

XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN MARN CỦA GEN *IFN γ* TRÊN TẾ BÀO NUÔI GAMMA DELTA T Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

Nguyễn Thị Thuý Mậu¹, Đào Xuân Đạt², Trần Văn Khánh²
Trần Huy Thịnh², Hồ Mỹ Dung¹, Đỗ Thị Lệ Hằng¹
và Nguyễn Thanh Bình^{2,3,✉}

¹Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Trường Đại học Y Hà Nội

³Bệnh viện Nhi Trung ương

Nghiên cứu nhằm xây dựng quy trình đánh giá biểu hiện mARN của gen *IFN γ* trên tế bào γδT được nuôi cấy từ bệnh nhân ung thư phổi, thông qua kỹ thuật Real-time PCR. Đây là bước tiền đề để chứng minh vai trò của tế bào γδT và cytokin *IFN γ* trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư phổi tại Việt Nam. Nghiên cứu được thực hiện trên 10 mẫu máu toàn phần từ bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Các tế bào γδT được phân lập và nuôi cấy trong 14 ngày. Sau đó, RNA tổng số được tách chiết, tổng hợp ngược thành cDNA và thực hiện Real-time PCR bán định lượng để đánh giá mức độ biểu hiện gen *IFN γ* . Biểu hiện gen được so sánh giữa hai thời điểm: trước và sau nuôi cấy. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện mARN của gen *IFN γ* tăng rõ rệt sau 14 ngày nuôi cấy tế bào γδT, với mức tăng trung bình $3,21 \pm 1,42$ lần so với trước nuôi cấy. Việc tối ưu hóa nhiệt độ gắn mồi (55°C) và nồng độ mồi ($14,2 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ cho $\beta\text{-actin}$, $12 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ cho *IFN γ*) đã đem lại kết quả điện di và biểu hiện gen rõ ràng, đặc hiệu. Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình đánh giá biểu hiện mARN của gen *IFN γ* bằng Real-time PCR trên tế bào γδT nuôi cấy từ bệnh nhân ung thư phổi.

Từ khoá: Tế bào γδT, cytokin *IFN γ* , ung thư phổi, biểu hiện gen.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong máu ngoại vi người, phần lớn các tế bào lympho T biểu hiện thụ thể T-cell receptor alpha/beta (TCR- $\alpha\beta$), còn gọi là tế bào αβT. Tuy nhiên, có khoảng 1 – 10% tế bào lympho T biểu hiện TCR gamma/delta (TCR-γδ), tế bào γδT.^{1,2} Mặc dù, chiếm tỷ lệ thấp trong quần thể tế bào lympho T, tế bào γδT lại giữ vai trò đặc biệt quan trọng trong miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch chống ung thư nhờ khả năng nhận biết các phân tử stress hoặc các tín hiệu không

điển hình do tế bào ung thư phát ra.³

Trong vài năm gần đây, ngày càng có nhiều nghiên cứu cho thấy tế bào γδT có tiềm năng ứng dụng lớn trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư, đặc biệt là ung thư phổi không tế bào nhỏ. Những tế bào này có thể được kích hoạt và mở rộng *ex vivo*, sau đó được truyền lại vào cơ thể người bệnh như một liệu pháp miễn dịch tế bào nhằm tăng cường khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Chúng tham gia vào đáp ứng miễn dịch bằng nhiều cơ chế như tiết perforin, granzym, biểu hiện FasL, TRAIL và quan trọng là sản xuất các cytokin như *IFN γ* – một cytokin đóng vai trò trung tâm trong điều hòa miễn dịch và tiêu diệt tế bào khối u.³

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thanh Bình

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: nguyenthanhbinh@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 29/04/2025

Ngày được chấp nhận: 20/05/2025

IFN γ có khả năng kích hoạt các đại thực bào, tăng biểu hiện MHC, thúc đẩy hoạt tính tế bào T gây độc, điều hòa phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và hỗ trợ quá trình tiêu diệt khối u.⁴ Ngoài ra, IFN γ còn ảnh hưởng đến sự biệt hóa tế bào T, thúc đẩy trình diện kháng nguyên, tăng cường biểu hiện thụ thể Fas trên bề mặt tế bào đích, từ đó hỗ trợ cơ chế gây chết theo chương trình của tế bào ung thư.⁵ Mức độ phiên mã của gen *IFN γ* trong tế bào yDT là một trong những chỉ số phản ánh khả năng hoạt hóa và hiệu quả tiềm năng của tế bào này trong trị liệu ung thư. Vì vậy, việc đánh giá biểu hiện mARN *IFN γ* là một trong những bước quan trọng để xác định chất lượng và hiệu quả của tế bào yDT sau khi được nuôi cấy và kích hoạt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình đánh giá biểu hiện mARN *IFN γ* trên tế bào yDT được nuôi cấy từ máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi bằng phương pháp Real-time PCR. Kết quả nghiên cứu sẽ cho thấy mức độ biểu hiện gen *IFN γ* , từ đó thấy rõ vai trò của tế bào yDT trong cơ chế miễn dịch kháng u, đồng thời đặt nền móng cho các ứng dụng lâm sàng trong tương lai.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm

10 mẫu máu toàn phần (mỗi mẫu khoảng 10 - 20ml) được lấy từ tĩnh mạch của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ tại bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 01/2022 đến tháng

11/2022. Sau đó các mẫu tế bào nuôi yDT (2 ml môi trường với mật độ tế bào $\geq 2 \times 10^5$ tế bào/ml) ở 2 thời điểm ngày 0 và ngày thu hoạch được lấy ra và lưu -80 $^{\circ}$ C cho đến khi sử dụng.

2. Phương pháp

Kỹ thuật tách chiết RNA tổng số (thực hiện theo quy trình khuyến cáo của hãng)

Quy trình tách chiết RNA tổng số từ mẫu tế bào sử dụng RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA): RNA được tách bằng 600 μ l RLT và ly tâm 15.000 vòng/phút ở 4 $^{\circ}$ C trong 2 phút. Làm rửa RNA bằng 600 μ l dung dịch ethanol 70 $^{\circ}$ và ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4 $^{\circ}$ C trong 16 giây. Rửa rửa lần lượt bằng dung dịch RW1, RPE, ly tâm thu hồi rửa và sau đó hoà tan bằng 30 μ l nước sạch RNase ở nhiệt độ phòng 1 phút, ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4 $^{\circ}$ C trong 1 phút thu được RNA tổng số.

Kỹ thuật tổng hợp ngược cDNA (RT-PCR)

Quy trình sử dụng qScript cDNA Synthesis Kit (QuantaBio, USA) theo khuyến cáo của hãng : Thể tích 20 μ l gồm: 4 μ l dung dịch phản ứng Master mix (5X), 500ng RNA (tương ứng khoảng 5 μ l), 1 μ l qScript reverse transcriptase (20X), nước cất. Chu trình nhiệt: 22 $^{\circ}$ C - 5 phút, 42 $^{\circ}$ C - 30 phút, 85 $^{\circ}$ C - 5 phút, - 4 $^{\circ}$ C giữ. Sản phẩm được sử dụng ngay cho phản ứng Real-time PCR hoặc bảo quản ở -20 $^{\circ}$ C.

Phản ứng PCR tối ưu nhiệt độ gắn mỗi sử dụng mỗi của gen β -actin (gen nội chuẩn) và IFN γ

Bảng 1. Trình tự cặp mồi đặc hiệu với gen *IFN γ* và β actin^{6,7}

Tên gen	Trình tự mồi	Độ dài sản phẩm
β actin	5'- TCC ACC TTC CAG CAG ATG TG - 3'	75 bp
	5'- GCA TTT GCG GTG GAC GAT- 3'	
IFN γ	5'- CAT GTA TTG CTT TGC GTT GG - 3'	149 bp
	5'- TGA CCA GAG CAT CCA AAA GA - 3'	

Thành phần phản ứng PCR: Thể tích 25 μ l gồm: 12,5 μ l DreamTaq PCR Mastermix 2X, 0,5 μ l mỗi F (10X), 0,5 μ l mỗi R (10X), 6,5 μ l H₂O, 5 μ l cDNA.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút, 40 chu kỳ x [95°C trong 30 giây, gắn mỗi theo gradient nhiệt [53:63]°C trong 40 giây, 72°C trong 30 giây], thời gian kéo dài cuối 72°C trong 3 phút.

Sản phẩm phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 2% và nhuộm với Syber safe, sau đó được chụp ảnh và xử lý bằng phần mềm chuyên dụng. Tỷ lệ đậm độ vạch của gen *β -actin* và *IFN γ* sẽ được so sánh và từ đó chọn được nhiệt độ gắn mỗi tối ưu.

Phản ứng Real-time PCR tối ưu nồng độ mỗi gen *β -actin* (gen nội chuẩn) và gen *IFN γ*

Thành phần phản ứng Real-time PCR: Thể tích 25 μ l gồm: 12,5 μ l Fast SYBR Green Master Mix 2X, 0,5 μ l mỗi F (gen *β -actin* (3,8; 7,6; 15,2 pmol/ μ l); gen *IFN γ* (2,9; 5,8; 11,6 pmol/ μ l)), 0,5 μ l mỗi R (gen *β -actin* (3,3; 6,6; 13,2 pmol/ μ l); gen *IFN γ* (3,1; 6,2; 12,4 pmol/ μ l)), 5 μ l cDNA, 6,5 μ l H₂O.

Chu kỳ phản ứng Real-time PCR gồm 3 giai đoạn: tương tự như chu kỳ phản ứng PCR với nhiệt độ gắn mỗi tối ưu đã xác định nhờ quy trình bên trên.

Giải trình tự sản phẩm PCR *IFN γ* : để xác định trình tự gen được khuếch đại, chúng tôi giải trình tự sản phẩm PCR *IFN γ* sử dụng máy phân tích DNA tự động 3500 Applied Biosystems và kit BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems).

Sử dụng kỹ thuật Real-time PCR bán định lượng sau khi đã tối ưu để đánh giá mức độ

biểu hiện mRNA của cytokin *IFN γ* tiết ra từ tế bào nuôi γδT

Mức độ biểu hiện mRNA của các cytokin *IFN γ* ở tế bào lympho được đánh giá tại 2 thời điểm trước và sau khi nuôi cấy hoạt hóa, đồng thời so sánh với gen nội chuẩn *β -actin*. Việc so sánh mức độ biểu hiện mRNA được thực hiện nhờ phương pháp 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} của Livak:

- Ct(T/Tg): là chu kỳ ngưỡng của gen đích (Tg) trong mẫu tế bào trước hoạt hóa.

- Ct(T/Ref): là chu kỳ ngưỡng của gen nội chuẩn *β -actin* (Ref) trong mẫu tế bào trước hoạt hóa. Ct(S/Tg): là chu kỳ ngưỡng của gen đích (Tg) trong mẫu tế bào sau hoạt hóa.

- Ct(S/Ref): là chu kỳ ngưỡng của gen tham chiếu (Ref) trong mẫu tế bào sau hoạt hóa.

- Đánh giá mức độ biểu hiện gen bằng cách tính hiệu số chênh lệch Ct của gen đích với gen nội chuẩn: Trước hoạt hóa: DCt(T) = Ct(T/Tg) - Ct(T/Ref)

- Sau hoạt hóa: DCt(S) = Ct(S/Tg) - Ct(S/Ref)

- Hiệu số chênh lệch Δ Ct(S) với Δ Ct(T): $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(S) - Δ Ct(T)

Từ đó tính ra tỷ lệ biểu hiện của gen đích trên mẫu tế bào sau hoạt hóa so với trước hoạt hóa, nếu hiệu quả PCR của cả hai đều đạt 100%, là $R = 2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này là một phần của nghiên cứu lớn 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

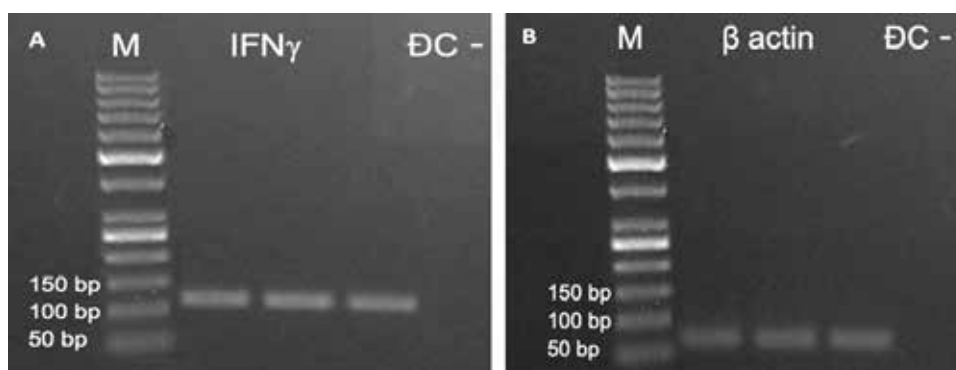
1. Tối ưu nhiệt độ gắn mỗi khuếch đại gen *β -actin* và gen *IFN γ*



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 2% của thí nghiệm PCR tối ưu nhiệt độ gắn mỗi khuếch đại gen β -actin và gen $IFN\gamma$. Làn M: 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Làn ĐC(-): đối chứng âm

Nhận xét: Sau khi tách chiết RNA và tổng hợp ngược cDNA, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với dải nhiệt độ gắn mỗi từ 53°C đến

63°C. Kết quả điện di gel agarose 2% cho thấy nhiệt độ 55°C là tối ưu cho cả hai gen khi cho băng sáng, rõ và đặc hiệu cao.

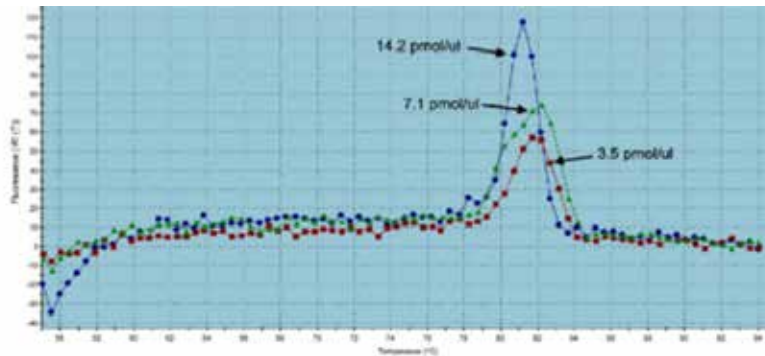


Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 2% của thí nghiệm PCR với nhiệt độ gắn mỗi tối ưu (55°C) khuếch đại gen $IFN\gamma$ (Hình A) và gen β -actin (Hình B) trên 3 mẫu Làn M: 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Làn ĐC(-): đối chứng âm

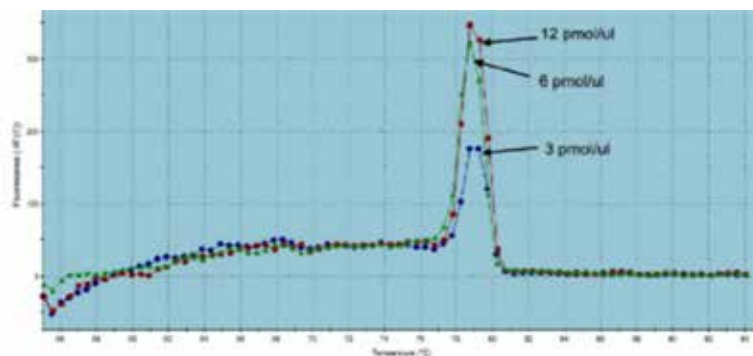
Nhận xét: Hình ảnh điện di cho thấy kết quả kiểm tra sản phẩm với nhiệt độ gắn mỗi tối ưu (55°C): 3 mẫu đều lên băng sáng rõ, không xuất hiện băng phụ mặc dù chúng tôi có sử dụng nồng độ mỗi ở mức cao (10X), độ đặc hiệu cao. Sử dụng thang chuẩn DNA 50bp cho thấy sản phẩm thu được phù hợp với kích thước theo lý thuyết ban đầu.

2. Tối ưu nồng độ mỗi khuếch đại gen β -actin và gen $IFN\gamma$

Để tối ưu nồng độ mỗi gen β -actin (gen nội chuẩn) và gen $IFN\gamma$, chúng tôi sử dụng phản ứng Real-time PCR với nồng độ mỗi là 3,5 pmol/ul, 7,1 pmol/ul, 14,2 pmol/ul cho gen β -actin; 3 pmol/ul, 6 pmol/ul, 12 pmol/ul cho gen $IFN\gamma$.



Hình 3. Kết quả tối ưu nồng độ môi khuếch đại gen *β-actin*



Hình 4. Kết quả tối ưu nồng độ môi khuếch đại gen *IFNγ*

Nhận xét: Thí nghiệm Real-time PCR với nhiều nồng độ môi đã xác định rằng: nồng độ 14,2 pmol/μl cho gen *β-actin* và 12 pmol/μl

cho gen *IFNγ* cho đỉnh melting curve đặc hiệu duy nhất.

3. Giải trình tự sản phẩm PCR gen *IFNγ*



Hình 5. Kết quả giải trình tự khuếch đại gen *IFNγ*

Nhận xét: Kết quả giải trình tự xác nhận đoạn gen được khuếch đại trong phản ứng PCR bằng công cụ BLAST trên NCBI cho thấy mức độ tương đồng 99,8% so với trình tự tham chiếu NM_000619.2. Điều này xác nhận, đoạn

gen thu được chính xác là vùng mục tiêu thuộc gen *IFN γ* .

4. Biểu hiện mARN *IFN γ* trước và sau nuôi cấy tế bào yDT

Bảng 2. Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện mARN của gen *IFN γ* trước và sau nuôi cấy trên 10 BN UTPKTBN

Mã bệnh nhân	Trước nuôi cấy		Sau nuôi cấy		$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Ct β -actin	Ct <i>IFNγ</i>	Ct β -actin	Ct <i>IFNγ</i>		
MD-GD01	21,54	32,57	20,56	29,48	-2,11	4,32
MD-GD02	19,67	31,51	19,5	29,81	-1,53	2,89
MD-GD03	18,42	30,33	16,53	28,16	-0,28	1,21
MD-GD04	20,24	31,56	20,17	28,98	-2,51	5,70
MD-GD05	19,51	31,56	18,68	29,73	-1	2,00
MD-GD06	18,75	29,67	19,42	28,15	-2,19	4,56
MD-GD07	20,12	31,45	19,54	28,96	-1,91	3,76
MD-GD08	20,13	29,73	19,68	28,64	-0,64	1,56
MD-GD09	16,43	29,47	16,88	28,47	-1,45	2,73
MD-GD10	18,84	29,59	19,31	28,33	-1,73	3,32
$\bar{X} \pm SD$						$3,21 \pm 1,42$

Nhận xét: Sau 14 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh, mức độ biểu hiện của gen *IFN γ* trên 10 mẫu bệnh nhân đều tăng, trung bình là $3,21 \pm 1,42$ lần so với ngày đầu tiên, cao nhất đạt tới 5,7 lần.

IV. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình đánh giá biểu hiện mARN *IFN γ* trên tế bào yDT sau khi nuôi cấy 14 ngày được thiết lập thành công và có tính đặc hiệu cao. Việc tối ưu nhiệt độ gắn mồi ở 55°C là một yếu tố kỹ thuật quan trọng giúp tăng cường độ chính xác và hiệu quả

của phản ứng khuếch đại, phù hợp với lý thuyết về điều kiện nhiệt độ lý tưởng trong phản ứng PCR.⁸ Sự hiện diện của băng đặc hiệu rõ nét trên gel điện di cho cả hai gen β -actin và *IFN γ* khẳng định tính hiệu quả của điều kiện này.

Tương tự, việc lựa chọn đúng nồng độ mồi là yếu tố then chốt ảnh hưởng đến tính đặc hiệu và hiệu suất của phản ứng Real-time PCR. Nồng độ mồi tối ưu được xác định là 14,2 pmol/ μ l đối với gen nội chuẩn β -actin và 12 pmol/ μ l đối với gen đích *IFN γ* . Kết quả đường cong nóng chảy (melting curve) cho thấy mỗi phản ứng chỉ xuất hiện một đỉnh đặc hiệu duy nhất,

loại bỏ khả năng tạo sản phẩm phụ, từ đó tăng độ tin cậy cho phân tích biểu hiện gen.⁹ Ngoài ra, kết quả giải trình tự sản phẩm PCR khuếch đại từ gen *IFN γ* đã xác nhận đoạn khuếch đại chính xác là vùng mong muốn. Đoạn gen *IFN γ* được khuếch đại trong phản ứng PCR có chiều dài 149 bp, nằm trong vùng mã hóa của gen *IFN γ* trên mRNA tham chiếu NM_000619.2 (GenBank, Homo sapiens). Toàn bộ trình tự mRNA của gen *IFN γ* dài 1833 bp, bao gồm cả vùng 5'UTR, vùng mã hóa và 3'UTR. Việc khuếch đại thành công đoạn gen đặc hiệu với độ dài phù hợp lý thuyết cho thấy tính chính xác của thiết kế mồi và độ đặc hiệu của phản ứng PCR.

Về kết quả biểu hiện gen, sau 14 ngày nuôi cấy, biểu hiện *IFN γ* trên tế bào yDT tăng trung bình $3,21 \pm 1,42$ lần so với thời điểm trước nuôi cấy. Mức tăng này có ý nghĩa sinh học rõ rệt, thể hiện hoạt tính miễn dịch được tăng cường sau khi kích thích và nuôi cấy tế bào. Điều này phù hợp với công bố trước đó của Nguyễn Quý Linh, trong đó tế bào yDT được nuôi cấy với cytokine cho thấy khả năng tiết *IFN γ* mạnh hơn so với tế bào chưa hoạt hóa.¹⁰

Sự tăng biểu hiện *IFN γ* là một trong những chỉ số quan trọng để đánh giá chức năng và hiệu quả miễn dịch của tế bào yDT, đặc biệt trong nghiên cứu ứng dụng tế bào miễn dịch vào điều trị ung thư.^{11,12} *IFN γ* là cytokine có vai trò trung tâm trong việc kích hoạt đại thực bào, tăng trình diện kháng nguyên và ức chế sự phát triển của tế bào khối u. Do đó, sự gia tăng *IFN γ* có thể phản ánh tiềm năng tiêu diệt tế bào ung thư và hiệu quả của phương pháp nuôi cấy trong việc tăng cường chức năng tế bào yDT. Kết quả nghiên cứu này không chỉ chứng minh được độ tin cậy của phương pháp Real-time PCR trong đánh giá biểu hiện gen miễn dịch mà còn đóng góp nền tảng khoa học cần thiết cho việc phát triển các liệu pháp miễn dịch cá

thể hóa dựa trên tế bào yDT tại Việt Nam.^{13,14} Trong tương lai, phương pháp này có thể được sử dụng rộng rãi để sàng lọc chất lượng tế bào trước khi truyền vào bệnh nhân, đồng thời đánh giá hiệu quả đáp ứng miễn dịch sau điều trị.

V. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình đánh giá biểu hiện mRNA của gen *IFN γ* trên tế bào nuôi yDT ở bệnh nhân ung thư phổi bằng phương pháp Real-time PCR. Từ đó, chúng tôi có thể đánh giá mức độ biểu hiện gen của *IFN γ* do tế bào yDT tiết ra sau nuôi cấy *in vitro* so với trước nuôi cấy, giúp củng cố thêm các bằng chứng khoa học về ứng dụng liệu pháp tế bào miễn dịch tự thân yDT trong điều trị ung thư phổi tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu sử dụng tế bào miễn dịch tự thân gamma delta T (yDT) và diệt tự nhiên (NK) trong điều trị ung thư phổi” do Trường Đại học Y Hà Nội chủ trì. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Sanz M, Mann BT, Ryan PL, et al. Deep characterization of human yD T cell subsets defines shared and lineage-specific traits. *Front Immunol.* 2023; 14: 1148988. doi:10.3389/fimmu.2023.1148988.
2. Narayan K, Sylvia KE, Malhotra N, et al. Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct yD T cell subtypes. *Nat Immunol.* 2012; 13(5): 511-518. doi:10.1038/ni.2247.
3. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. yD T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019; 19(7): 392-404. doi:10.1038/s41568-019-0153-5.

4. Subhi-Issa N, Tovar Manzano D, Pereiro Rodriguez A, Sanchez Ramon S, Perez Segura P, Ocaña A. $\gamma\delta$ T Cells: Game Changers in Immune Cell Therapy for Cancer. *Cancers (Basel)*. 2025; 17(7): 1063. doi:10.3390/cancers17071063.
5. Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Crespo G, et al. Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol*. 2018; 10: 1758834017749748. doi:10.1177/1758834017749748.
6. Ali Z, Zafar U, Khaliq S, Lone KP. Elevated Tumor Necrosis Factor (TNF)- α mRNA Expression Correlates with Nuclear Factor Kappa B Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Preeclampsia. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2020; 30(2): 158-162. doi:10.29271/jcpsp.2020.02.158.
7. Andreev K, Denis Iulian Trufa I, Siegemund R, et al. Impaired T-bet-pSTAT1 α and perforin- mediated immune responses in the tumoral region of lung adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2015; 113(6): 902-913. doi:10.1038/bjc.2015.255.
8. Dieffenbach CW, Dveksler GS. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.
9. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; 27(2-3): 95-125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007.
10. Nguyễn Quý Linh. *Nuôi cấy Hoạt Hóa và Đánh Giá Tính Đáp Ứng Miễn Dịch Của Tế Bào $\gamma\delta$ T Tách Từ Bệnh Nhân Ung Thư Phổi*. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội; 2020.
11. Gao X, Mi Y, Guo N, et al. Cytokine-Induced Killer Cells As Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2017; 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00774.
12. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(7): 467-478. doi:10.1038/nri2781.
13. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*. 2020; 8(1): 49. doi:10.1186/s40364-020-00228-x.
14. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001; 25(4): 386-401. doi:10.1006/meth.2001.1261.

Summary

DEVELOPMENT OF A PROCEDURE TO EVALUATE mRNA EXPRESSION OF THE *IFN γ* GENE IN CULTURED GAMMA DELTA T CELLS FROM LUNG CANCER PATIENTS UTILIZING REAL-TIME PCR METHOD

This study aimed to develop a procedure for evaluating the mRNA expression of the *IFN γ* gene in cultured $\gamma\delta$ T cells derived from lung cancer patients using Real-time PCR technique. This serves as a preliminary step to support the role of $\gamma\delta$ T cells and the *IFN γ* cytokine in autologous immune cell therapy for lung cancer in Vietnam. The study was conducted on 10 peripheral blood samples collected from patients with non-small cell lung cancer. $\gamma\delta$ T cells were isolated and cultured for 14 days. Total RNA was then extracted, reverse-transcribed into cDNA, and analyzed using semi-quantitative Real-time PCR to assess *IFN γ* gene expression. Gene expression was compared between day 0 and day 14 of culture. The results showed a significant increase in *IFN γ* mRNA expression after 14 days of $\gamma\delta$ T cell culture, with an average fold change of 3.21 ± 1.42 compared to pre-culture levels. The optimal annealing temperature was determined to be 55°C, and the most effective primer concentrations were 14.2 pmol/ μ l for β -actin and 12 pmol/ μ l for *IFN γ* , yielding clear, specific bands and consistent expression data. A reliable procedure for evaluating *IFN γ* mRNA expression in cultured $\gamma\delta$ T cells using Real-time PCR was successfully established.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, cytokine *IFN γ* , lung cancer, gene expression.