



Original Article

## Comparison of Anti-CD3/anti-CD28 Antibodies Combination with Phytohemagglutinin for Stimulating T Lymphocyte Proliferation

Le Thi Huyen<sup>1</sup>, Mai Thi Hien<sup>1</sup>, Nguyen Thi Ngoc Ha<sup>1</sup>, Pham Tuan Anh<sup>2</sup>,  
Bui Viet Anh<sup>1</sup>, Hoang Thi My Nhung<sup>2</sup>, Nguyen Xuan Hung<sup>1</sup>,  
Huynh Dinh Chien<sup>3</sup>, Nguyen Dac Tu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>High Tech center, Vinmec Healthcare system, 458 Minh Khai, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>VinUniversity, Vinhomes Ocean Park, Gia Lam, Hanoi, Vietnam

Received 16 April 2024

Revised 03 August 2024; Accepted 13 August 2024

**Abstract:** It is well known that T lymphocytes play important roles in autoimmune disease and cancer therapies. The activation of CD4<sup>+</sup> T cells is crucial in regulating the body's immune system. Therefore, T lymphocyte culture expansion is necessary for T cell therapy research and medical applications. Numerous methods to stimulate T lymphocytes *in vitro* have been reported, yet there are no consistent results on the characterization of T lymphocytes after stimulation. In this study, we investigated the proliferation and surface markers expression (HLA-DR and CD25) of T lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T cells from peripheral blood after stimulation. Two activation methods were used in this study, including stimulation with an anti-CD3 antibody combined with an anti-CD28 antibody (anti-CD3/CD28) and stimulation with phytohemagglutinin (PHA). The results showed that after 03 days of stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies, T lymphocytes formed a homogeneous population and obtained higher rates of viability. However, a greater proliferation index was observed in PHA-stimulated cells. Additionally, CD4<sup>+</sup> T cells expressed more HLA-DR and CD25 surface markers when stimulated with PHA. In conclusion, both methods showed outstanding efficacies. Hence the two approaches should be selected in different circumstances based on the purpose of the studies.

**Keywords:** T lymphocyte proliferation, CD4<sup>+</sup> T cells, proliferation index.

\* Corresponding author.

E-mail address: [v.tund5@vinmec.com](mailto:v.tund5@vinmec.com)

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4596>

# So sánh sự tăng sinh tế bào lympho T bằng hai phương pháp: Kháng thể kháng CD3 kết hợp kháng thể kháng CD28 và Phytohemagglutinin

Lê Thị Huyền<sup>1</sup>, Mai Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Hà<sup>1</sup>, Phạm Tuấn Anh<sup>1</sup>,  
Bùi Việt Anh<sup>1</sup>, Hoàng Thị Mỹ Nhung<sup>2</sup>, Nguyễn Xuân Hưng<sup>1</sup>,  
Huỳnh Đình Chiến<sup>3</sup>, Nguyễn Đức Tú<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao, Hệ thống chăm sóc sức khỏe Vinmec, 458 Minh Khai, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học VinUni, Vinhomes Ocean Park, Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 4 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 03 tháng 8 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 8 năm 2024

**Tóm tắt:** Tế bào lympho T chiếm một vai trò quan trọng trong các liệu pháp điều trị bệnh tự miễn và ung thư. Trong đó, tế bào TCD4+ đóng vai trò hết sức quan trọng trong việc điều hòa hệ thống miễn dịch của cơ thể. Do đó, nuôi cấy và tăng sinh số lượng lớn tế bào lympho T *in vitro* cũng như tế bào TCD4+ là cần thiết cho các nghiên cứu ứng dụng liệu pháp tế bào T. Nhiều phương pháp khác nhau đã được phát triển để kích thích tăng sinh tế bào lympho T, tuy nhiên, các báo cáo đánh giá đặc điểm của tế bào sau khi được kích thích chưa được chú trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của hai phương pháp: kích thích bằng kháng thể kháng CD3 kết hợp với kháng thể kháng CD8 (CD3/CD28) và Phytohemagglutinin PHA lên sự tăng sinh cũng như mức độ biểu hiện dấu ấn bề mặt HLA-DR, CD25 của quần thể tế bào lympho T và tế bào TCD4+ có trong mẫu PBMC. Kết quả nghiên cứu cho thấy dưới sự kích thích bằng kháng thể kháng CD3/CD28, quần thể tế bào lympho T đồng nhất và đạt tỷ lệ sống tốt hơn sau 03 ngày đầu nuôi cấy. Tuy nhiên, có sự chênh lệch nhiều hơn đáng kể về tỷ lệ tăng sinh qua các thế hệ giữa phương pháp kích thích bằng PHA so với kháng thể kháng CD3/CD28, cũng như biểu hiện các dấu ấn bề mặt HLA-DR, CD25 trên tế bào TCD4+. Cả hai phương pháp đều có những hiệu quả nổi bật riêng biệt, tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu để lựa chọn yếu tố kích thích tăng sinh tế bào lympho T phù hợp.

**Từ khóa:** Tăng sinh tế bào lympho T, tế bào T CD4+, chỉ số tăng sinh tế bào.

## 1. Mở đầu

Tế bào lympho T có nguồn gốc từ tế bào gốc tạo máu tủy xương và được trưởng thành ở tuyến ức. Tại vỏ tuyến ức, các tế bào lympho T hình thành nên các thụ thể bề mặt đặc trưng cho tế bào T (T cell receptor – TCR) với chức năng nhận

diện các kháng nguyên lạ. Sau đó, tế bào lympho T di chuyển vào tuyến ức trải qua quá trình huấn luyện trở thành những tế bào lympho T trưởng thành. Khi tế bào lympho T trưởng thành bị ức chế hoặc dung nạp trong cơ thể, hệ thống miễn dịch dần suy yếu, gây viêm, gây bệnh tự miễn và ung thư [1].

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: v.tund5@vinmec.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4596>

Liệu pháp miễn dịch chuyển tế bào thích ứng (Adoptive cell transfer ACT) từ lâu đã đi đầu trong cuộc chiến chống ung thư. Bắt đầu từ thế kỷ trước, liệu pháp tế bào lympho xâm nhập (tumor-infiltrating lymphocytes TILs) đã được ứng dụng trong điều trị khối u ác tính [2]. Tế bào lympho T trong máu ngoại vi là một trong những nguồn tiềm năng cho liệu pháp miễn dịch với ưu điểm dễ phân lập và nuôi cấy tăng sinh. Do đó, việc lựa chọn phương pháp kích thích tăng sinh tế bào lympho T phù hợp là một yếu tố quan trọng, không chỉ trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học mà còn trong công nghệ sản xuất và ứng dụng tế bào này cho điều trị.

PHA là một lectin liên kết không đặc hiệu với glycoprotein trên thụ thể bề mặt của tế bào lympho T, tạo dẫn truyền tín hiệu nội bào, kích hoạt yếu tố T NFAT (nuclear factor of activated T cells) có trong nhân, giúp tăng sinh tế bào.

Kháng thể kháng CD3/CD28 kích thích sự tăng sinh dựa theo cơ chế trình diện kháng nguyên tế bào T. Kháng thể kháng CD3 giữ vai trò hoạt hóa tăng sinh thông qua việc tương tác với phức hợp thụ thể tế bào là TCR-CD3, trong khi kháng thể kháng CD28 thúc đẩy sản xuất interleukin 2 (IL-2), yếu tố giúp tăng cường sự phân chia tế bào lympho T.

Trong nghiên cứu này, với mục tiêu phân lập và tăng sinh tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi (PBMC), chúng tôi sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD3/CD28 và Phytohemagglutinin (PHA) để đánh giá đặc điểm hình thái tế bào lympho T, chỉ số tăng sinh, mức độ biểu hiện dấu ấn bề mặt CD25, HLA-DR của quần thể tế bào TCD4<sup>+</sup> trong quá trình kích thích tăng sinh các tế bào này.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Những người khỏe mạnh (n=5), không mắc các bệnh mãn tính và không tiếp nhận bất cứ điều trị y khoa nào tại thời điểm nghiên cứu, sẽ được lựa chọn tham gia trong nghiên cứu này. Tất cả các tình nguyện viên đều ký vào “Giấy xác nhận tự nguyện hiến máu cho mục đích nghiên cứu

khoa học” tại Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec. Mẫu máu của người hiến sẽ được thu thập khoảng 10 mL vào ống chống đông Sodium Heparine và 1 ml vào ống chống đông EDTA.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi

Mẫu máu được thu thập trong ống chống đông Sodium Heparine được pha loãng với PBS để đạt thể tích 30 ml. Hỗn hợp được chuyển nhẹ nhàng lên ống chứa Ficoll-Paque ( $1,077 \pm 0,001$  g/mL, GE Healthcare, USA) theo tỷ lệ 2:1. Dựa vào phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng, lớp tế bào chứa PBMCs được phân tách sau ly tâm tại  $760 \times g$ , 20 phút, không phanh, tại nhiệt độ phòng. Sau đó, lớp tế bào được rửa 2 lần với PBS ở tốc độ và thời gian lần lượt là  $420 \times g$ , 5 phút và  $200 \times g$ , 10 phút. Sau khi loại bỏ dịch nổi, PBMCs được hòa tan trong dung dịch PBS với mật độ  $1 \times 10^6$  tế bào/ml. Kiểm tra kết quả phân lập PBMCs và tỷ lệ tế bào lympho T trong hỗn hợp PBMCs bằng phương pháp nhuộm Turk (Merck) và phân tích tế bào theo dòng chảy flow cytometry.

#### 2.2.2. Đánh dấu tế bào lympho T bằng thuốc nhuộm huỳnh quang carboxyfluorescein succinimidyl ester CFSE

Để đánh giá khả năng tăng sinh của tế bào lympho T sau khi kích thích, PBMCs trước khi nuôi cấy được ủ với thuốc nhuộm huỳnh quang carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Thermo Scientific, Eugene, OR, USA) với nồng độ  $0,50 \mu M$  trong 20 phút tại  $37^\circ C$ . Quá trình nhuộm sẽ được dừng lại bằng cách bổ sung thêm dung dịch RPMI chứa 10% FBS trong 5 phút tại  $37^\circ C$ . Hỗn hợp dung dịch trên tiếp tục được ly tâm tại  $270 \times g$  trong 8 phút để loại bỏ thuốc nhuộm CFSE dư. Huyền phù tế bào sau đó được hoàn nguyên trong dung dịch RPMI chứa 10% FBS và 1% penicillin/streptomycin.

#### 2.2.3. Phương pháp kích hoạt tăng sinh tế bào lympho T

i) Kích hoạt tăng sinh bằng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và CD28

Dung dịch PBS chứa kháng thể đơn dòng CD3 và CD28 (BD Biosciences) được ủ trên bề mặt đĩa 24 giếng tròn với nồng độ lần lượt là 0,50  $\mu\text{M}$  và 2,50  $\mu\text{M}$  trong 30 phút tại 37 °C. Lượng dư kháng thể được loại bỏ bằng PBS ở nhiệt độ thường;

ii) Kích hoạt tăng sinh bằng Phytohemagglutinin PHA

Mỗi giếng thí nghiệm trên đĩa 24 giếng tròn được bổ sung PHA sao cho nồng độ đạt 1% (v/v).

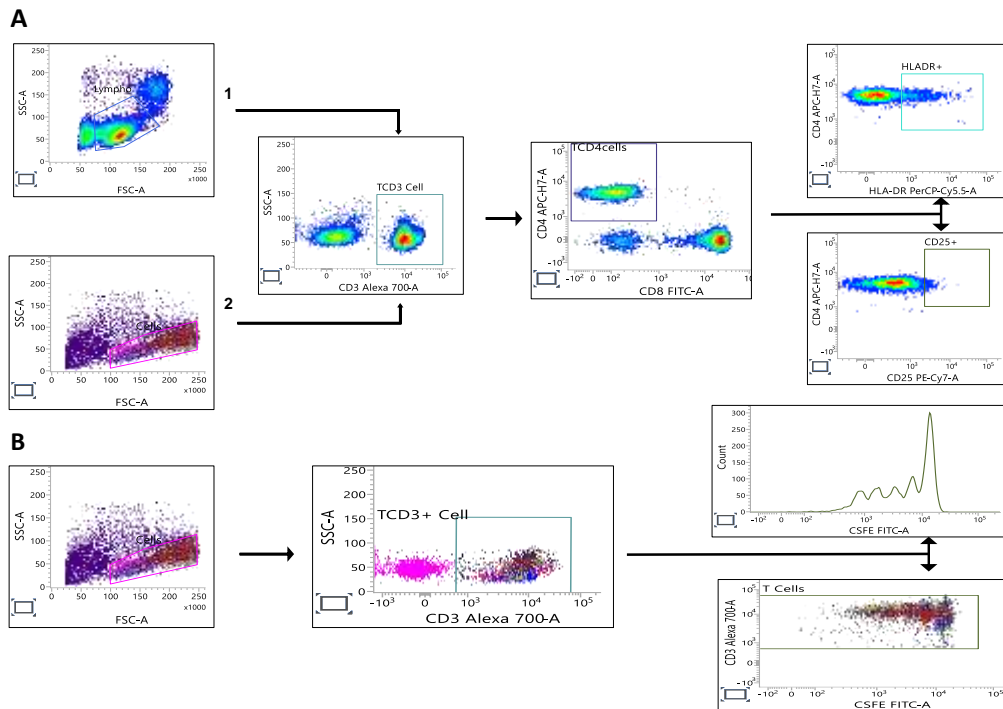
Sau đó, PBMCs gắn thuốc nhuộm CFSE được nuôi cấy trên giếng phủ kháng thể, giếng chứa PHA (mẫu thí nghiệm) và giếng không xử lý (mẫu chứng) với số lượng  $1 \times 10^6$  tế bào/ml/giếng. Mỗi mẫu được gieo trên 2 giếng (lặp lại 2 lần) và được nuôi cấy trong 03 ngày tại 37 °C và 5% CO<sub>2</sub>.

Sau quá trình kích thích tăng sinh ở cả hai phương pháp, tế bào được xác định tỷ lệ sống bằng thuốc nhuộm Trypan Blue. Sự tăng sinh tế

bào lympho T được phân tích dựa theo sự thay đổi cường độ tín hiệu huỳnh quang của CFSE bằng máy phân tích dòng chảy tế bào (Flow cytometry).

2.2.4. Phương pháp phân tích theo dòng chảy flow cytometry

Dựa vào SSC và FSC xác định tế bào lympho trong quần thể tế bào PBMCs. Tế bào lympho T được xác định bằng SSC và kháng thể CD4. Quần thể dương tính với kháng thể CD4 là quần thể tế bào TCD4+. Từ quần thể tế bào TCD4+, xác định sự biểu hiện marker HLA-DR và CD25 (Hình 1A). Các thể hệ phân chia của tế bào lympho T được xác định dựa vào tín hiệu CFSE còn lại trong tế bào sau 03 ngày nuôi cấy bằng máy Flowcytometry (Hình 1B). Phần mềm FlowJo V10 được sử dụng để phân tích chỉ số tăng sinh tế bào (proliferation Index- PI).



Hình 1. Chiến lược gating trong phân tích dòng chảy tế bào.

- a) Phân tích mức độ biểu hiện của marker HLA-DR và CD25 trên tế bào TCD4+ trước (1) và sau khi kích thích tăng sinh (2);
- b) Phân tích chỉ số tăng sinh của tế bào lympho T khi được kích thích.

PBMCs sau khi được phân lập và nuôi cấy kích thích tăng sinh sau 03 ngày được nhuộm với hỗn hợp các kháng thể đơn dòng gắn màu huỳnh quang tương ứng như sau: CD3\_Alexa 700, CD4\_APC H7, HLA\_DR\_PerCP-Cy5.5, CD25\_PE (BD Biosciences).  $1 \times 10^6$  tế bào được hoàn nguyên trong 100 $\mu$ l PBS chứa 2% FBS và bổ sung vào các ống nhuộm chứa hỗn hợp kháng thể huỳnh quang theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ủ hỗn hợp tế bào và kháng thể huỳnh quang ở nhiệt độ phòng trong 20 phút, tránh ánh sáng.

Ống tế bào sau khi nhuộm sẽ được phân tích trên hệ thống máy phân tích dòng chảy tế bào BD FACS Lyric theo thứ tự gating như đề cập tại Hình 1.

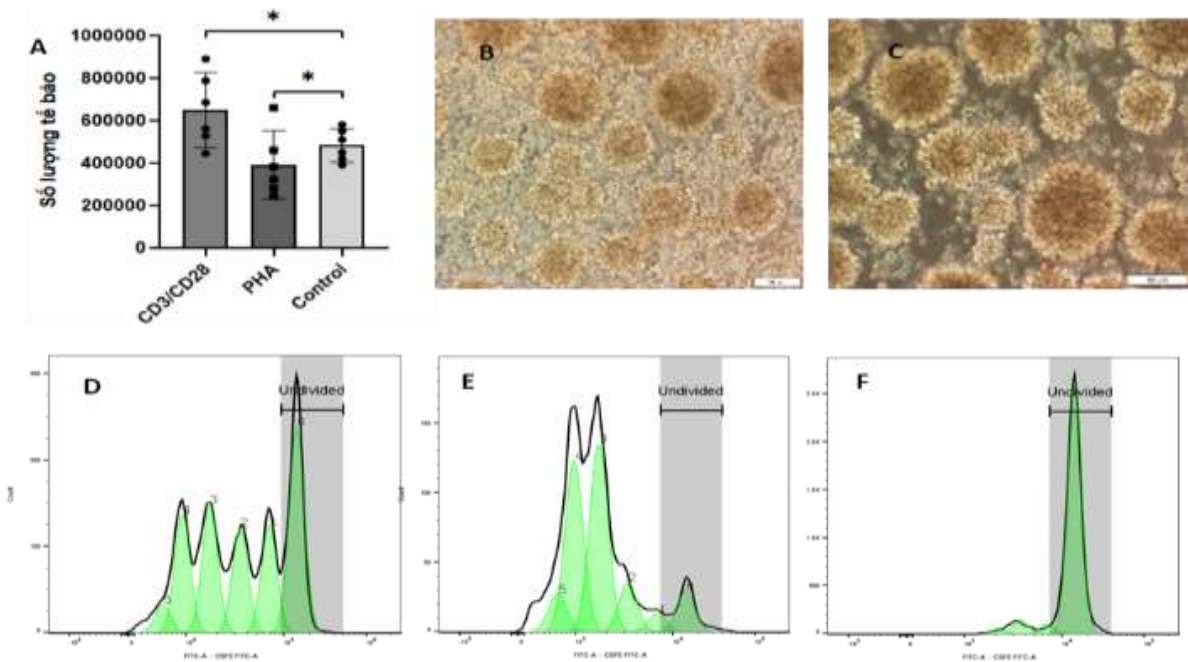
2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu thu thập được từ máy Flow cytometry được phân tích bằng phần mềm BD FACS suite và FlowJo V10. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và Graphpad prism với độ tin cậy 95%.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Ảnh hưởng của tác nhân kích hoạt lên sự tăng sinh tế bào

Dưới tác động của hai tác nhân chọn lọc tế bào, số lượng tế bào sau 03 ngày nuôi cấy ở phương pháp kích thích bằng PHA ít hơn số lượng tế bào ở mẫu chứng và ít hơn khoảng 40% so với phương pháp kích thích bằng kháng thể kháng CD3/CD28 (Hình 2A). Điều này phù hợp với tình trạng của tế bào khi quan sát dưới kính hiển vi. Khi được kích thích bằng kháng thể kháng CD3/CD28, hình thái tế bào đồng nhất, nhiều huyền phù, tạo cụm có đường kính kích thước trung bình từ 100-150  $\mu$ m (Hình 2B). Ngược lại, dưới sự kích thích từ PHA, quần thể tế bào không đồng nhất, ít huyền phù, chủ yếu tạo các cụm tế bào to có kích thước đường kính từ 150-250  $\mu$ m (Hình 2C).



Hình 2. Số lượng tế bào sau 3 ngày nuôi cấy và sự tăng sinh tế bào bằng CFSE.

- A) Số lượng tế bào sau 3 ngày kích thích; B) Quần thể tế bào được kích thích bằng kháng thể kháng CD3/CD28 (Vật kính 10X); C) Quần thể tế bào được kích thích bằng PHA (Vật kính 10X); D) Sự tăng sinh của tế bào lympho T dưới sự kích thích của CD3/CD28, E) Sự tăng sinh của tế bào lympho T dưới sự kích thích của PHA; F) Sự tăng sinh của tế bào lympho T khi không được kích thích (đối chứng).

Bên cạnh đó, sự phân chia tế bào theo thể hệ cũng có sự khác biệt rõ rệt. Dựa theo tín hiệu CSFE, quần thể tế bào lympho T khi kích thích bằng kháng thể kháng CD3/CD28 phân chia một cách tuần tự qua các thể hệ (Hình 2D). Trong khi đó xuất hiện sự phân chia đột ngột, nhanh chóng của các tế bào lympho T khi được kích thích tăng sinh bằng PHA. Các tế bào ở thể hệ thứ 4 và 5 chiếm tỷ lệ lớn, các tế bào chưa phân chia chiếm tỉ lệ nhỏ trong quần thể (Hình 2E).

Phương pháp kích thích tăng sinh tế bào lympho T bằng PHA cho chỉ số PI cao hơn đáng kể so với phương pháp kích thích tăng sinh bằng CD3/CD28 ( $2,05 \pm 0,52$  và  $1,55 \pm 0,17$ , tương ứng). Cũng tương tự, chỉ số PI của tế bào TCD4+ được kích thích bởi PHA cao hơn so với phương pháp kích thích tăng sinh bằng CD3/CD28 ( $1,86 \pm 0,36$  và  $1,49 \pm 0,20$ , tương ứng).

Bảng 1. Chỉ số tăng sinh PI của tế bào lympho T và tế bào TCD4+ khi được kích thích bằng hai phương pháp khác nhau

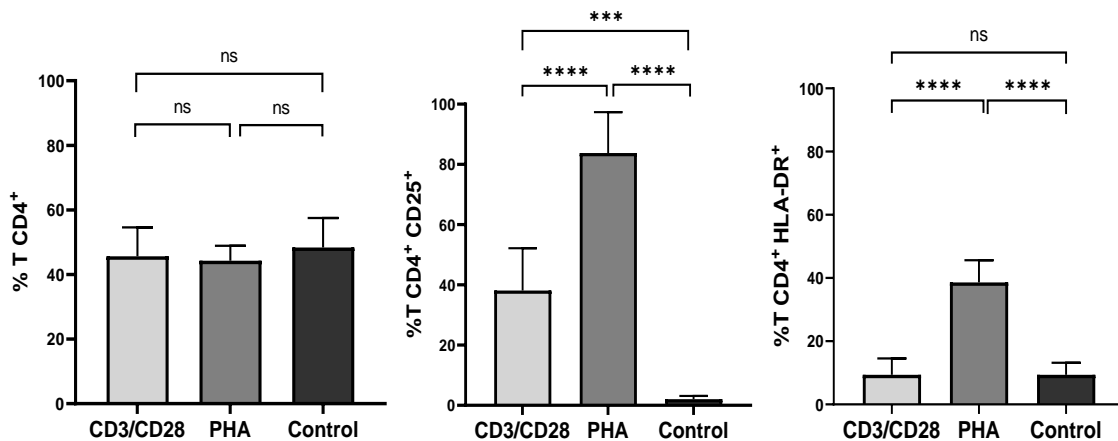
Phương pháp	Loại tế bào	Proliferation Index (PI)
PHA	Lympho T	$2,05 \pm 0,52$
	TCD4+	$1,86 \pm 0,36$
anti CD3/CD28	Lympho T	$1,55 \pm 0,17$
	TCD4+	$1,49 \pm 0,20$

### 3.2. So sánh đặc điểm quần thể tế bào TCD4+ trước và sau khi kích hoạt tế bào

Hình 3A cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ phần trăm trung bình của các tế bào TCD4+ trong quần thể tế bào lympho T ở các mẫu được kích thích tăng sinh bằng PHA (44,24%), CD3/CD28 (45,62%) và tỷ lệ này gần tương đương với so tỷ lệ phần trăm tế bào TCD4+ trong quần thể PBMCs ban đầu trước khi nuôi cấy (48,43%).

Sau quá trình nuôi cấy tăng sinh bằng hai phương pháp kích thích PHA và CD3/CD28, tỷ lệ các tế bào có biểu hiện dấu ấn bề mặt CD25 trong quần thể tế bào TCD4+ đều tăng đáng kể so với trong quần thể tế bào ban đầu mới phân lập (Hình 3B). Trong đó, phương pháp kích thích bằng PHA cho tỷ lệ phần trăm trung bình các tế bào biểu hiện dấu ấn bề mặt CD25 cao gấp 2 lần với phương pháp kích thích tăng sinh bằng CD3/CD28 (83,71% và 38,14%).

Tỷ lệ phần trăm trung bình các tế bào có biểu hiện dấu ấn bề mặt HLA-DR trong quần thể tế bào TCD4+ được kích thích tăng sinh bằng PHA tăng cao đáng kể (43,56%). Trong khi đó, không có sự thay đổi tỷ lệ này ở quần thể tế bào TCD4+ được kích thích tăng sinh bằng CD3/CD28 (9,42%) so với quần thể tế bào TCD4+ ban đầu chưa nuôi cấy (9,34%) (Hình 3C).



Hình 3. Sự thay đổi mức độ biểu hiện các dấu ấn bề mặt HLA-DR và CD25 trong quần thể tế bào TCD4+: A) Tỷ lệ phần trăm quần thể tế bào TCD4+ trong quần thể tế bào lympho T; B) Tỷ lệ phần trăm tế bào TCD4+ có biểu hiện dấu ấn bề mặt CD25; C) Tỷ lệ phần trăm tế bào TCD4+ có biểu hiện dấu ấn bề mặt HLA-DR.

#### 4. Thảo luận

Tại hai điều kiện kích thích tăng sinh tế bào, môi trường nuôi cấy xuất hiện các cụm tế bào với kích thước khác nhau. Sự xuất hiện các cụm tế bào này thường được quan sát trong môi trường nuôi cấy tế bào lympho T hoạt hóa [3]. Bên cạnh việc đóng vai trò như một tác nhân nguyên phân tế bào, PHA còn kích thích quá trình apoptosis tế bào lympho máu ngoại vi [4]. Do đó, số lượng tế bào PBMCs thu được ở phương pháp kích thích tăng sinh bằng PHA ít hơn so với mẫu chứng và mẫu được kích thích bằng kháng thể kháng thể CD3/CD28 có thể do tác động của con đường apoptosis.

Để phân tích các đáp ứng của tế bào lympho T dưới sự kích thích ở các điều kiện khác nhau, quần thể tế bào này được đánh giá tốc độ tăng sinh bởi CFSE. Dựa vào chỉ số tăng sinh PI, PHA có khả năng kích thích tăng sinh tế bào lympho T tốt hơn khi sử dụng kháng thể kháng thể CD3/CD28. Kết quả cũng tương tự với nghiên cứu của Kashef và cộng sự (2022) khi phân tích quần thể tế bào lympho T người khỏe mạnh [5]. Tương ứng với chỉ số PI, biểu hiện HLA-DR của tế bào TCD4+ ở điều kiện nuôi cấy kích thích có PHA tăng cao đáng kể so với điều kiện kích thích bằng kháng thể kháng thể CD3/CD28 và mẫu đối chứng. Theo kết quả nghiên cứu của Effros, HLA-DR biểu hiện cao ở tế bào có khả năng tăng sinh tế bào mạnh, ngược lại HLA-DR thấp biểu hiện ở tế bào tăng sinh kém [6].

Tỷ lệ phần trăm tế bào TCD4+ trong quần thể tế bào nuôi cấy cho thấy không có sự khác biệt giữa nhóm đối chứng với nhóm sử dụng yếu tố kích thích tăng sinh. Kết quả này cũng tương đồng như trong nghiên cứu của Juanjuan Jiao và cộng sự [7]. Tuy nhiên, sự biểu hiện vượt trội của dấu ấn bề mặt CD25+CD4+ khẳng định sự biến đổi của tế bào TCD4+ từ trạng thái chưa hoạt hóa thành tế bào TCD4+ hoạt hóa. PHA đã được chứng minh là yếu tố có kích thích và duy trì kéo dài biểu hiện CD25 trên tế bào lympho T thông qua tín hiệu JAK3/STAT5 [8]. Do đó, sự biểu hiện cao hơn các dấu ấn bề mặt HLA-DR, CD25 cho thấy tiềm năng sản xuất tế bào lympho T điều hòa trong phương pháp kích thích bằng PHA.

Sự biểu hiện của CD25+ trên tế bào TCD4+ là một trong số nguyên nhân kích hoạt hệ miễn dịch và liên quan đến một số tình trạng bệnh, bao gồm: bệnh tự miễn, dị ứng và một số loại ung thư [9, 10]. Ngoài ra, những thay đổi về tỷ lệ tế bào T điều hòa CD4+CD25+ trong máu ngoại vi người nhiễm trùng huyết có mối tương quan đến kết quả lâm sàng, bao gồm tỷ lệ sống hoặc tử vong [11]. Những phát hiện này cho thấy tế bào T điều hòa CD4+CD25+ có khả năng đóng vai trò như một dấu ấn sinh học để đánh giá chính xác tiên lượng của bệnh nhân nhiễm trùng huyết cũng như dự đoán và đưa ra hướng điều trị. Mặt khác, biểu hiện CD25+ trên các tế bào T điều hòa ảnh hưởng đến khả năng ức chế và dung nạp miễn dịch [12], là đối tượng phù hợp trong các nghiên cứu về liệu pháp điều trị mới. Gần đây, nghiên cứu của Gulden và cộng sự (2023) chỉ ra rằng tỷ lệ tế bào T nhớ được tạo ra trong quần thể tế bào CAR-T được kích thích bằng PHA cao hơn tỷ lệ tế bào CAR-T được kích thích bằng kháng thể kháng thể  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 [13]. Kết quả này cho thấy PHA cung cấp khả năng sản xuất tế bào CAR-T lâu dài và hiệu quả, gợi ý một giải pháp thay thế tiềm năng cho các tế bào CAR-T được khuếch đại bằng kháng thể kháng thể  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28.

#### 5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kích hoạt và tăng sinh thành công tế bào lympho T từ PBMCs khi sử dụng PHA nồng độ 1% (v/v) và kháng thể kháng thể CD3/CD28 với nồng độ lần lượt là 0,50  $\mu$ M và 2,50  $\mu$ M. Ở các điều kiện khác nhau, tỷ lệ quần thể tế bào TCD4+ không có sự thay đổi. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện các dấu ấn bề mặt HLA-DR và CD25, cũng như chỉ số tăng sinh PI khi kích thích tăng sinh bằng PHA cao hơn khi kích thích tăng sinh bằng kháng thể kháng thể CD3/CD28.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện bởi nguồn kinh phí của Trung tâm Công nghệ cao - Bệnh

viện Đa khoa Quốc tế Vinmec và Trường Đại học VinUni. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

### Tài liệu tham khảo

- [1] H. Sun, W. Gao, W. Pan, Q. Zhang, G. Wang, D. Feng, X. Geng, X. Yan, S. Li, Tim3(+) Foxp3 (+) Treg Cells Are Potent Inhibitors of Effector T Cells and Are Suppressed in Rheumatoid Arthritis, *Inflammation*, Vol. 40, No. 4, 2017, pp. 1342-1350, <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0577-6>.
- [2] S.A. Rosenberg, P. Spiess, R. Lafreniere, A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-infiltrating Lymphocytes, *Science*, Vol. 233, No. 4770, 1986, pp. 1318-1321, <https://doi.org/10.1126/science.3489291>.
- [3] M. Hommel, B. Kyewski, Dynamic Changes During the Immune Response in T Cell-antigen-presenting Cell Clusters Isolated from Lymph Nodes, *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 197, No. 3, 2003, pp. 269-280, <https://doi.org/10.1084/jem.20021512>.
- [4] Y. Feng, J. Wu, X. Feng, D. Tao, J. Hu, J. Qin, X. Li, W. Xiao, K. Gardner, S. I. V. Judge, Q. Q. Li, J. Gong, Timing of Apoptosis Onset Depends on Cell Cycle Progression in Peripheral Blood Lymphocytes and Lymphocytic Leukemia Cells, *Oncology Reports*, Vol. 17, No. 4, 2007, pp. 1437-1444, <https://doi.org/10.3892/or.17.6.1437>.
- [5] S. Kashef, M. Moghtaderi, H. R. Hatami, M. Kalani, S. Alyasin, H. Nabavizadeh, S. Farjadian, Evaluation of T Cell Proliferation Using CFSE Dilution Assay: A Comparison between Stimulation with PHA and Anti-CD3/Anti-CD28 Coated Beads, *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, Vol. 21, No. 4, 2022, pp. 458-466, <https://doi.org/10.18502/ijaai.v21i4.10293>.
- [6] R. B. Effros, L. Dillard, E. Zeller, F. Naeim, R. L. Walford, Strong HLA-DR Expression in T Cell Cultures after Activation Is Necessary for IL-2-Dependent Proliferation, *Human Immunology*, Vol. 8, No.4, 1983, pp. 249-254, [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(83\)90051-4](https://doi.org/10.1016/0198-8859(83)90051-4).
- [7] J. Jiao, X. Zhao, R. Hou, Y. Wang, W. Chang, N. Liang, Y. Liu, J. Xing, Y. Cao, X. Li, K. Zhang, Comparison of Two Commonly Used Methods for Stimulating T Cells, *Biotechnology Letter*, Vol. 41, No. 12, 2019, pp. 1361-1371, <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02743-w>.
- [8] A. N. Shatrova, E. V. Mityushova, I. O. Vassilieva, N. D. Aksenov, V. V. Zenin, N. N. Nikolsky, Time-Dependent Regulation of IL-2R Alpha-Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in Activated Human Blood T Lymphocytes. *PLoS One*, Vol. 11, No. 12, 2016, pp: e0167215, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167215>.
- [9] P. A. Antony, N. P. Restifo, CD4+CD25+ T Regulatory Cells, Immunotherapy of Cancer, and Interleukin-2, *Journal of Immunotherapy*, Vol. 28, No. 2, 2005, pp. 120-128, <https://doi.org/10.1097/01.cji.0000155049.26787.45>.
- [10] A. Rajendiran, K. Tenbrock, Regulatory T Cell Function in Autoimmune Disease, *Journal of Translational Autoimmunity*, Vol. 4, 2021, pp. 100130, <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100130>.
- [11] K. Chen, Q. Zhou, H. Shan, W. Li, Z. Lin, Prognostic Value of CD4+ CD25+ Tregs as a Valuable Biomarker for Patients with Sepsis in ICU, *World Journal of Emergency Medicine*, Vol. 6, No. 1, 2015, pp. 40-43, <https://doi.org/10.5847/wjem.j.1920-8642.2015.01.007>.
- [12] X. Valencia, P.E. Lipsky, CD4+ CD25+ FoxP3+ Regulatory T cells in Autoimmune Diseases, *Nature Clinical Practice Rheumatology*, Vol. 3, No. 11, 2007, pp. 619-626, <https://doi.org/10.1038/ncprheum0624>.
- [13] G. Gulden, B. Sert, T. Teymur, Y. Ay, N. N. Tiryaki, CAR-T Cells with Phytohemagglutinin (PHA) Provide Anti-Cancer Capacity with Better Proliferation, Rejuvenated Effector Memory, and Reduced Exhausted T Cell Frequencies, *Vaccines*, Vol. 11, No. 2, 2023, pp: 313, <https://doi.org/10.3390/vaccines11020313>.