

TỐI ƯU QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ BIỂU HIỆN GEN *TNFA* TRÊN TẾ BÀO NUÔI DIỆT TỰ NHIÊN Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ PHỔI BẰNG PHƯƠNG PHÁP REAL-TIME PCR

Nguyễn Thị Thuý Mậu¹, Trần Huy Thịnh², Đào Xuân Đạt²
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 và tối ưu quy trình đánh giá biểu hiện gen *TNFA* trên tế bào diệt tự nhiên (NK) được nuôi cấy từ máu ngoại vi của bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ (NSCLC). Mẫu nghiên cứu bao gồm 10 bệnh nhân được chẩn đoán NSCLC, tế bào NK được phân lập và nuôi cấy nhằm kích hoạt và tăng sinh số lượng tế bào. Quy trình được tối ưu hóa các thông số phản ứng PCR và Real-time PCR, bao gồm nhiệt độ gắn mỗi, nồng độ mỗi, sử dụng β -actin làm gen nội chuẩn. Phân tích biểu hiện *TNFA* được thực hiện bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Kết quả cho thấy, sau 21 ngày, mức biểu hiện *TNFA* trung bình tăng $2,22 \pm 1,08$ lần so với thời điểm ban đầu, trong khi biểu hiện của gen β -actin duy trì ổn định giữa các thời điểm khảo sát, đảm bảo độ tin cậy cho phân tích định lượng. Quy trình tối ưu hóa cho phép đánh giá hiệu quả biểu hiện *TNFA* trên tế bào NK, phản ánh hoạt tính miễn dịch của tế bào. Nghiên cứu góp phần khẳng định tiềm năng ứng dụng tế bào NK hoạt hóa ex vivo trong liệu pháp miễn dịch ung thư tại Việt Nam.

Từ khoá: *TNFA*, tế bào NK, Real-time PCR, ung thư phổi, biểu hiện gen.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư phổi vẫn là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong do ung thư trên toàn cầu, chiếm khoảng 18% tổng số ca tử vong do ung thư tính đến năm 2023.¹ Dù đã có những tiến bộ đáng kể trong điều trị bằng phẫu thuật, xạ trị, hóa trị và liệu pháp nhắm trúng đích, tỷ lệ sống sót sau 5 năm của bệnh nhân ung thư phổi vẫn còn thấp, đặc biệt ở giai đoạn muộn. Sự phát triển của liệu pháp miễn dịch gần đây, đặc biệt là các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch (immune checkpoint inhibitors – ICIs), đã mở ra hướng đi mới trong điều trị, tuy nhiên chỉ một tỷ lệ nhỏ bệnh nhân đáp ứng hiệu quả với các liệu pháp này.²

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

Một trong những yếu tố quyết định hiệu quả điều trị miễn dịch là khả năng hoạt hóa và chức năng của các tế bào miễn dịch bẩm sinh, trong đó có tế bào diệt tự nhiên (Natural Killer – NK). Tế bào NK không chỉ tham gia tiêu diệt trực tiếp tế bào ung thư mà còn điều hòa đáp ứng miễn dịch thông qua tiết cytokine, trong đó *TNFA* (Tumor Necrosis Factor alpha) là một trong những cytokine quan trọng. *TNFA* có khả năng khởi phát phản ứng viêm, làm tăng tính thấm mạch, hỗ trợ di chuyển của tế bào miễn dịch đến vị trí khối u và thúc đẩy quá trình chết tế bào thông qua con đường chết theo chương trình.³⁻⁵

Việc đánh giá biểu hiện gen *TNFA* trên tế bào NK được nuôi cấy từ mẫu máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi không chỉ mang giá trị nghiên cứu cơ bản về cơ chế sinh học khối u mà còn có tiềm năng trở thành dấu ấn tiên lượng hoặc thậm chí là mục tiêu điều trị. Tuy nhiên,

hiện nay chưa có quy trình chuẩn hóa cho việc đánh giá biểu hiện gen *TNF α* từ việc nuôi cấy tế bào NK ở bệnh nhân ung thư, đặc biệt là ở bệnh nhân ung thư phổi tại Việt Nam. Điều này đặt ra nhu cầu cần thiết trong việc xây dựng và tối ưu hóa một quy trình có độ ổn định, nhạy và đặc hiệu, có thể ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu và lâm sàng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu tối ưu quy trình đánh giá biểu hiện gen *TNF α* trên tế bào NK nuôi cấy từ máu bệnh nhân ung thư phổi, góp phần cung cấp thêm công cụ hữu ích cho các nghiên cứu về miễn dịch học ung thư và mở rộng tiềm năng ứng dụng trong y học cá thể hóa.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Thu thập và bảo quản mẫu sinh phẩm

Mười mẫu máu toàn phần (mỗi mẫu khoảng 10 - 20ml) được thu thập từ tĩnh mạch của các bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội trong khoảng thời gian từ tháng 09/2022 đến 04/2023. Sau đó, các mẫu tế bào NK nuôi cấy (2ml môi trường chứa ít nhất 2×10^5 tế bào/ml) được tách ra tại hai thời điểm – ngày bắt đầu (ngày 0) và ngày thu hoạch (ngày 21), được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi tiến hành phân tích.

2. Phương pháp

Kỹ thuật tách chiết RNA tổng số (theo

khuyến cáo của nhà sản xuất)

RNA tổng số từ mẫu tế bào được tách chiết sử dụng bộ kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Quy trình tiến hành như sau: 600 μl dung dịch RLT được thêm vào mẫu, sau đó ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 2 phút ở 4°C để phá vỡ tế bào. RNA được kết tủa bằng 600 μl ethanol 70% và tiếp tục ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 16 giây. Các bước rửa tủa RNA được thực hiện lần lượt bằng dung dịch RW1 và RPE, sau đó tủa RNA được thu hồi và hòa tan trong 30 μl nước không chứa RNase. Mẫu RNA được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 phút trước khi ly tâm lần cuối ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút để thu RNA tổng số.

Kỹ thuật tổng hợp ngược cDNA (RT-PCR)

Tổng hợp cDNA từ RNA tổng số được thực hiện bằng qScript cDNA Synthesis Kit (QuantaBio, USA), với tổng thể tích phản ứng 20 μl bao gồm: 4 μl dung dịch phản ứng Master mix (5X), 500ng RNA, 1 μl enzyme qScript Reverse Transcriptase (20X) và nước cất. Chu trình nhiệt cho phản ứng: 22°C trong 5 phút, 42°C trong 30 phút, 85°C trong 5 phút và giữ ở 4°C . Sản phẩm cDNA thu được được sử dụng ngay trong các phản ứng Real-time PCR hoặc lưu trữ ở -20°C .

Phản ứng PCR tối ưu nhiệt độ gắn mỗi sử dụng mỗi của gen β -actin (gen nội chuẩn) và $TNF\alpha$

Bảng 1. Trình tự cặp mỗi đặc hiệu với gen $TNF\alpha$ và β -actin^{6,7}

Tên gen	Trình tự mỗi	Độ dài mỗi	Độ dài sản phẩm
β actin	5'- TCC ACC TTC CAG CAG ATG TG - 3'	20Nu	75bp
	5'- GCA TTT GCG GTG GAC GAT- 3'	18Nu	
$TNF\alpha$	5'- GGA GAA GGG TGA CCG ACT CA - 3'	20Nu	70bp
	5'- CTG CCC AGA CTC GGC AA - 3'	17Nu	

Các cặp mỗi đặc hiệu cho gen nội chuẩn β -actin và gen đích $TNF\alpha$ (xem Bảng 1) được sử dụng trong phản ứng PCR. Thành phần

mỗi phản ứng PCR (25 μl) bao gồm: 12,5 μl DreamTaq PCR Mastermix 2X, 0,5 μl mỗi xuôi (10X), 0,5 μl mỗi ngược (10X), 6,5 μl nước cất

và 5µl cDNA. Chu trình nhiệt PCR: biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút, 40 chu kỳ x [95°C trong 30 giây, gắn mồi 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 PCR được điện di trên gel agarose 2% và nhuộm Syber Safe. Các băng sản phẩm được ghi lại bằng hệ thống chụp ảnh gel chuyên dụng. Tỷ lệ đậm độ băng β -actin và TNF α được so sánh để lựa chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu.

Phản ứng Real-time PCR tối ưu nồng độ mồi gen β -actin (gen nội chuẩn) và gen TNF α

Phản ứng Real-time PCR (25µl) được thiết lập gồm: 12,5µl Fast SYBR Green Master Mix 2X, 0,5µl mồi F (gen β -actin (3,8; 7,6; 15,2 pmol/ul), gen TNF α (2,9; 5,8; 11,6 pmol/ul)), 0,5µl mồi R (gen β -actin (3,3; 6,6; 13,2 pmol/ul), gen TNF α (3,6; 7,2; 14,4 pmol/ul), 5µl cDNA và 6,5µl nước cất.

Chu trình nhiệt Real-time PCR tương tự như PCR thông thường, sử dụng nhiệt độ gắn mồi đã được tối ưu hóa từ bước trước. Sự xuất hiện một đỉnh melting curve duy nhất được sử dụng làm tiêu chí đánh giá độ đặc hiệu.

Sử dụng kỹ thuật Real-time PCR bán định lượng sau khi đã tối ưu để đánh giá mức độ biểu hiện mRNA của cytokine TNF α tiết ra từ tế bào nuôi NK

Sau tối ưu, biểu hiện mRNA TNF α trên tế bào NK được định lượng bán định lượng bằng Real-time PCR tại hai thời điểm: trước và sau nuôi cấy. Gen β -actin được sử dụng làm nội chuẩn. Phương pháp tính toán sử dụng công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

- Ct(T/Tg): ngưỡng chu kỳ của gen đích trước kích hoạt.

- Ct(T/Ref): ngưỡng chu kỳ của gen nội chuẩn trước kích hoạt.

- Ct(S/Tg): ngưỡng chu kỳ của gen đích sau kích hoạt.

- Ct(S/Ref): ngưỡng chu kỳ của gen nội chuẩn sau kích hoạt.

- $\Delta Ct(T) = Ct(T/Tg) - Ct(T/Ref)$; $\Delta Ct(S) = Ct(S/Tg) - Ct(S/Ref)$

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(S) - \Delta Ct(T)$; tỷ lệ biểu hiện 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 mồi khuếch đại gen β -actin và gen TNF α

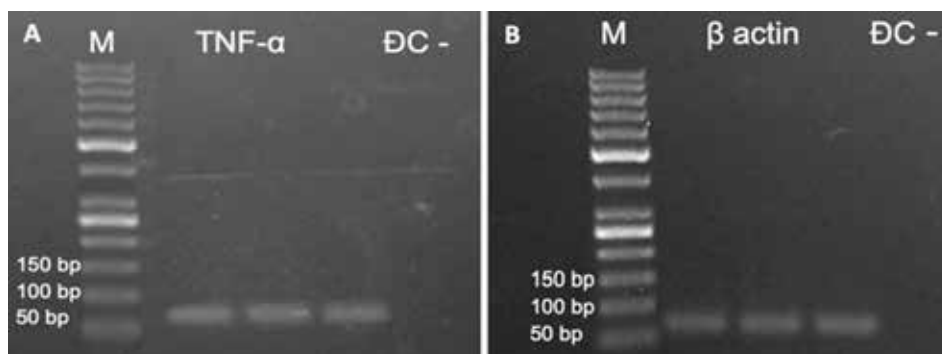


Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 2% của thí nghiệm PCR tối ưu nhiệt độ gắn mồi khuếch đại gen β -actin và gen TNF α

Làn M: 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Làn ĐC(-): đối chứng âm

Nhận xét: Sau khi hoàn tất quá trình tách chiết RNA và tổng hợp cDNA, chúng tôi tiến hành kiểm tra khoảng nhiệt độ gắn mỗi từ 53°C đến 63°C. Kết quả điện di trên gel agarose

2% cho thấy tại nhiệt độ 55°C, các sản phẩm khuếch đại xuất hiện rõ nét, đặc hiệu và không ghi nhận băng phụ đối với cả hai gen khảo sát.

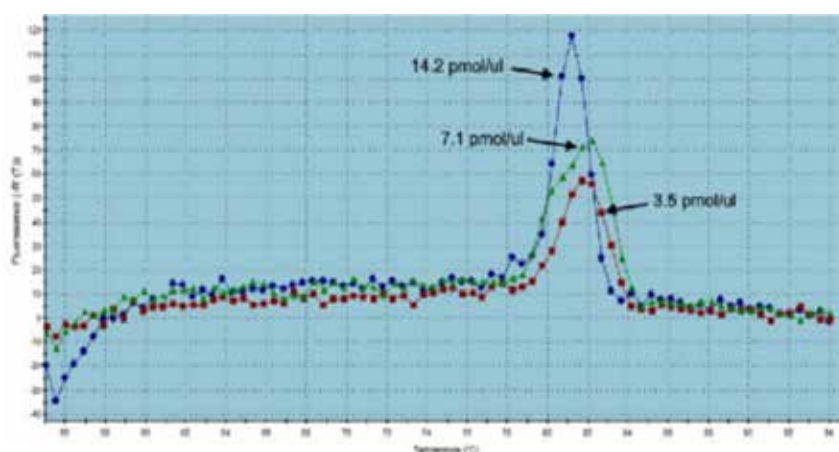


Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 2% của thí nghiệm PCR với nhiệt độ gắn mỗi tối ưu (55°C) khuếch đại gen *TNFα* (Hình A) và gen *β-actin* (Hình B) trên 3 mẫu
 Làn M: 50bp DNA ladder (Thermo Scientific). Làn ĐC(-): đối chứng âm.

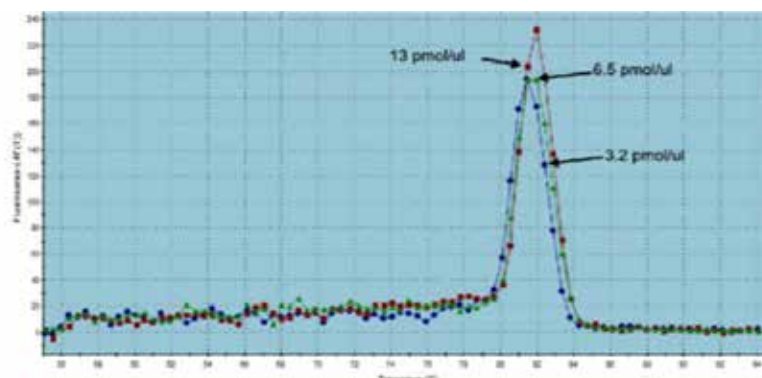
Nhận xét: Kết quả điện di cho thấy sản phẩm khuếch đại ở nhiệt độ gắn mỗi tối ưu (55°C) trên cả 3 mẫu đều xuất hiện băng sáng rõ ràng, không ghi nhận băng phụ, dù sử dụng nồng độ mỗi cao (10X), cho thấy độ đặc hiệu tốt. Sử dụng thang chuẩn DNA 50bp xác nhận rằng kích thước sản phẩm khuếch đại phù hợp với kích thước lý thuyết mong đợi.

2. Tối ưu nồng độ mỗi khuếch đại gen *β-actin* và gen *TNFα*

Để tối ưu nồng độ mỗi gen *β-actin* (gen nội chuẩn) và gen *TNFα*, 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*; 3,2 pmol/ul, 6,5 pmol/ul, 13 pmol/ul cho gen *TNFα*.



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

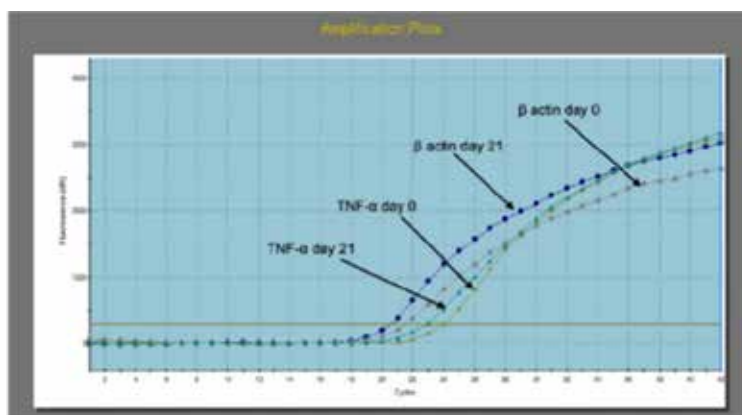


Hình 4. Kết quả tối ưu nồng độ mỗi khuếch đại gen *TNFα*

Nhận xét: Dựa trên phân tích melting curve, nồng độ mỗi 14,2 pmol/μl cho *β-actin* và 13 pmol/μl cho *TNFα* cho kết quả tối ưu nhất, với

một đỉnh đặc hiệu duy nhất.

3. Kết quả Real-time PCR bán định lượng khuếch đại gen mã hoá *TNFα* ở tế bào NK



Hình 5. Mức độ biểu hiện của mRNA *TNFα* trên tế bào NK trước và sau nuôi cấy của bệnh nhân MD-NK01

Nhận xét: Kết quả đo mức độ biểu hiện gen *TNFα* trên tế bào NK của bệnh nhân MD-NK01 cho thấy: giá trị Ct của cả gen *TNFα* và gen nội chuẩn *β-actin* đều có xu hướng giảm sau 21 ngày nuôi cấy, với mức giảm khoảng 1 chu kỳ.

Điều này cho thấy cần chuẩn hóa mức độ biểu hiện tương đối bằng phương pháp ΔC_t để loại trừ sai số do biến thiên RNA đầu vào hoặc hiệu suất phản ứng.

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

Mã bệnh nhân	Trước nuôi cấy		Sau nuôi cấy		$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$
	Ct <i>β-actin</i>	Ct <i>TNFα</i>	Ct <i>β-actin</i>	Ct <i>TNFα</i>		
MD-NK01	21,54	23,99	20,56	22,86	-0,15	1,11

Mã bệnh nhân	Trước nuôi cấy		Sau nuôi cấy		$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
	Ct β -actin	Ct $TNF\alpha$	Ct β -actin	Ct $TNF\alpha$		
MD-NK02	19,58	23,13	20,43	22,45	-1,53	2,89
MD-NK03	18,45	22,51	19,36	21,96	-1,46	2,75
MD-NK04	20,27	23,93	20,64	23,58	-0,72	1,65
MD-NK05	19,53	25,63	18,68	24,34	-0,44	1,36
MD-NK06	19,46	24,46	20,45	23,54	-1,91	3,76
MD-NK07	20,32	23,52	21,21	23,26	-1,15	2,22
MD-NK08	18,97	25,44	17,43	24,33	0,43	0,74
MD-NK09	19,43	24,55	20,67	24,87	-0,92	1,89
MD-NK10	18,81	24,58	19,52	23,33	-1,96	3,89
X $\pm$ SD						2,22 $\pm$ 1,08

Nhận xét: Kết quả tổng hợp từ 10 mẫu cho thấy biểu hiện $TNF\alpha$ tăng trung bình $2,22 \pm 1,08$ lần sau 21 ngày nuôi cấy.

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành xây dựng quy trình tối ưu đánh giá biểu hiện gen $TNF\alpha$ trên tế bào NK từ máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ. Các bước tối ưu bao gồm xác định nhiệt độ gắn mồi, nồng độ mồi phù hợp cho cả hai gen β -actin (nội chuẩn) và $TNF\alpha$ (gen đích), cũng như đánh giá đặc hiệu thông qua đường cong nóng chảy. Về tối ưu nhiệt độ gắn mồi, kết quả điện di cho thấy các băng sắc nét nhất và không có băng phụ được quan sát rõ ở khoảng 53,7°C đến 55°C đối với cả hai gen. Điều này cho thấy các cặp mồi đã hoạt động hiệu quả trong khoảng nhiệt độ thấp, đặc biệt là ở 55°C – được lựa chọn làm điều kiện chuẩn cho các phản ứng tiếp theo. Mặc dù băng điện di đoạn gen β -actin và $TNF\alpha$ lần lượt là 53°C và 59,4°C cũng cho hình ảnh sáng và rõ nét nhưng chúng tôi vẫn chọn 55°C làm nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho cả hai gen nhằm đảm bảo tính đồng bộ và độ lặp lại khi tiến hành Real-

time PCR trên nhiều mẫu. Ngoài ra, dù 53°C hoặc 59,4°C cho tín hiệu mạnh hơn, nhưng sự khác biệt không đáng kể so với 55°C, trong khi 55°C cho phép cân bằng giữa độ đặc hiệu và hiệu suất khuếch đại khi xét cả hai cặp mồi. Việc lựa chọn nhiệt độ gắn mồi phù hợp là yếu tố quan trọng trong phản ứng PCR nhằm tăng độ đặc hiệu, giảm sản phẩm không đặc hiệu và đảm bảo độ chính xác trong phân tích định lượng. Nhiệt độ quá thấp có thể dẫn đến gắn mồi không đặc hiệu, trong khi nhiệt độ quá cao lại làm giảm hiệu suất khuếch đại. Tối ưu nồng độ mồi cũng là một bước quan trọng trong quá trình thiết lập phản ứng PCR hiệu quả. Trong nghiên cứu này, ba mức nồng độ mồi khác nhau được thử nghiệm cho cả hai gen, và nồng độ 14,2 pmol/μl đối với β -actin và 13 pmol/μl đối với $TNF\alpha$ được xác định là tối ưu. Việc lựa chọn mức nồng độ này đảm bảo hiệu suất khuếch đại cao mà không gây lãng phí hóa chất. Sự cân đối giữa hiệu quả khuếch đại và tiết kiệm tài nguyên là một yếu tố đáng lưu ý, đặc biệt trong các phòng thí nghiệm có nguồn lực hạn chế. Đường cong nóng chảy (melting curve) là công cụ quan trọng trong Real-time PCR

để đánh giá tính đặc hiệu của sản phẩm PCR. Trong nghiên cứu, mỗi phản ứng chỉ tạo ra một đỉnh duy nhất trong đường cong nóng chảy, cho thấy không có sản phẩm không đặc hiệu như primer-dimer hoặc các băng ngoài mong muốn. Điều này chứng minh rằng cặp mồi được thiết kế có độ đặc hiệu cao, khuếch đại chính xác đoạn gen mục tiêu.⁸ Thực tế, tính đặc hiệu của đường cong nóng chảy là một tiêu chí cần thiết để đảm bảo độ tin cậy trong các ứng dụng định lượng mRNA, đặc biệt khi không thực hiện giải trình tự sản phẩm PCR.

Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng biểu hiện mRNA của *TNFA* trên tế bào NK tăng rõ rệt sau 21 ngày nuôi cấy hoạt hóa, với mức tăng trung bình $2,22 \pm 1,08$ lần so với trước nuôi cấy. Điều này phản ánh hiệu quả của quá trình nuôi cấy kéo dài trong việc kích hoạt và duy trì chức năng miễn dịch của tế bào NK. Sự gia tăng này tương đồng với xu hướng được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đó, như nghiên cứu của Sutlu và cộng sự (2010), trong đó các tế bào NK được hoạt hóa bằng IL-2 và IL-15 cũng cho thấy mức biểu hiện *TNFA* và *IFN γ* tăng cao sau quá trình nuôi cấy.⁹ *TNFA* là một cytokine chủ chốt trong việc điều hòa đáp ứng miễn dịch, có khả năng thúc đẩy quá trình viêm cấp, tăng tính thấm mạch, và hỗ trợ thu hút các tế bào miễn dịch đến vị trí khối u. Vai trò kép của *TNFA* trong ung thư – vừa có thể chống lại sự phát triển của khối u, vừa có thể thúc đẩy viêm mạn tính gây hại nếu mất kiểm soát – đã được phân tích chi tiết trong tổng quan của Balkwill (2009). Tác giả nhấn mạnh rằng *TNFA*, khi được sử dụng đúng liều và trong thời điểm phù hợp, có thể là công cụ hữu hiệu để kích hoạt các tế bào miễn dịch và tăng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư.¹⁰ Một điểm đáng chú ý khác là sự dao động trong mức độ tăng biểu hiện *TNFA* giữa các bệnh nhân. Điều này có thể phản ánh sự khác biệt cá thể trong khả năng đáp ứng miễn dịch hoặc tình trạng miễn

dịch nền của mỗi người. Do đó, trong tương lai, việc kết hợp đánh giá biểu hiện *TNFA* với các chỉ số khác như *IFN γ* , *IL-10*, hoặc biểu hiện các receptor kích hoạt (như NKG2D, NKp30) có thể cung cấp cái nhìn toàn diện hơn về chức năng tế bào NK.¹¹⁻¹³ Từ góc độ ứng dụng, kết quả nghiên cứu gợi mở tiềm năng sử dụng tế bào NK được hoạt hóa *ex vivo* như một liệu pháp miễn dịch hỗ trợ điều trị bệnh nhân ung thư phổi. Granzin và cộng sự (2016) cũng đã chứng minh rằng các tế bào NK mở rộng *ex vivo* không chỉ tăng tiết cytokine mà còn cải thiện khả năng tiêu diệt tế bào ung thư trong mô hình chuột mang khối u người.¹⁴ Việc định lượng *TNFA* có thể đóng vai trò như một chỉ số đánh giá chất lượng tế bào NK trước khi đưa vào điều trị, đồng thời giúp xây dựng các chiến lược trị liệu miễn dịch cá thể hóa. Tóm lại, nghiên cứu không chỉ cung cấp quy trình đánh giá *TNFA* có tính thực tiễn cao, mà còn đặt nền móng cho những ứng dụng rộng rãi hơn của tế bào NK hoạt hóa trong điều trị ung thư tại Việt Nam.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình tối ưu đánh giá biểu hiện gen *TNFA* trên tế bào NK nuôi cấy từ máu ngoại vi bệnh nhân ung thư phổi. Thông qua việc tối ưu các thông số phản ứng PCR và Real-time PCR, bao gồm nhiệt độ gắn mồi và nồng độ mồi, chúng tôi đảm bảo được tính đặc hiệu và hiệu suất cao của phản ứng. Kết quả cho thấy sau 21 ngày nuôi cấy hoạt hóa, tế bào NK biểu hiện *TNFA* tăng đáng kể trên hầu hết các mẫu, với mức tăng trung bình là $2,22 \pm 1,08$ lần. Điều này chứng minh rằng quy trình nuôi cấy và hoạt hóa có thể làm tăng hoạt tính miễn dịch của tế bào NK, đồng thời *TNFA* có thể là dấu ấn sinh học phản ánh hiệu quả hoạt hóa tế bào. Kết quả nghiên cứu là bước khởi đầu quan trọng hướng tới việc ứng dụng tế bào NK hoạt hóa *ex vivo* trong

liệu pháp miễn dịch cá thể hóa cho bệnh nhân 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 (γδT) 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. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71(3): 209-249. doi:10.3322/caac.21660.
2. Gettinger S, Horn L, Jackman D, et al. Five-Year Follow-Up of Nivolumab in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From the CA209-003 Study. *J Clin Oncol*. 2018; 36(17): 1675-1684. doi:10.1200/JCO.2017.77.0412.
3. Barry KC, Hsu J, Broz ML, et al. A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med*. 2018; 24(8): 1178-1191. doi:10.1038/s41591-018-0085-8.
4. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN-γ and TNF-α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*. 2012; 91(2): 299-309. doi:10.1189/jlb.0611308.
5. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18(11): 671-688. doi:10.1038/s41577-018-0061-z.
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-pSTAT1α 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. 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.
9. Sutlu T, Stellan B, Gilljam M, et al. Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor. *Cytotherapy*. 2010; 12(8): 1044-1055. doi:10.3109/14653249.2010.504770.
10. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(5): 361-371. doi:10.1038/nrc2628.
11. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008; 9(5): 503-510. doi:10.1038/ni1582.
12. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(5): 329-339. doi:10.1038/nri2073.
13. 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.
14. Granzin M, Stojanovic A, Miller M, Childs R, Huppert V, Cerwenka A. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncoimmunology*. 2016; 5(9): e1219007. doi:10.1080/2162402X.2016.1219007.

Summary

OPTIMIZATION OF THE EVALUATION PROTOCOL FOR *TNF α* GENE EXPRESSION IN CULTURED NATURAL KILLER CELLS FROM LUNG CANCER PATIENTS USING REAL-TIME PCR METHOD

This study aimed to establish and optimize a standardized protocol for evaluating *TNF α* gene expression in natural killer (NK) cells cultured from peripheral blood of patients with non- small cell lung cancer (NSCLC). Peripheral blood samples were collected from 10 patients diagnosed with NSCLC, NK cells were isolated and expanded under controlled culture conditions to enhance cellular activation and proliferation. The protocol was optimized with respect to critical PCR and Real-time PCR parameters, including annealing temperature, primer concentration, and the use of β -actin as an internal control gene. *TNF α* expression levels were quantified using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. After 21 days of culture, *TNF α* expression showed a mean increase of 2.22 ± 1.08 - fold compared to baseline, while *β -actin* expression remained stable across time points, ensuring the reliability of quantitative analyses. The optimized protocol provides an effective approach for quantifying *TNF α* gene expression in NK cells, serving as an indicator of enhanced immune functionality. These findings support the potential application of *ex vivo*-expanded NK cells as an adjunctive strategy in cancer immunotherapy, particularly within the clinical context of Vietnam.

Keywords: *TNF α* , NK cells, Real-time PCR, lung cancer, gene expression.