

# ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG LÊN KHẢ NĂNG TĂNG SINH VÀ CHỨC NĂNG TẾ BÀO GIẾT TỰ NHIÊN *IN VITRO*

Thân Thị Trang Uyên<sup>1,2\*</sup>, Lê Thị Huyền<sup>1</sup>, Phạm Thị Phương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ cao Vinmec, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện nghiên cứu Miễn dịch Vinmec-VinUni, Hà Nội, Việt Nam

## TÓM TẮT

Tế bào giết tự nhiên (natural killer cell - NK) là loại tế bào miễn dịch, có khả năng phát hiện và tiêu diệt tế bào ung thư và các tế bào bị nhiễm vi rút. Trong cơ thể, số lượng tế bào NK trong máu ngoại vi có hạn và thường không đủ đáp ứng nhu cầu điều trị. Bằng cách nuôi cấy và tăng sinh tế bào bên ngoài cơ thể, chúng ta có thể tạo ra một số lượng lớn tế bào NK và kiểm soát được chất lượng của chúng trước khi sử dụng. Do vậy, việc nghiên cứu và phát triển liệu pháp tế bào NK sẽ cung cấp cơ hội mới cho y học hiện đại nhằm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan hệ miễn dịch và ung thư. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm khả năng tăng sinh của tế bào NK trong các điều kiện môi trường nuôi khác nhau và hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư của chúng. Kết quả cho thấy rằng, tế bào đơn nhân máu ngoại vi có khả năng tăng sinh tương đương nhau trong môi trường B ( $86,3 \pm 15,7 \times 10^6$  tế bào) và M ( $148,6 \pm 89,6 \times 10^6$  tế bào) sau 12 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, tỷ lệ tế bào NK thu được từ môi trường B cao hơn so với từ môi trường M, tương ứng với từng loại môi trường là  $82,91 \pm 17,34\%$  và  $53,9 \pm 15,7\%$ . Đồng thời, khả năng tiêu diệt tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562 của tế bào NK thu được từ môi trường B cũng cao hơn so với NK thu được từ môi trường M ở tất cả các dải nồng độ, và hiệu quả này cũng cao hơn nhóm đối chứng. Điều này cho thấy tế bào NK sau nuôi cấy tăng sinh *in vitro*, đặc biệt là trong môi trường B, có hiệu quả cao trong tiêu diệt dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562. Do vậy, đây là môi trường có tiềm năng trong nghiên cứu phát triển liệu pháp tế bào NK điều trị bệnh hiệu quả.

*Từ khóa:* Hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư, *in vitro*, K562, tăng sinh tế bào, tế bào NK.

## MỞ ĐẦU

Liệu pháp tế bào đang là một trong những xu hướng nghiên cứu mới của y học nhằm điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh lý nan y. Trong số các liệu pháp tế bào đang được nghiên cứu và ứng dụng, liệu pháp tế bào giết tự nhiên (natural killer cells – NK) đang được nghiên cứu ứng dụng trong điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ miễn dịch, bệnh thận, đái tháo đường và một số bệnh truyền nhiễm khác (El-Kadiry et al., 2021).

Tế bào NK là các tế bào bạch huyết bẩm sinh gây độc tế bào, tạo ra các cytokine và chemokine gây viêm (Vivier et al., 2008). Bằng cách tiêu hủy các tế bào bị biến đổi hoặc bị nhiễm bệnh, chúng hạn chế sự phát triển của khối u và tế bào nhiễm vi rút. Trong khi tế bào T nhận ra các peptide được trình diện bởi các phân tử phức hợp hòa hợp mô chính yếu (major histocompatibility complex – MHC), tế bào NK mang các thụ thể nhận biết các protein tự thân trên tế bào ung thư (Vivier et al., 2008). Đồng thời, hoạt động chức năng của chúng bị ức chế bởi các phân tử MHC hiển thị trên các tế bào đó.

Tiềm năng to lớn của tế bào NK trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư được minh họa bằng khả năng chúng nhận biết rộng rãi được các tế bào bị stress, bất kể có sự biểu hiện của kháng nguyên mới và tăng cường hoạt động chống lại các khối u đã mất biểu hiện MHC lớp I do mắc phải cơ chế kháng thuốc (Page et al., 2024; Vivier et al., 2024). Kết quả là, nhiều nỗ lực đang được tiến hành nhằm huy động các tế bào NK nội sinh bằng phương pháp trị liệu hoặc cung cấp các quần thể tế bào NK được nhân rộng ngoài cơ thể sống như một liệu pháp tế bào, trong một số trường hợp có thể trang bị thêm cho các tế bào NK các thụ thể kháng nguyên (Page et al., 2024). Do vậy, gần đây NK đang nổi lên như là liệu pháp tế bào miễn dịch mới quan trọng cho điều trị và hỗ trợ điều trị ung thư (Chu et al., 2022).

Mặc dù liệu pháp tế bào NK có tiềm năng trong điều trị các bệnh lý liên quan đến hệ miễn dịch và ung thư, nhưng chúng cũng tồn tại một số hạn chế và thách thức cần phải khắc phục như hiệu quả không đồng đều, tái phát bệnh, điều kiện sản xuất đòi hỏi công nghệ tiên tiến (Vivier et al., 2024). Việc huy động được lượng lớn tế bào NK từ máu ngoại vi nhằm đáp ứng liều cho mỗi lần điều trị đang là một thách thức. Một giải pháp cho vấn đề này là tăng sinh tế bào NK bên ngoài cơ thể để đảm bảo đủ số lượng và chất lượng tế bào cần thiết cho liệu pháp (Peighambarzadeh et al., 2020). Hầu hết các quy trình tăng sinh đều sử dụng cytokine hoặc cùng nuôi cấy với lớp tế bào nuôi đã bất hoạt khả năng tăng trưởng. Tuy nhiên, việc sử dụng lớp tế bào nuôi khá phức tạp, đòi hỏi sự kiểm soát nghiêm ngặt. Do vậy, phương pháp bổ sung cytokine như IL-12/18/15 hay IL-21/15 vào cuối giai

đoạn nuôi cấy tế bào được sử dụng phổ biến (Sivonen et al., 2023). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy có bổ sung cytokine lên khả năng tăng sinh của tế bào NK và hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư *in vitro*.

### NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên vật liệu

Máu ngoại vi được thu nhận từ 03 người tình nguyện khỏe mạnh tại Vinmec. Máu ngoại vi (20 mL) được lấy vào ống chống đông chứa sodium heparin (Jiangxi Exquisite Technology Co., Ltd, Trung Quốc), bảo quản ở nhiệt độ phòng và được xử lý trong vòng 6 giờ.

#### Phương pháp phân lập tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi

Mẫu máu sau khi thu thập được ly tâm tại  $1710 \times g$  trong 10 phút tại  $20^\circ\text{C}$  để thu thập huyết tương. Sau đó, huyết tương tự thân được bất hoạt tại nhiệt độ  $58^\circ\text{C}$  trong 1 giờ. Phần máu còn lại được pha loãng với PBS 1X và ly tâm với lymphoprep (Stemcell Technologies, Đức) theo tỷ lệ 2:1. Dựa vào phương pháp ly tâm theo tỷ trọng, lớp tế bào đơn nhân máu ngoại vi được phân tách sau quá trình ly tâm  $760 \times g$  trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào đơn nhân được rửa lại 2 lần với PBS 1X lần lượt tại  $420 \times g$  trong 5 phút và  $200 \times g$  trong 10 phút (Chen et al., 2020).

#### Phương pháp nuôi cấy hoạt hóa, tăng sinh tế bào ứng viên

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi thu được bằng phương pháp ly tâm theo tỷ trọng nuôi cấy ban đầu với mật độ  $D = 1 \times 10^6$  tế bào/mL trong hai loại môi trường B và M với tổng thời gian nuôi cấy là 12 ngày.

Môi trường B: Tế bào đơn nhân được nuôi cấy trong môi trường kích thích B (Initial B) với dung dịch bổ sung chứa IL-2 (Chiron Corp, Hoa Kỳ), OK432 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Nhật Bản) và 5% huyết tương tự thân trong chai nuôi cấy đã được phủ kháng thể đơn dòng kháng CD3 và kháng CD16. Sau 3 ngày nuôi cấy, tế bào được loại bỏ các thành phần kích thích bằng phương pháp ly tâm tại  $270 \times g$  trong 8 phút. Sau đó, tế bào được chuyển vào chai nuôi cấy không phủ kháng thể và nuôi trong môi trường tăng sinh B có bổ sung IL-2 và 10% huyết tương tự thân. Môi trường được bổ sung thêm mỗi 2 ngày/lần tùy thuộc vào số lượng tế bào tăng sinh để duy trì mật độ tế bào  $0,8 \times 10^6$  tế bào/mL.

Môi trường M: Tế bào đơn nhân được nuôi cấy trong môi trường cơ bản M có bổ sung dung dịch chứa IL-2, IL-15 (Miltenyi Biotec, Đức) và 5% huyết tương tự thân trong chai nuôi cấy không phủ kháng thể. Sau 5 ngày nuôi cấy, bổ sung gấp đôi môi trường mới vào chai nuôi cấy chứa tế bào chứa 10% huyết tương tự thân. Đến ngày thứ 7, môi trường mới được bổ sung thêm mỗi 2 ngày/lần tùy thuộc vào số lượng tế bào tăng sinh để duy trì mật độ  $0,5 \times 10^6$  tế bào/mL.

#### Phương pháp đếm số lượng tế bào

Tế bào được đếm bằng phương pháp nhuộm với Trypan Blue. Lấy 10  $\mu\text{L}$  huyền phù tế bào trộn đều với 10  $\mu\text{L}$  dung dịch Trypan Blue (Gibco, Hoa Kỳ), sau đó nhỏ 10  $\mu\text{L}$  hỗn hợp vào buồng đếm tế bào Neubauer cải tiến (INCYTO C-Chip Hemocytometers, InCyto Co., Ltd, Hàn Quốc). Soi đếm tế bào tại 4 ô của buồng đếm dưới kính hiển vi soi ngược. Số lượng tế bào được tính theo công thức sau:

$$\text{Số tế bào/mL} = (\text{tổng số tế bào của 4 ô} / 4) \times 2 \times 10^4$$

#### Phân tích tế bào bằng phương pháp dòng chảy (flow cytometry)

Tế bào sau khi phân lập và tế bào ứng viên sau nuôi cấy được nhuộm với các kháng thể đơn dòng: Anti-CD3-Pacific Blue, Anti-CD4- APC-Alexa Flour 750, Anti-CD8- FITC, Anti-CD56-PE, Anti-IgG1- Pacific Blue, Anti-IgG-APC-Alexa Flour 750, Anti IgG1-FITC, Anti IgG1-PE (Miltenyi Biotec, Đức). Sau đó, tế bào được phân tích bằng hệ thống Navios và phân tích bằng phần mềm Navios software (Beckman Coulter, Hoa Kỳ). Quy trình thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

#### Đánh giá hoạt tính tế bào NK

Hoạt tính tế bào NK được xác định bằng khả năng tiêu diệt tế bào ung thư dòng tủy K562 (ATCC, Hoa Kỳ) (là tế bào đích - ký hiệu là T), đã được gắn thuốc nhuộm huỳnh quang Calcein-AM (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Nhật Bản). Tế bào đơn nhân, tế bào NK sau nuôi cấy và tế bào đối chứng ung thư bạch cầu giết tự nhiên KHYG (AcceGen Biotech, Hoa Kỳ) (ký hiệu là E), được ủ với tế bào ung thư dòng tủy K562 ở các mật độ E/T khác nhau, lần lượt là: 1; 2,5; 5; 10; 20 và 40 trong 2 giờ (EP2539442A1, accessed August 2024). Sau khi ủ, cường độ huỳnh quang của tế bào được đo dưới hệ kính hiển vi Terascan VPC2. Cường độ tín hiệu huỳnh quang bị giảm tương đương với tỷ lệ tế bào K562 bị tiêu diệt và tỷ lệ thuận với hoạt tính NK có trong mẫu.

#### Phân tích thống kê

Sử dụng phần mềm Excel để trình bày biểu đồ và phân tích dữ liệu. Dữ liệu trung bình được trình bày dưới dạng Trung bình  $\pm$  SD. Giá trị  $p < 0,05$  được cho là so sánh khác biệt có ý nghĩa thống kê.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

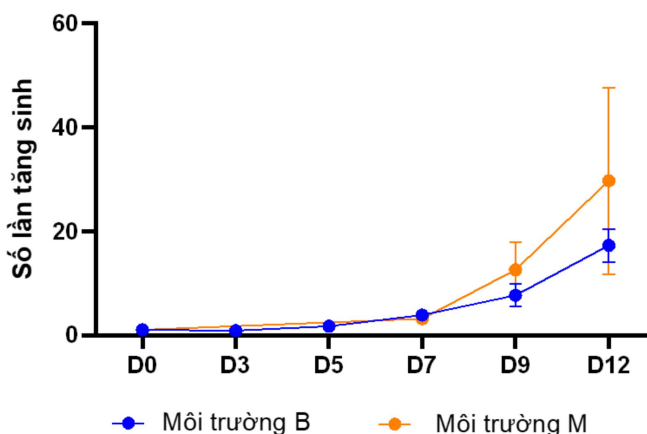
### Nuôi cấy tăng sinh tế bào ứng viên

Tế bào đơn nhân máu ngoại vi được nuôi cấy trong hai loại môi trường B và M để đánh giá khả năng tăng sinh. Kết quả trình bày trong Bảng 1 cho thấy số lượng tế bào vào ngày thứ 3 nuôi cấy có bị giảm đi so với số tế bào cấy ban đầu; tuy nhiên tế bào bắt đầu tăng sinh mạnh từ ngày thứ 5 sau khi cấy. Đến ngày cuối cùng của thí nghiệm (D12), số lượng tế bào ứng viên nuôi trong môi trường B tăng lên 17,26 lần và trong môi trường M là 29,6 lần so với số lượng tế bào ở ngày cấy ban đầu (D0). Khi so sánh số lượng tế bào giữa hai nhóm môi trường B và M thì thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Một điểm thiếu sót trong thí nghiệm là không theo dõi được số lượng tế bào ứng viên ở hai thời điểm này. Bên cạnh đó, chúng tôi phân tích thời gian nhân đôi tế bào ứng viên trong các loại môi trường thì thấy rằng cũng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai loại môi trường nuôi cấy B và M (Hình 1).

**Bảng 1. Số lượng tế bào ứng viên qua các ngày nuôi cấy**

DVT: triệu tế bào

	Mẫu 1		Mẫu 2		Mẫu 3		Trung bình $\pm$ SD		Giá trị $p$
	B	M	B	M	B	M	B	M	
D0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0 $\pm$ 0	5,0 $\pm$ 0	
D3	4,7	-	4,2	-	4,4	-	4,4 $\pm$ 0,3	-	
D5	10,9	-	6,9	-	7,6	-	8,4 $\pm$ 2,1	-	
D7	22,8	18,7	17,3	17,5	17,6	11,8	19,2 $\pm$ 3,1	16,0 $\pm$ 3,7	0,104
D9	50,9	93,6	30,2	44,7	34,2	50,4	38,4 $\pm$ 11,0	62,9 $\pm$ 26,7	0,057
D12	104,4	250,8	75,9	83,2	78,7	112,0	86,3 $\pm$ 15,7	148,6 $\pm$ 89,6	0,140



**Hình 1. Tốc độ tăng sinh của tế bào ứng viên trong quá trình nuôi cấy đến 12 ngày**  
D: ngày của quá trình nuôi cấy.

Các kết quả trên cho thấy rằng cả hai môi trường nuôi cấy đều có khả năng kích thích tăng sinh tế bào ứng viên, tuy nhiên sự khác biệt giữa hai loại môi trường chưa rõ ràng.

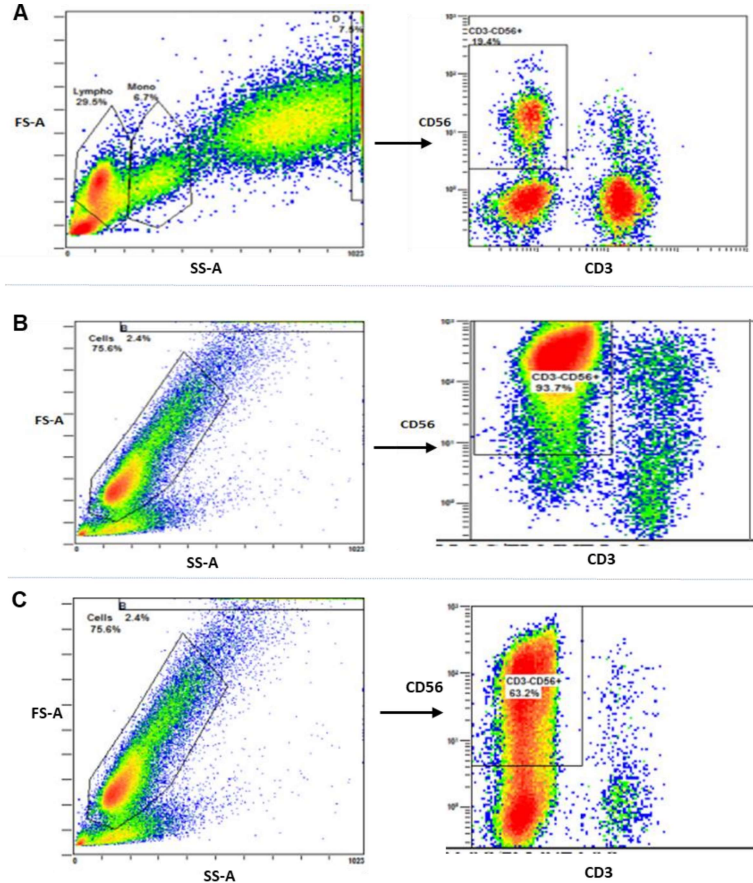
### Biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK

Tế bào đơn nhân trước nuôi cấy và tế bào ứng viên sau nuôi cấy được phân tích biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK để đánh giá sự ảnh hưởng của loại môi trường lên biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào. Kết quả trình bày ở Bảng 2 và Hình 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào NK (biểu hiện CD56+) trong quần thể tăng lên sau 12 ngày nuôi cấy. Khi so sánh hai loại môi trường nuôi, tỷ lệ % tế bào NK nuôi trong môi trường B cao hơn so với tế bào nuôi trong môi trường M ( $p < 0,001$ ). Kết quả này cho thấy môi trường B phù hợp hơn cho việc tăng sinh tế bào NK máu ngoại vi. Nghiên cứu trước đây của Sivonen và cộng sự cho thấy cytokine có thể ảnh hưởng đến biểu hiện kiểu hình và hiệu quả của tế bào NK trong nuôi cấy *in vitro* (Sivonen et al., 2023). Thậm chí, khi IL-2 và IL-15 được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, số lượng tế bào NK tăng gấp 100 lần sau 16 ngày (Peighambarzadeh et al., 2020). Do vậy, hiệu quả biệt hóa thành tế bào NK ở môi trường B có thể là do thành phần cytokine bổ sung vào trong quá trình nuôi cấy.

**Bảng 2. Biểu hiện dấu ấn bề mặt tế bào NK trước và sau nuôi cấy**

	Máu ngoại vi	Sau nuôi cấy 12 ngày		Giá trị p
	Tế bào đơn nhân	NK-B	NK-M	
Tỷ lệ NK CD56+ (%)	13,83 ± 5,56	82,91 ± 17,34	53,9 ± 15,7	< 0,001
CD3+CD8+ (%)	23,6 ± 3,47	3,32 ± 2,65	20,71 ± 21,71	0,13
CD3+CD4+ (%)	30,88 ± 8,12	2,51 ± 1,88	1,09 ± 0,79	0,086

NK-B: NK nuôi trong môi trường B, NK-M: NK nuôi trong môi trường M. CD56+: tế bào dương tính với CD56, là tế bào NK; CD3+CD8+: tế bào dương tính với CD3 và CD8, gồm tế bào T độc và T ức chế; CD3+CD4+: tế bào dương tính với CD3 và CD4, là tế bào T hỗ trợ.



**Hình 2. Tỷ lệ tế bào NK được xác định theo phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy (Flow cytometry)**

(A) mẫu máu ngoại vi, (B) mẫu tế bào ứng viên sau 12 ngày nuôi cấy môi trường B, (C) mẫu tế bào ứng viên sau 12 ngày nuôi cấy môi trường M. Từ quần thể tế bào Lympho được xác định dựa theo FS-A (tán xạ thẳng) và SS-A (tán xạ bên), quần thể tế bào NK được xác định là quần thể dương tính với CD56 và âm tính với CD3.

**Đánh giá hoạt tính tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào NK nuôi cấy**

Để kiểm tra khả năng tiêu diệt tế bào ung thư của tế bào NK nuôi cấy trong hai loại môi trường B và M, chúng tôi kiểm nghiệm trên tế bào đích là dòng tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562. Kết quả cho thấy hiệu quả tiêu diệt tế bào ung thư K562 của tế bào NK nuôi trong cả hai loại môi trường B và M tăng lên sau 12 ngày nuôi cấy so với tế bào đơn nhân ở thời điểm ban đầu (Bảng 3). Bên cạnh đó, tế bào NK nuôi trong môi trường B có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư K562 tốt hơn tế bào NK nuôi trong môi trường M ở tất cả các nồng độ, và tốt hơn dòng tế bào NK đối chứng là dòng tế bào ung thư bạch cầu giết tự nhiên KHYG ở tất cả các nồng độ E/T từ 1 đến 20, trừ nồng độ E/T = 40. Đồng thời, E/T càng cao thì khả năng tiêu diệt tế bào ung thư càng tốt.

Trong một báo cáo trước đây, tế bào đơn nhân máu ngoại vi nuôi dưới sự kích thích của cytokine (IL-2, IL-7 và IL-15) có khả năng tăng sinh số lượng tế bào NK gấp từ 15 đến 48 lần so với ban đầu, và tế bào tăng sinh ngoài cơ thể này có hiệu quả tiêu diệt tế bào K562 cao đáng kể với tỷ lệ E/T = 20 (EP2539442A1, accessed August 2024). Điều này cho thấy kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với nghiên cứu trước đây về cả khả năng tăng sinh và khả năng tiêu diệt dòng tế bào ung thư đích của tế bào NK nuôi cấy tăng sinh ngoài cơ thể.

**Bảng 3. Tỷ lệ tế bào ung thư K562 bị tiêu diệt bởi tế bào NK trước và sau khi nuôi cấy tại các tỷ lệ khác nhau**

(ĐVT: % tế bào ung thư bạch cầu dòng tủy K562 bị tiêu diệt)

	E/T = 1	E/T = 2,5	E/T = 5	E/T = 10	E/T = 20	E/T = 40
Tế bào đơn nhân	1,3 ± 0,58	2,67 ± 2,08	12 ± 5,57	29,33 ± 19,01	51 ± 24,98	67,67 ± 23,18
NK_B	39,67 ± 22,81	68,33 ± 12,1	81 ± 2,65	87 ± 2,65	89,33 ± 2,52	89,67 ± 0,58
NK_M	3,33 ± 1,53	10,33 ± 8,74	21,33 ± 13,58	37 ± 14,93	53,33 ± 12,74	67,33 ± 4,51
KHYG (Đối chứng)	11 ± 5,57	39,33 ± 3,79	61,33 ± 3,51	74,67 ± 3,05	85 ± 3	90,67 ± 2,08

NK\_B: tế bào NK nuôi trong môi trường B; NK\_M: tế bào NK nuôi trong môi trường M.

## KẾT LUẬN

Có thể tăng sinh số lượng lớn tế bào NK (tăng từ 17,26 lần đến 29,6 lần trong 12 ngày nuôi cấy) từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi trong cả hai môi trường B và M. Tỷ lệ phần trăm tế bào NK thu được từ môi trường B cao hơn môi trường M, và khả năng tế bào NK thu được từ môi trường B tiêu diệt tế bào ung thư K562 cũng cao hơn so với tế bào NK thu được từ môi trường M. Do vậy, môi trường B có bổ sung cytokine IL-2 phù hợp hơn để tăng sinh số lượng lớn tế bào NK ngoài cơ thể, hướng tới các ứng dụng lâm sàng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen, H., Schürch, C. M., Noble, K., Kim, K., Krutzik, P. O., O'Donnell, E., . . . McIlwain, D. R. (2020). Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunol*, 21(1), 15. doi:10.1186/s12865-020-00345-0
- Chu, J., Gao, F., Yan, M., Zhao, S., Yan, Z., Shi, B., & Liu, Y. (2022). Natural killer cells: a promising immunotherapy for cancer. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 240. doi:10.1186/s12967-022-03437-0
- El-Kadiry, A. E., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell therapy: types, regulation, and clinical benefits. *Front Med (Lausanne)*, 8, 756029. doi:10.3389/fmed.2021.756029
- EP2539442A1. (accessed August 2024). Method for the generation of a cik cell and nk cell population. <https://patents.google.com/patent/EP2539442A1/en?q=EP2539442A1>.
- Page, A., Chuvin, N., Valladeau-Guilemond, J., & Depil, S. (2024). Development of NK cell-based cancer immunotherapies through receptor engineering. *Cellular & Molecular Immunology*, 21(4), 315-331. doi:10.1038/s41423-024-01145-x
- Peighambarzadeh, F., Najafalizadeh, A., Esmail, N., Rezaei, A., Ashrafi, F., & Ganjalikhani Hakemi, M. (2020). Optimization of In Vitro Expansion and Activation of Human Natural Killer Cells against Breast Cancer Cell Line. *Avicenna J Med Biotechnol*, 12(1), 17-23.
- Sivonen, M., Sirviö, K. A., Wojciechowski, S., Kailaanmäki, A., Kaipainen, S., Bailey, A., . . . Kekarainen, T. (2023). Cytokines impact natural killer cell phenotype and functionality against glioblastoma in vitro. *Frontiers in Immunology*, 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1227064
- Vivier, E., Rebuffet, L., Narni-Mancinelli, E., Cornen, S., Igarashi, R. Y., & Fantin, V. R. (2024). Natural killer cell therapies. *Nature*, 626(8000), 727-736. doi:10.1038/s41586-023-06945-1
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503-510. doi:10.1038/ni1582

## EFFECTS OF CULTURE MEDIA ON THE PROLIFERATION AND FUNCTION OF NATURAL KILLER CELLS *IN VITRO*

Than Thi Trang Uyen<sup>1,2\*</sup>, Le Thi Huyen<sup>1</sup>, Pham Thi Phuong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Vinmec HiTech Center, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*Vinmec-VinUni Institute of Immunology, Hanoi, Vietnam*

### SUMMARY

Natural killer cells (NK) are a type of immune cells that have the capacity to detect and destroy cancer cells and virus-infected cells. The number of NK cells in the body's peripheral blood is limited and often not enough for the treatment. Using the technology of cell proliferation *in vitro*, we can produce a large number of NK cells and control their quality before use. Therefore, investigation and development of NK cell therapy will provide a new approach to treat and support the treatment of diseases related to the immune system and cancers. In this study, we studied the proliferation of NK cells in two different culture media and their effectiveness in killing cancer cells. The results showed that peripheral blood mononuclear cells expressed a similar proliferative ability in media B ( $86.3 \pm 15.7 \times 10^6$  cells) and media M ( $148.6 \pm 89.6 \times 10^6$  cells) after 12 days of culture. However, the percentage of NK cells obtained was higher in media B ( $82.91 \pm 17.34\%$  compared to  $53.9 \pm 15.7\%$ ). Additionally, the ability of NK cells obtained from media B to kill the human immortalized myelogenous leukemia cell line K562 was also higher than that of NK cells obtained from media M at all concentration ratios, and the cancer cell targeting efficiency was also higher than those of the control group. Data from this study indicated that NK cells, especially when expanded in media B, were effective at killing the human immortalized myelogenous leukemia cell line K562. Therefore, this is a potentially useful medium for the study and development of NK cell therapies to treat human diseases.

*Keywords:* Cell proliferation, *in vitro*, killing cancer cells, K562, NK cells.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0865662355; Email: v.uyenttt@vinmec.com