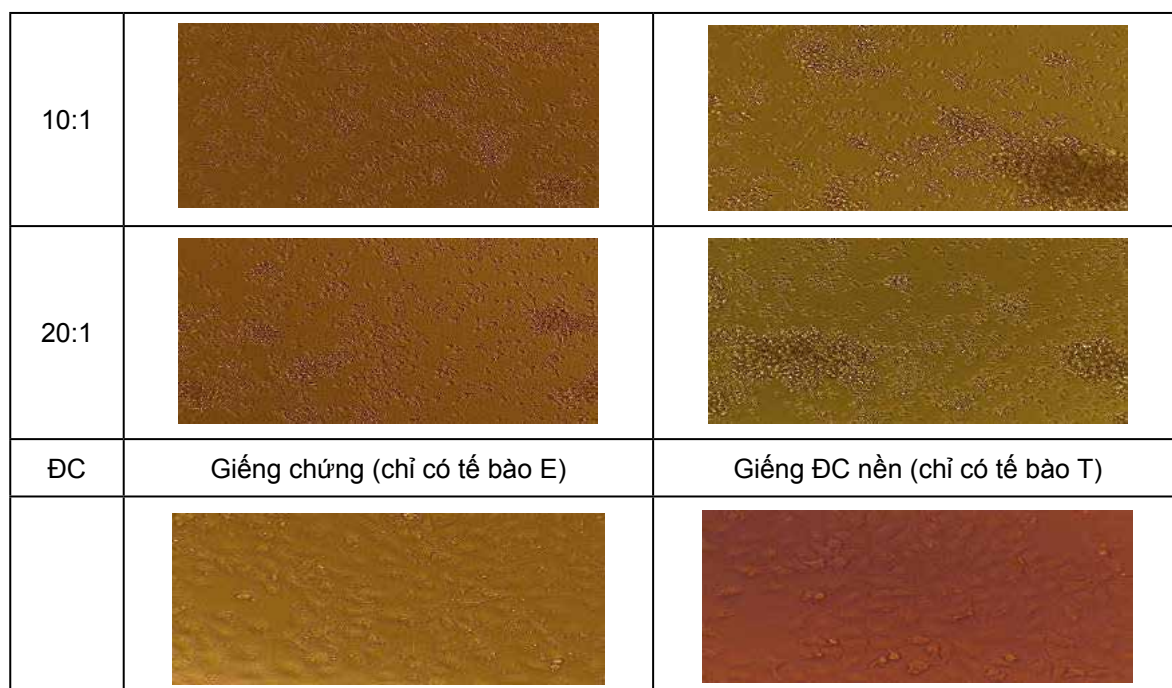
2. Tác dụng kháng tế bào ung thư phổi A549 của tế bào miễn dịch NK ở thời điểm 48 giờ



Biểu đồ 2. Tỉ lệ sống của tế bào A549 sau khi đồng nuôi cấy với tế bào NK ở thời điểm 48 giờ

(*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 so với đối chứng - không đồng nuôi cấy)

Tỉ lệ E:T	NK1	NK2
1:1		
2:1		
5:1		



Hình 2. Hình ảnh tế bào sau 48 giờ đồng nuôi cấy của tế bào A549 và tế bào NK (Vật kính 10X, DC: đối chứng)

Tác dụng gây độc tế bào ung thư phổi A549 của tế bào NK tại thời điểm sau 48 giờ được thể hiện ở Biểu đồ 2 và Hình 2. Khi xử lý tế bào trong 48 giờ với tỉ lệ tế bào E:T lần lượt là 1:1, 2:1, 5:1, tế bào NK vẫn chưa thể hiện được khả năng gây độc tế bào đích rõ rệt với tỉ lệ sống của tế bào A549 còn cao, hầu hết trên 90%, ngoại trừ 1 trường hợp có tỉ lệ sống của tế bào A549 so với đối chứng là 77,4%. Tỷ lệ sống của tế bào A549 giảm nhiều nhất khi cho đồng nuôi cấy tế bào NK với tế bào A549 ở tỉ lệ 20:1, khi đó tỉ chết của tế bào A549 ở mức thấp nhất là 0,53% ($p < 0,001$).

IV. BÀN LUẬN

Giám sát miễn dịch ung thư là một cơ chế bảo vệ của cơ thể chống lại bệnh ung thư và do tế bào NK đảm nhiệm. Tế bào NK được coi là tuyến phòng thủ đầu tiên trong cơ chế chống lại các tế bào chuyển dạng ác tính và các tế bào nhiễm virus.¹¹ Tuy nhiên, các tế bào ác tính

cũng phát triển một cơ chế nhằm trốn tránh các cơ chế bảo vệ của hệ thống miễn dịch và tạo ra một vi môi trường ức chế miễn dịch, bao gồm một số yếu tố như MICA, MICB và ULBP3 được tiết ra bởi các tế bào khối u làm giảm khả năng gây độc tế bào của NK.^{12,13} Ngoài ra, các tế bào NK còn tiết ra các yếu tố có nguồn gốc từ tế bào khối u và exosom có nguồn gốc từ khối u nhằm ức chế hoạt động của tế bào NK.¹⁴ Tất cả những yếu tố này làm giảm biểu hiện thụ thể hoạt hoá trên tế bào NK và tăng biểu hiện của các thụ thể ức chế.¹³ Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tăng sinh các tế bào NK *in vitro* đã làm tăng hiệu quả gây độc tế bào và có thể được sử dụng trong điều trị ung thư.¹⁵ Mục đích của chúng tôi khi tiến hành nghiên cứu này là nhằm đánh giá khả năng gây độc của tế bào NK tăng sinh *in vitro* lên dòng tế bào ung thư phổi A549. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi đồng nuôi cấy tế bào NK với tế bào A549 trong 24 giờ với các tỉ lệ thấp là 1:1,

2:1, 5:1 thì tỷ lệ sống của tế bào A549 vẫn còn cao, chứng tỏ lượng tế bào NK chưa đủ để gây độc tế bào A549. Thậm chí, ở mẫu NK1, khi nuôi với tỉ lệ E:T là 2:1, tế bào A549 lại thể hiện khả năng thích nghi và tăng sinh tốt. Điều này có thể thấy, môi trường nuôi cấy tế bào NK cũng có thể phù hợp với sự phát triển của dòng tế bào ung thư phổi ở mức độ nhất định. Tuy nhiên, khi tăng số lượng tế bào NK lên gấp 10 và 20 lần so với tế bào A549 thì tỉ lệ sống của tế bào A549 giảm đáng kể, thấp nhất là 11,54%, qua đó thấy được khả năng gây độc của tế bào NK tăng lên khi số lượng tế bào này tăng. Một nghiên cứu được thực hiện bởi Jun Fu và cộng sự (2020) cũng tiến hành đánh giá độc tính tế bào NK lên tế bào A549 sử dụng phương pháp MTT.⁹ Khi cho đồng nuôi cấy tế bào NK (E) với tế bào A549 (T) với tỉ lệ lần lượt là 10:1, 5:1, 2,5:1 trong 4 giờ thì tỉ lệ phần trăm tế bào A549 bị ly giải lần lượt khoảng 60%, 35%, 20%. Kết quả này cho thấy khả năng gây độc của tế bào NK cao hơn trong nghiên cứu của chúng tôi ở tỉ lệ 5:1 và 2,5:1. Điều này có thể do tế bào NK trong nghiên cứu của Jun Fu được lấy từ máu ngoại vi của người khỏe mạnh, còn nghiên cứu của chúng tôi lấy từ bệnh nhân ung thư phổi. Ngoài ra, còn khác nhau về thời gian đồng nuôi cấy và thời điểm tiến hành đo quang. Khi tiến hành đồng nuôi cấy trong 48 giờ với tỉ lệ E:T giống như đồng nuôi cấy trong 24 giờ, chúng tôi nhận thấy, với tỉ lệ E:T thấp 1:1, 2:1, 5:1 thì phần trăm sống của tế bào A549 không thay đổi nhiều so với khi đồng nuôi cấy 24 giờ. Tuy nhiên, phần trăm sống của tế bào A549 giảm mạnh khi số lượng của tế bào NK tăng lên với tỉ lệ E:T là 10:1 và 20:1 và giảm nhiều hơn ở thời điểm đồng nuôi cấy 24 giờ. Điều này một lần nữa khẳng định, số lượng tế bào NK và thời gian tiếp xúc với tế bào đích có thể đóng vai trò quyết định khả năng gây độc lên tế bào đích. So sánh với một nghiên cứu khác thực hiện năm 2017 của Li Yang và cộng sự, nghiên

cứu đánh giá độc tính của tế bào NK đối với tế bào ung thư phổi A549 bằng thử nghiệm giải phóng enzyme lactate dehydrogenase (LDH). Đây là một phương pháp khác được sử dụng trong phân tích khả năng sống của tế bào dựa trên hoạt động của LDH được giải phóng từ các tế bào bị hư hỏng hoặc chết vào môi trường. LDH được biết đến như một loại enzyme tế bào chất được tìm thấy trong tất cả các tế bào. Khi các tế bào tiếp xúc với các tác động độc hại, tính toàn vẹn màng plasma của chúng bị phá vỡ và enzyme LDH rò rỉ từ các tế bào và truyền vào môi trường. Do đó, sau khi tiếp xúc, hoạt động của enzyme LDH được đo lường qua đó đánh giá độc tính của tế bào NK. Trong nghiên cứu của chúng tôi sử dụng phương pháp MTT, là phương pháp xác định và đánh giá khả năng gây độc và tăng sinh tế bào. Hoạt tính độc tế bào đánh giá qua tỷ lệ sống của tế bào được xác định nhờ hoạt tính enzym succinat dehydrogenase (SDH) của ty thể chỉ có trong tế bào sống. SDH chuyển MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid)] thành tinh thể formazan tan trong dung môi hữu cơ như isopropanol tạo dung dịch màu tím được đo mật độ quang OD ở bước sóng 570nm, sẽ phản ánh số lượng tế bào sống trong mẫu nuôi cấy. Xác định được số lượng tế bào sống của mẫu nuôi cấy từ đó sẽ kết luận được khả năng gây độc của tế bào NK. Thí nghiệm của Li Yang thực hiện với tỉ lệ E:T là 1:1, 5:1, 15:1 đồng nuôi cấy trong 4 giờ, kết quả cho thấy phần trăm độc tính NK lần lượt khoảng 37%, 45% và 55%.¹⁰ Kết quả thử nghiệm này cho thấy khả năng gây độc của tế bào NK lấy từ máu ngoại vi ở người khỏe mạnh tốt hơn tế bào NK lấy từ máu ngoại vi ở bệnh nhân ung thư phổi như trong nghiên cứu của chúng tôi. Tóm lại, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá được khả năng gây độc của hai mẫu tế bào NK (NK1 và NK2) lên dòng tế bào ung thư phổi A549. Kết quả nghiên cứu

của chúng tôi khá tương đồng với các nghiên cứu đã thực hiện trước đó, khi tăng số lượng tế bào hiệu ứng so với tế bào đích thì khả năng gây độc của các tế bào hiệu ứng càng cao. Qua đó, cho thấy, các tế bào miễn dịch NK lấy từ máu ngoại vi của người bệnh được tăng sinh *in vitro* vẫn đảm bảo được chức năng gây độc của chúng. Điều này là cơ sở lý luận quan trọng cho các bước thử nghiệm tiếp theo trên động vật và con người.

V. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi đồng nuôi cấy tế bào ung thư phổi A549 với tế bào miễn dịch diệt tự nhiên NK1 và NK2 đã khiến tỉ lệ sống của tế bào ung thư phổi dòng A549 bị ảnh hưởng rõ rệt, theo thời gian và theo tỉ lệ đồng nuôi cấy.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS074. Tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 2016; 21(5): 821-833. doi:10.1111/resp.12789.
2. Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19(3): 200-218. doi:10.1038/s41573-019-0052-1.
3. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011; 331(6013): 44-49. doi:10.1126/science.1198687.
4. Dianat-Moghadam H, Rokni M, Marofi F, Panahi Y, Yousefi M. Natural killer cell-based immunotherapy: From transplantation toward targeting cancer stem cells. *J Cell Physiol*. 2018; 234(1): 259-273. doi:10.1002/jcp.26878.
5. Farag SS, Caligiuri MA. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*. 2006; 20(3): 123-137. doi:10.1016/j.blre.2005.10.001.
6. Cancer Immunotherapy Principles and Practice, Second Edition. Accessed July 19, 2023. <https://www.springerpub.com/cancer-immunotherapy-principles-and-practice-second-edition-9780826137425.html>.
7. Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*. 2009; 128(2): 151-163. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03167.x.
8. Tartour E, Zitvogel L. Lung cancer: potential targets for immunotherapy. *Lancet Respir Med*. 2013; 1(7): 551-563. doi:10.1016/S2213-2600(13)70159-0.
9. Fu J, Mao J, Wang C. The microRNA-152/human leukocyte antigen-G axis affects proliferation and immune escape of non-small cell lung cancer cells. *J Int Med Res*. 2020; 48(11): 0300060520970758. doi:10.1177/0300060520970758.
10. Yang L, Shen M, Xu LJ, et al. Enhancing NK cell-mediated cytotoxicity to cisplatin-resistant lung cancer cells via MEK/Erk signaling inhibition. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 7958. doi:10.1038/s41598-017-08483-z.
11. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(1): 74-82. doi:10.1200/JCO.2014.57.3329.
12. Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001; 166(1): 678-689. doi:10.4049/jimmunol.166.1.678.

13. Barsoum IB, Hamilton TK, Li X, et al. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer Res.* 2011; 71(24): 7433-7441. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2104.
14. Baginska J, Viry E, Paggetti J, et al. The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2013; 4:490. doi:10.3389/fimmu.2013.00490.
15. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest.* 2011; 121(9): 3609- 3622. doi:10.1172/JCI45816.

Summary

CYTOTOXICITY OF NATURAL KILLER CELLS AGAINST A549 LUNG CANCER CELLS IN VITRO

The purpose of this investigation was to evaluate the cytotoxic activity of natural killer (NK) cells isolated from lung cancer patients against the lung cancer (A549) cell line. Two samples of NK1 and NK2 cells (E) were activated, proliferated in vitro, and co-cultured with A549 cells (T) with E:T ratios of 1:1, 2:1, 5:1, 10:1, and 20:1 for 24 and 48 hours, respectively. Results of co-culturing for 24 hours indicated that at the ratios of E: T cells of 1:1, 2:1, and 5:1, respectively, the cytotoxicity of NK cells was still limited, with the survival rate of A549 cells exceeding 90%. However, at a ratio of 10:1 and 20:1, the cytotoxicity of NK cells was obviously demonstrated, with an A549 cell survival rate of 11.54%. With an E:T ratio of 20:1, the A549 cell survival rate dropped to as low as 0.53% after 48 hours of co-cultivation. Consequently, when co-culturing A549 lung cancer cells with natural killer cells, the survival rate of A549 lung cancer cells was significantly affected over time, as was the rate of co- culture.

Keywords: Natural killer cells, lung cancer, A549 cells.