

## Nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học của Interleukine 2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất lên tế bào Lympho người In Vitro

Đỗ Khắc Đại\*; Lê Văn Đông\*

### TÓM TẮT

Interleukine 2 (IL-2) là cytokine quan trọng của hệ thống miễn dịch, có tác dụng kích thích hoạt hóa và/hoặc tăng sinh các tế bào (TB) miễn dịch khác. IL-2 có giá trị ứng dụng trong điều trị tăng cường miễn dịch và chống ung thư. Nghiên cứu này đánh giá hoạt tính sinh học của chế phẩm IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất lên các TB lympho của người thông qua thử nghiệm nuôi cấy tăng sinh và sản xuất cytokine của TB lympho có kích thích bằng IL-2. Kết quả cho thấy: chế phẩm có tác dụng kích thích hoạt hoá và tăng sinh TB lympho người *in vitro*. Dưới tác động kích thích của IL-2 tái tổ hợp, TB được hoạt hoá chế tiết thêm IL-2 cùng các cytokine thứ cấp khác là TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 và IL-13, tương tự như tác dụng của IL-2 tự nhiên.

\* Từ khoá: Interleukin 2 tái tổ hợp; Cytokine; Nuôi cấy tế bào lympho.

### Evaluation of biological activity of human recombinant il-2 preparation made in Vietnam

#### SUMMARY

Interleukine 2 (IL-2) is an important cytokine of the immune system. As IL-2 stimulates the activation and/or proliferation of other immune cells, it has therapeutic potential for immuno stimulation and cancer therapy. This study evaluated the biological activity of the human recombinant IL-2 preparation made in Vietnam using the proliferation and cytokine production measurement of human lymphocyte in culture stimulated with IL-2. The results showed that the studied IL-2 preparation stimulates lymphocyte activation and proliferation *in vitro*. Under the stimulation of recombinant IL-2, the target cells produced more IL-2 and other secondary cytokines including TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-13 as the activity of native IL-2.

\* Key words: Recombinant Interleukin 2; Cytokine; Lymphocyte culture.

#### ĐẶT VẤN ĐỀ

Interleukine 2 là cytokine quan trọng của hệ thống miễn dịch, chủ yếu do các TB lympho T hoạt hóa tiết ra, có tác động lên nhiều loại TB miễn dịch khác nhau và lên chính TB lympho đã tiết ra nó (tác dụng

kiểu tự tiết - autocrine). IL-2 tác động lên TB lympho, dẫn đến hoạt hóa và/hoặc tăng sinh TB đích này. IL-2 là cytokine có tác dụng hoạt hoá đầu nguồn đối với TB lympho khác, kích thích chúng sinh ra thêm IL-2 và/hoặc các cytokine thứ cấp khác trong quá trình hoạt hoá tăng sinh của chúng [1, 4].

\* Học viện Quân y

Phân biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

Trong khuôn khổ đề tài: "Nghiên cứu đánh giá hiệu lực của Interleukin-2 tái tổ hợp sản xuất tại Việt Nam dùng trong hỗ

trợ điều trị ung thư" mã số KC.04.21/06-10, nhóm nghiên cứu tại Viện Công nghệ Sinh học (CNSH) thuộc Viện Khoa học và Công

nghe Việt Nam đã chế tạo được IL-2 tái tổ hợp của người. Tuy nhiên, đây là một chế phẩm mới, cần được thử nghiệm đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm. Từ đó, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: *Đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm IL-2 tái tổ hợp được tạo ra có tác dụng giống IL-2 tự nhiên hay không, đồng thời so sánh hình thức tác dụng cũng như mức độ hoạt tính của chế phẩm với một sản phẩm thương mại cùng loại IL-2 tái tổ hợp để có đánh giá cụ thể về tác dụng của sản phẩm.*

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu.

- IL-2 tái tổ hợp do Viện CNSH sản xuất (gọi tắt là IL-2 Việt Nam), dạng đông khô, đựng trong lọ thủy tinh có nút cao su hút áp lực âm, bảo quản ở 4 - 8°C liên tục cho đến khi sử dụng.

- Chế phẩm IL-2 tái tổ hợp loại dùng tiêm cho người do hãng Yueho (Trung Quốc) sản xuất (gọi tắt là IL-2 Trung Quốc).

- Máu ngoại vi của 10 người trưởng thành khỏe mạnh là nhân viên và sinh viên làm việc tại Phòng thí nghiệm Miễn dịch, Trung tâm Nghiên cứu Ứng dụng Sinh Y Dược học, Học viện Quân y.

- Dung dịch ficoll tỷ trọng 1,077, cơ chất MTT (hãng Sigma).

- Chất kích thích phân bào phytohaemagglutinin (PHA), môi trường RPMI-1640 nuôi cấy TB lympho, dung dịch kháng sinh nuôi cấy TB,

huyết thanh bào thai bê (FCS) (hãng Gibco-Invitrogen).

- Đĩa nuôi cấy TB, ống nghiệm, đầu pipet các cỡ đạt tiêu chuẩn nuôi cấy TB (hãng Corning).

- Kít định lượng đồng thời 9 cytokine (trong đó có IL-2) bằng phương pháp flow cytometry-assisted immunoassay với kít và hệ thống máy phân tích Bio-Plex đồng bộ (hãng Bio-Rad).

- Các hoá chất và vật tư tiêu hao phụ khác đạt tiêu chuẩn phân tích.

### 2. Phương pháp nghiên cứu.

\* *Thử nghiệm nuôi cấy hoạt hóa và tăng sinh TB lympho:*

Tiến hành theo phương pháp của Mosmann và CS (1983) [3, 5]. Tách TB lympho từ máu ngoại vi bằng phương pháp ly tâm gradient tỷ trọng với ficoll tỷ trọng 1,077. Máu ngoại vi người tình nguyện đựng trong ống nghiệm vô trùng có chất chống đông bằng heparin. Pha loãng máu với dung dịch nước muối sinh lý, tỷ lệ 1:1. Đặt dung dịch ficoll vào đáy ống nghiệm Falcon 15 ml, sau đó đặt máu đã pha loãng lên phía trên dung dịch ficoll. Ly tâm bằng máy ly tâm có roto văng ngang, tốc độ 2.000 vòng/phút trong 20 phút ở 22°C. Sau khi ly tâm, hút lớp TB bạch cầu phía trên lớp ficoll và dưới lớp huyết tương, chuyển qua 1 ống Falcon mới. Rửa TB 3 lần bằng dung dịch nước muối sinh lý và môi trường RPMI. Đếm tỷ lệ TB sống bằng phương pháp nhuộm xanh trypan và chỉnh huyền dịch TB sống về mật độ  $10^6$  TB/ml trong dung dịch RPMI có bổ sung 1% kháng sinh và 10% FCS.

Nuôi cấy TB trong giếng nuôi cấy của đĩa nhựa 96 giếng để khảo sát các điều kiện khác nhau về nồng độ IL-2 tái tổ hợp sử dụng đơn lẻ và có hay không có chất kích thích phân bào PHA (1%). Pha IL-2 tái tổ hợp và PHA trong 100  $\mu$ l môi trường RPMI có bổ sung 1% kháng sinh và 10% FCS. Chia đều TB vào các giếng ( $10^5$  TB/100  $\mu$ l/giếng) và nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 72 giờ. Quan sát TB dưới kính hiển vi đảo ngược và chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số.

Sau 72 giờ nuôi cấy, bổ sung vào mỗi giếng nuôi cấy 20  $\mu$ l dung dịch MTT (5 mg/ml pha trong dung dịch PBS) và nuôi tiếp trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 4 giờ. Hút bỏ dịch nuôi cấy và cho vào mỗi giếng 200  $\mu$ l dung dịch hoà tan (5% SDS trong isopropanol được toan hóa bằng 0,04% HCl). Trộn đều để hoà tan formazan, sau đó đo mật độ quang học bằng máy đọc DTX 880 (Beckman Coulter, Mỹ) ở bước sóng 595 nm. Lượng MTT được chuyển hoá hay lượng formazan tạo ra tỷ lệ thuận với hoạt tính của enzym reductase, hay hoạt động chuyển hoá có liên quan đến quá trình hoạt hoá và/hoặc tăng sinh của TB.

*\* Thử nghiệm chế tiết cytokine:*

Nuôi cấy TB trong giếng nuôi cấy của đĩa nhựa 24 giếng với mật độ  $5 \times 10^5$  TB/500  $\mu$ l/giếng và nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Lấy dịch nuôi cấy ở các thời điểm 0, 12, 24 và 48 giờ để định lượng cytokine.

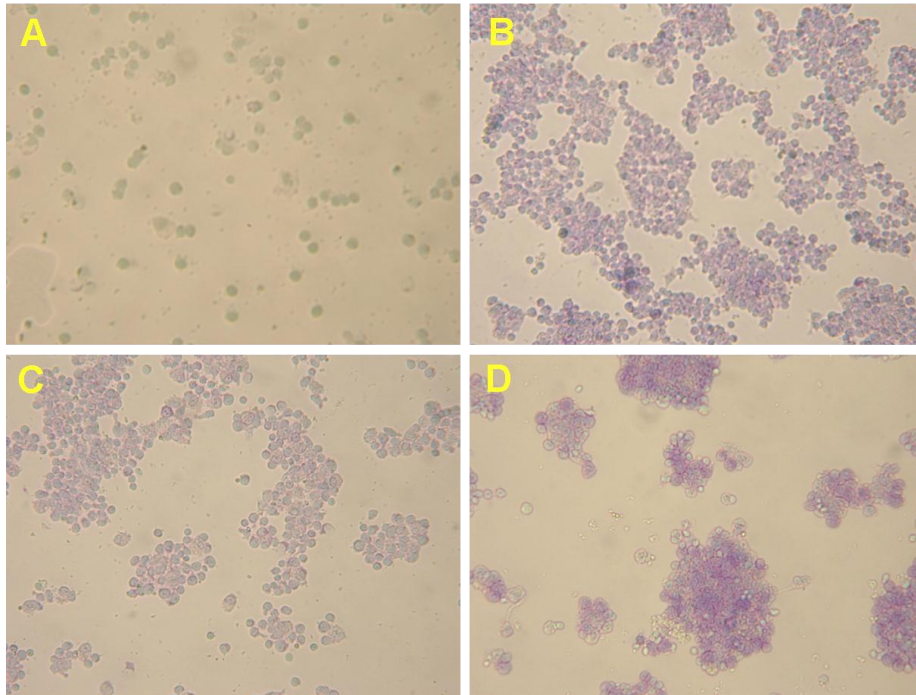
9 cytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) trong bộ kit khảo sát cytokine của TB lympho Th1 và Th2

của người bằng kỹ thuật flow cytometry-assisted immunoassay theo nguyên lý phản ứng miễn dịch huỳnh quang kiểu “sandwich” trên bề mặt các vi hạt nhựa từ tính phát huỳnh quang [2].

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Thay đổi hình thái TB.

Hình thái các TB lympho sau nuôi cấy 72 giờ dưới kích thích của IL-2 tái tổ hợp ở nồng độ 2.500 IU/ml do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất hoặc chất kích thích phân bào PHA thể hiện trong hình 1. Ở chứng âm, các TB lympho thưa thớt, kích thước bé, đa số có dạng hình cầu (A); ở nhóm kích thích bằng IL-2 do Việt Nam sản xuất, mật độ TB lympho dày hơn so với chứng âm, kích thước lớn hơn, nhiều TB chuyển dạng thành hình thon dài có bào tương trải rộng (B); ở nhóm kích thích bằng IL-2 do Trung Quốc sản xuất, mật độ TB lympho dày hơn so với chứng âm, kích thước lớn hơn, nhiều TB chuyển dạng thành hình thon dài có bào tương trải rộng (C); ở nhóm chứng PHA, TB lympho có xu hướng phân bố tập trung thành từng đám với kích thước lớn hơn, rất nhiều TB chuyển dạng thành hình thon dài có bào tương trải rộng (D).



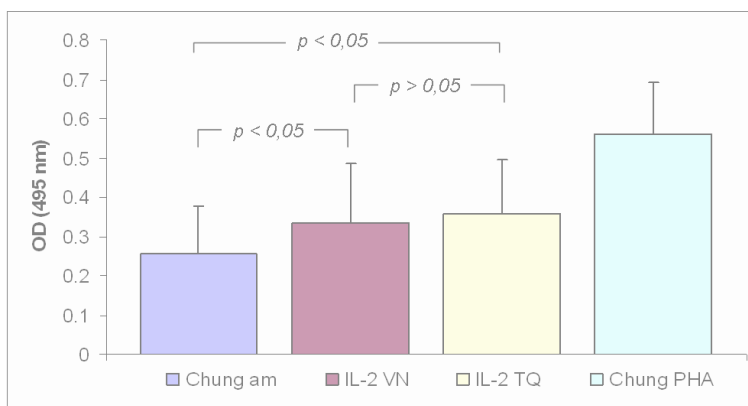
Hình 1: Hình thái TB đáp ứng với IL-2 (2.500 IU/ml) và chất kích thích phân bào PHA nhuộm giemsa trực tiếp trong giếng nuôi cấy TB sau 72 giờ và quan sát bằng kính hiển vi đảo ngược độ phóng đại 10X.

A) Chứng âm; B) IL-2 Việt Nam; C) IL-2 Trung Quốc; D) PHA.

Kết quả trên cho thấy, về phương diện hình thái, cả IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất đều có khả năng gây hoạt hoá và tăng sinh TB lympho, thể hiện ở mật độ TB dày hơn và kích thước lớn hơn. TB được kích thích bởi IL-2 không có xu hướng co cụm và ngưng tập thành đám như TB được kích thích bởi PHA. Trong khi PHA là một chất kích thích phân bào mạnh, hoạt động như một siêu kháng nguyên gây ngưng tập TB thì hoạt tính tác dụng của IL-2 lại không liên quan đến hiện tượng ngưng tập TB. Điều này cho thấy, IL-2 phát huy tác dụng trong trạng thái “sinh lý” hơn PHA, cho phép nghĩ tới khả năng ít gây ra tác dụng phụ khi sử dụng in vivo.

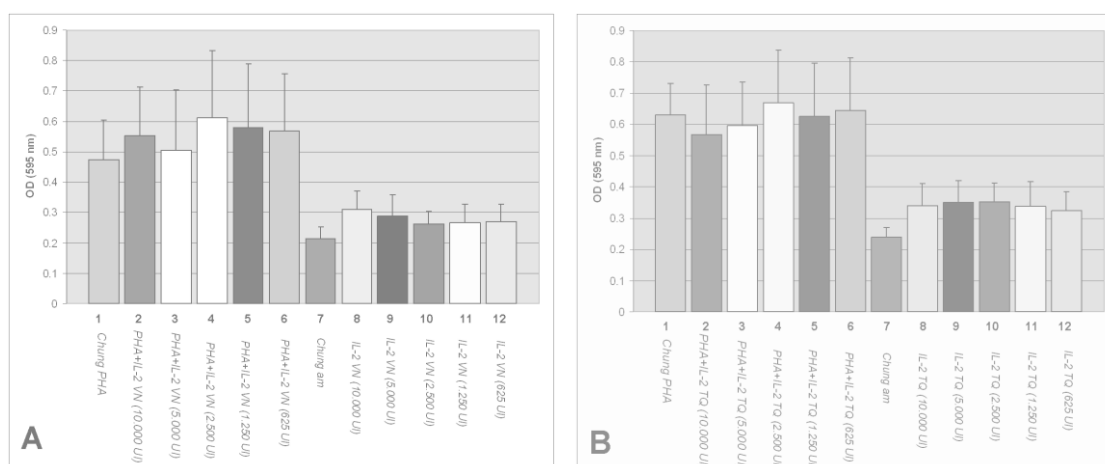
## 2. Thử nghiệm MTT.

Kết quả đo hoạt tính chuyển màu MTT của TB được kích thích bằng IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất ở nồng độ 2.500 IU/ml được thể hiện ở hình 2. Cả 2 nhóm được kích thích bằng cytokine đều có hoạt tính enzym của ty thể mạnh hơn rõ rệt so với TB không được kích thích. Chứng tỏ, cả IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất đều có khả năng gây hoạt hoá và tăng sinh TB lympho. So sánh mức độ hoạt tính giữa 2 nhóm kích thích bằng IL-2 cho thấy, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, chứng tỏ mức độ hoạt tính của IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất tương tự như của Trung Quốc sản xuất.



Hình 2: Hoạt tính gây đổi màu cơ chất MTT trong đánh giá khả năng gây hoạt hóa và tăng sinh TB lympho (n = 10).

### 3. Phương thức đáp ứng của TB phụ thuộc liều của IL-2.



Hình 3: Đáp ứng của TB lympho với nồng độ IL-2 khác nhau qua phép đo mật độ quang học.

A) IL-2 Việt Nam; B) IL-2 Trung Quốc

Các cột chứng âm (cột 7) TB lympho không được kích thích có mật độ quang học thấp nhất. Bổ sung IL-2 với nồng độ khác nhau (cột 8 - 12) làm tăng hoạt động của TB. Đồng kích thích TB bằng cả PHA và IL-2 (cột 2 - 6) cho thấy đáp ứng mạnh hơn so với chỉ kích thích bằng PHA hoặc IL-2. Hình thức đáp ứng phụ thuộc liều này xuất hiện

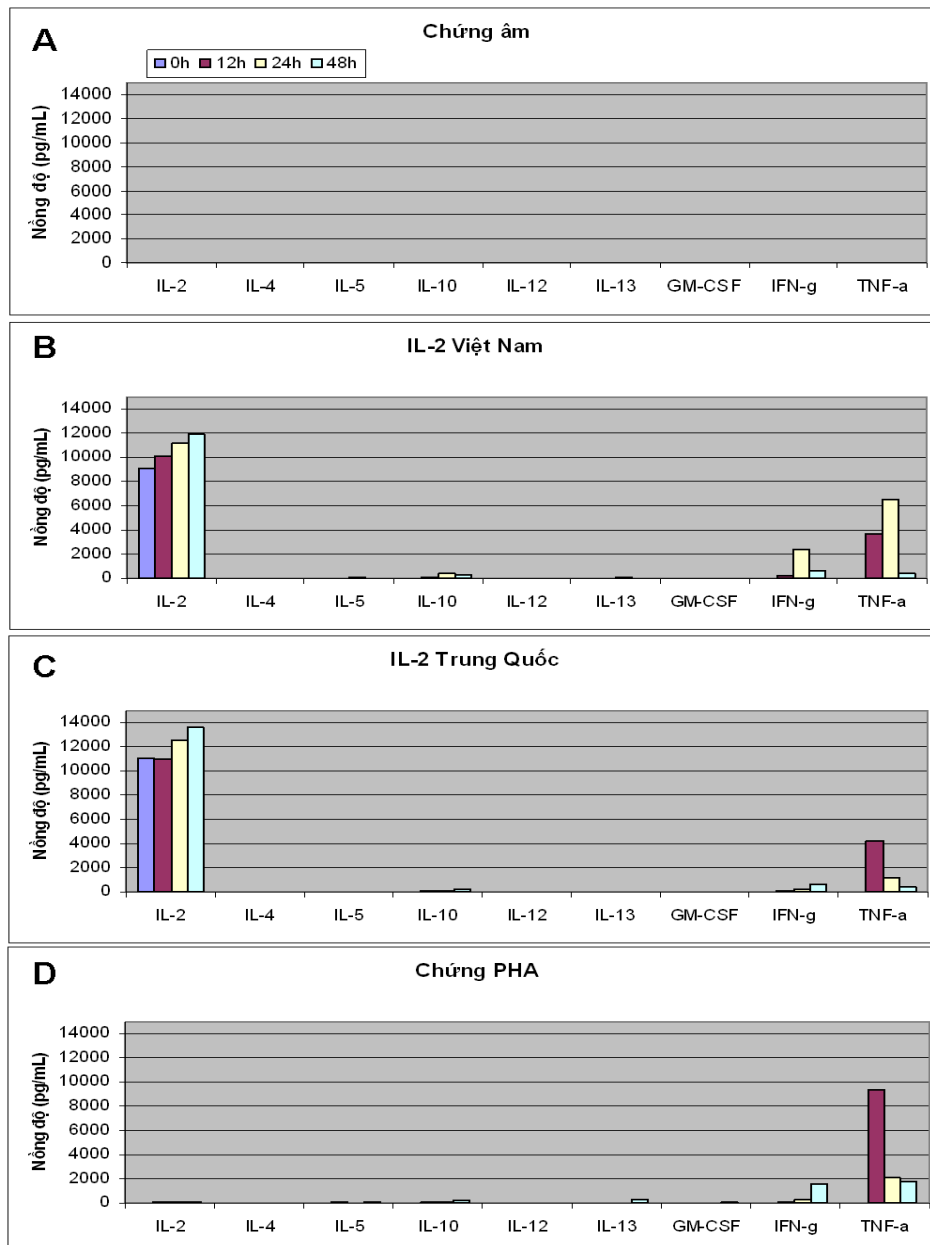
tương tự ở 2 loại IL-2 do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất, cho thấy cơ chế và phương thức tác dụng của 2 chế phẩm IL-2 tái tổ hợp là tương tự nhau.

### 4. Thay đổi nồng độ cytokine trong dịch nuôi cấy TB.

Kết quả sử dụng bộ kit thương phẩm của Bio-Rad với kháng thể đơn clon đặc

hiệu với IL-2 phát hiện được cả IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam và Trung Quốc sản xuất. Điều này cho phép khẳng định về cấu trúc, sản phẩm IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất có cấu trúc của IL-2. Biểu đồ kết quả định lượng đồng thời 9 cytokine được sản xuất ra sau kích thích bởi IL-2 của Việt Nam

và Trung Quốc sản xuất cho hình ảnh giống nhau, chứng tỏ 2 sản phẩm này có hoạt tính và phương thức tác dụng tương tự nhau, trong khi đó các mẫu chứng âm không thấy xuất hiện bất kỳ cytokine nào trong số 9 cytokine ở cả 4 thời điểm được khảo sát.



Hình 4: Nồng độ 9 cytokine trong dịch nuôi cấy TB (n = 8).

Cả 2 chế phẩm IL-2 tái tổ hợp đều kích thích tăng dần nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy theo các thời điểm từ 0 - 48 giờ (*hình 4B, C*). Nồng độ IL-2 ở nhóm kích thích bằng IL-2 do Việt Nam sản xuất tăng từ 9.095 pg/ml lên 11.923 pg/ml. Nồng độ cytokine này ở nhóm kích thích bằng IL-2 do Trung Quốc sản xuất tăng từ 11.130 pg/ml lên 13.584 pg/ml. Ngoài ra, IL-2 còn kích thích sinh ra 4 cytokine thứ cấp khác là TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 và IL-13, trong đó tác động sinh 3 cytokine của TB lympho Th1 là IL-2, TNF- $\alpha$  và IFN- $\gamma$  mạnh hơn so với 2 cytokine của TB Th2 là IL-10 và IL-13 (*hình 4B, C*), chứng tỏ đây là tác dụng sinh lý từ IL-2.

Dịch nuôi cấy TB ở nhóm chứng PHA không xuất hiện có IL-2 trong suốt quá trình nuôi cấy. Tuy nhiên, PHA cũng kích thích sinh ra 4 cytokine thứ cấp giống như của IL-2 là TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 và IL-13, trong đó kích thích sinh TNF- $\alpha$  mạnh nhất (9.363 pg/ml), cao hơn so với tác động của IL-2. Bên cạnh đó, PHA cũng kích thích sinh 1 cytokine khác của TB Th2 là IL-13 mạnh hơn so với kích thích của IL-2 (*hình 4D*), điều này có thể giải thích: do PHA hoạt động như một siêu kháng nguyên có tác động lên cả TB Th1 và Th2.

## KẾT LUẬN

- IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất có tác dụng kích thích hoạt hóa và tăng sinh TB lympho người *in vitro*. Dưới tác động kích thích của IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất, TB được hoạt hoá tiết ra thêm IL-2 cùng các cytokine thứ cấp khác là TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 và IL-13. Tác động tăng bộ 3 cytokine IL-2, TNF- $\alpha$  và IFN- $\gamma$  của TB lympho Th1 chứng tỏ IL-2 tái tổ hợp có hoạt tính sinh học tương tự như của IL-2 tự nhiên.

-IL-2 tái tổ hợp do Việt Nam sản xuất và IL-2 tái tổ hợp thương phẩm do Trung Quốc sản xuất có phương thức tác dụng kích thích hoạt hoá và tăng sinh TB lympho người *in vitro* tương tự nhau.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Triệu An, Jean Claude Homberg. Miễn dịch học. NXB Y học. Hà Nội. 2001.
2. Đỗ Khắc Đại, Lê Văn Đông và CS. Kết quả xét nghiệm đồng thời 9 cytokine trong dịch màng phổi bệnh nhân ung thư và lao phổi bằng công nghệ flowcytometry-assisted immunoassay. Tạp chí Y Dược học quân sự. 2007, 5 (32), pp.17-23.
3. Ahlberg R., MacNamara B. et al. Stimulation of T-cell cytokine production and NK-cell function by IL-2, IFN-alpha and histamine treatment during remission of non-Hodgkin's lymphoma. Hematol J. 2003, 4 (5), pp.336-341.
4. Goldsby R.A, Kindt T.J, Osborne B.A, Kuby J. Cytokine in "Kuby Immunology. Fifth edition. Freeman and Company. 2003.
5. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983, 65 (1 - 2), pp.55-63.