

**CHUYỂN NẠP CÁC CẤU TRÚC PLASMID
VÀ MINICIRCLE SLEEPING BEAUTY VÀO TẾ BÀO LYMPHO T
BẰNG CÔNG NGHỆ NUCLEOFECTOR**

Cần Văn Mão^{1}, Ngô Thu Hằng¹*

Tóm tắt

Mục tiêu: Chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle Sleeping Beauty (SB) trong chuyển nạp thụ thể kháng nguyên chimeric (Chimeric Antigen Receptor - CAR) vào tế bào T bằng công nghệ Nucleofector. **Phương pháp nghiên cứu:** Mẫu máu tươi được xử lý và tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC) rồi đếm tế bào và phân tích bằng flow cytometry, sau đó chuyển nạp plasmid và minicircle tạo CAR-T tương ứng. Cuối cùng, đánh giá hiệu quả chuyển nạp bằng phân tích flow cytometry. **Kết quả:** Hiệu suất chuyển nạp của cấu trúc plasmid CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 (25,88%) cao hơn cấu trúc CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4 (14,72%), cấu trúc minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB (35,12%) cao hơn CAR-T iCasp9-IL15/pSB (23,48%) với $p < 0,05$. Tỷ lệ tế bào sống sau chuyển nạp của CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 (48,9%) cao hơn so với CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4 (25,4%), minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB (35,12%) cao hơn CAR-T iCasp9-IL15/pSB (23,48%) với $p < 0,05$. Sự tăng sinh của tế bào (4 ngày) với IL-2 (100 U/mL) chứng minh quần thể PBMC vẫn giữ được chức năng sau quá trình chuyển nạp. **Kết luận:** Đã chuyển nạp và tạo thành công khối tế bào CAR-T dựa trên các cấu trúc plasmid và minicircle thế hệ 2 và 4, tạo nền tảng cho các thí nghiệm tăng sinh và đánh giá chức năng tế bào T.

Từ khóa: Plasmid Sleeping Beauty; Minicircle Sleeping Beauty; Công nghệ Nucleofector.

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Cần Văn Mão (canvanmao@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 27/3/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 25/4/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1273>

TRANSPOSITION OF SLEEPING BEAUTY PLASMID AND MINICIRCLE INTO T CELLS USING NUCLEOFECTOR TECHNOLOGY**Abstract**

Objectives: To study the transposition of Sleeping Beauty plasmid and minicircle in the transposition of chimeric antigen receptors into T cells using Nucleofector technology. **Methods:** Fresh blood samples were processed and separated into peripheral blood mononuclear cells (PBMC), then these cells were counted and analyzed by flow cytometry, and the transpositions of plasmid and minicircle were conducted to create CAR-T. Finally, the transposition efficiency was evaluated by flow cytometry analysis. **Results:** The transposition efficiency of the second-generation CAR-T CD19RCD137/pSB plasmid construct (25.88%) was higher than that of the fourth-generation iCasp9-IL15/pSB CAR-T (14.72%), and the minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB (35.12%) was higher than that of the iCasp9-IL15/pSB CAR-T (23.48%), with $p < 0.05$. The viable cell rate of the second-generation CD19RCD137/pSB CAR-T (48.9%) was higher than that of the fourth-generation iCasp9-IL15/pSB CAR-T (25.4%), and the minicircle CD19RCD137/pSB CAR-T (35.12%) was higher than that of the iCasp9-IL15/pSB CAR-T (23.48%) with $p < 0.05$. Cell proliferation results (4 days) with IL-2 (100 U/mL) demonstrated that the PBMC population retained its function after the transposition. **Conclusion:** The transposition of CAR-T cell blocks based on the second- and fourth-generation plasmid and minicircle was successfully conducted, creating a foundation for proliferation experiments and testing T cell function.

Keywords: Sleeping Beauty plasmid; Sleeping Beauty minicircle; Nucleofector technology.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Y học phân tử đã bước vào thời đại công nghệ cao cung cấp các phương pháp điều trị nhiều bệnh di truyền phức tạp thông qua các sản phẩm thuốc tế bào được biến đổi gene. Để có thể ứng dụng lâm sàng đòi hỏi khả năng tích hợp ổn định thông tin di truyền thông qua các vector chuyển gene một cách an toàn,

hiệu quả và khả thi về mặt kinh tế [1]. Khả năng chuyển nạp các gene tự nhiên hoặc tổng hợp vào các loại tế bào soma của con người cung cấp cơ sở công nghệ cho liệu pháp gene để điều trị nhiều bệnh lý di truyền và mắc phải và cho phép công nghệ gene, các sản phẩm y tế thuộc tế bào với nhiều các thuộc tính và chức năng mới để sử dụng như công cụ

phục vụ chẩn đoán và trị liệu trong y học. Đại đa số (70%) hệ thống phân chuyển nạp gene được sử dụng trong các thử nghiệm lâm sàng đang diễn ra về liệu pháp gene dựa trên các vector virus, và chỉ một tỷ lệ nhỏ các thử nghiệm sử dụng hệ thống chuyển nạp không qua vector virus, chủ yếu là plasmid trần không tích hợp DNA, mà chỉ cung cấp biểu hiện gene nhất thời, không bền vững [2, 3].

Hiện nay, có rất nhiều phương pháp chuyển gene có thể được áp dụng vào tế bào T như tải nạp bằng vector virus, transposons, mRNA hoặc sử dụng hạt nano, liposome, kỹ thuật xung điện (electroporation)... Tuy nhiên, có hai loại phương pháp chính đã được thử nghiệm lâm sàng là tải nạp bằng virus và transposon kết hợp với kỹ thuật xung điện [1, 4]. Thế hệ mới nhất của vector SB transposon đáp ứng đầy đủ các yêu cầu này, có thể khắc phục các hạn chế liên quan đến vector chuyển gene virus và các phương pháp tiếp cận chuyển gene không phải virus phổ biến ở các nghiên cứu tiền lâm sàng đang diễn ra. Hệ thống SB cho phép gene chuyển ổn định ở mức cao và duy trì biểu hiện gene chuyển trong nhiều loại tế bào soma sơ cấp của người, do đó nó đại diện cho một chiến lược chuyển gene rất hấp dẫn để sử dụng trong lâm sàng [2].

Hiện nay, Việt Nam chưa có nhóm nghiên cứu nào thực hiện nghiên cứu

tạo khối tế bào CAR-T ứng dụng trong điều trị bệnh lý bạch cầu cấp. Vì vậy, nghiên cứu của chúng tôi xem xét: *Chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB trong việc chuyển nạp CAR vào tế bào T bằng công nghệ Nucleofector.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Tế bào K562 nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (R8758, Sigma), Fetal Bovine Serum (S181G-500, Biowest), CTS Optimizer T cell Expansion (Gibco™ A1048501, Thermo Fisher). Sử dụng bộ kit SF Cell Line (V4XC-2032, Lonza), bộ kit Cell Line Nucleofector V (VCA-1003, Lonza) để chuyển nạp plasmid và minicircle SB.

2. Phương pháp nghiên cứu

** Phương pháp tách PBMC:*

Máu tươi (đã xử lý chống đông) được pha loãng với muối phosphate trung tính PBS - Phosphate-Buffered Saline pH 7,2 (PBS 1X) (10010023, Glico). Sau đó, 10mL hỗn hợp trên được đưa vào ống falcon 15mL chứa sẵn 3mL Ficoll-Paque PREMIUM ($\rho = 1,077$ g/mL) (Cytiva, Thụy Điển). Các ống falcon được ly tâm lạnh 4°C, tốc độ 400 vòng trong 35 phút. Sau khi ly tâm, lớp tế bào đơn nhân PBMC (nằm giữa plasma và Ficoll) được hút ra và hòa vào 10mL PBS 1X (bổ sung thêm 0,5%

huyết thanh bò BSA; pH 7,2). Hỗn hợp trên được ly tâm lạnh 4°C, tốc độ 160 vòng trong 10 phút. Sau khi lặp lại bước trên, dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn và khối tế bào được hòa tan bằng 4mL môi trường nuôi cấy CTS Optimizer complete (A1048501, Thermo Fisher). 200µL PBMC được sử dụng cho đếm tế bào sống chết và phân tích bằng flow cytometry.

** Chuyển nạp vào PBMC:*

Thu 10^7 tế bào PBMC sau khi tách (đếm tế bào sống chết bằng nhuộm trypan blue 0,4% (15250061, Glico) trên máy đếm và phân tích tế bào Countess® II FL - Invitrogen/Thermo Fisher). Nuôi cấy sinh khối tế bào trong 60 giờ, bổ sung bi từ Dynabeads CD3/CD28. Sau nuôi cấy, loại bỏ bi từ bằng nam châm, thu tế bào. Hòa tan sinh 10^6 tế bào bằng 100µL dung dịch chuyển nạp P3 Primary Cells (Lonza), 1µg plasmid SB100X và 10µg plasmid hoặc minicircle tạo CAR-T tương ứng. Hỗn hợp trên được chuyển vào Cuvette chuyên dụng (Lonza) và được chuyển nạp bằng máy 4D Amaxa Nucleofector, sử dụng chương trình EO-115.

** Phương pháp đánh giá hiệu quả quá trình chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB vào tế bào T:*

10µL tế bào được trộn đều với 10µL 0,4% trypan blue, sử dụng máy đếm tự động Countess® II FL - Invitrogen/Thermo Fisher để đếm số lượng tế bào

và tỷ lệ tế bào sống chết. Lấy 10^6 tế bào sau chuyển nạp, nhuộm với protein CD19 tái tổ hợp gắn FITC (Abcam, ab246020) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, chạy flow cytometry và phân tích với máy BD FACSlyric để thu được tỷ lệ tế bào dương tính với thụ thể CD19, từ đó đánh giá được hiệu quả của quá trình chuyển nạp.

** Xử lý số liệu:*

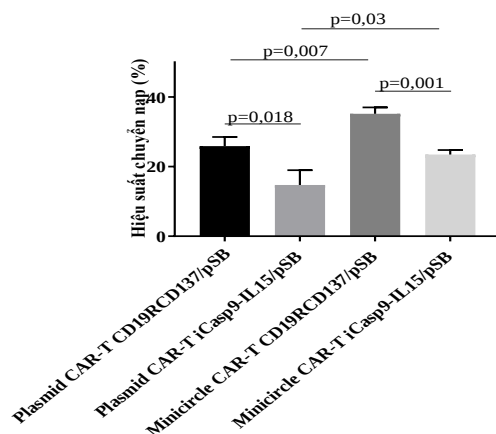
Phân tích dữ liệu nghiên cứu bằng phần mềm SPSS 20.0 và GraphPad Prism 8.4.3, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$. Với các phân phối chuẩn: So sánh trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test, so sánh trung bình của 3 nhóm bằng phân tích phương sai anova. Với các phân phối không chuẩn: So sánh trung vị của 2 nhóm độc lập bằng kiểm định Mann-Whitney. Các biến định tính được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm (%) và kiểm định sự khác biệt giữa 2 nhóm bằng kiểm định Chi-square và Fisher's exact test.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức tại Bệnh viện Quân y 103 (Số 180/2021/CNChT-HĐĐĐ ngày 10/8/2021). Số liệu nghiên cứu được Ban chủ nhiệm đề tài Mã số: KC10.39/16-20 và Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

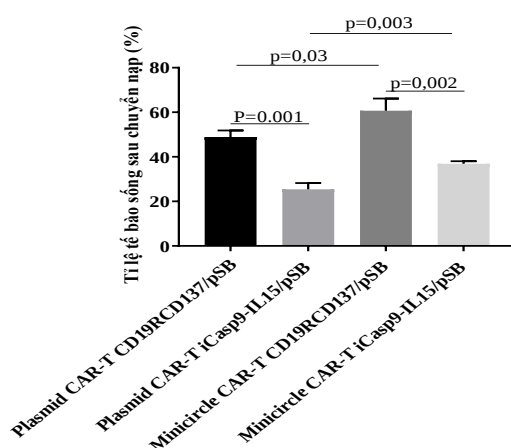
1. Kết quả chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB vào tế bào T



Hình 1. Hiệu suất chuyển nạp vào PBMC sử dụng các plasmid và minicircle.

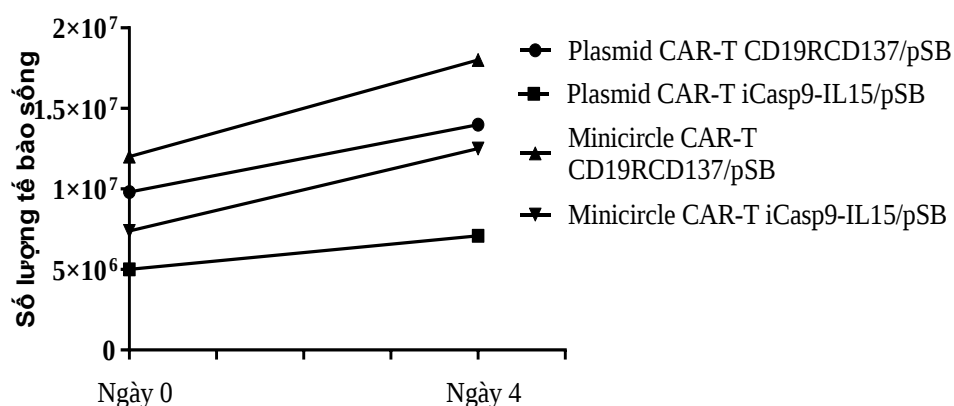
Sau khi đã tối ưu hóa quá trình chuyển nạp, chúng tôi đã thực hiện chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle tạo khối tế bào CAR-T tương ứng. Kết quả cho thấy cấu trúc plasmid CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 cho hiệu suất chuyển nạp cao hơn so với cấu trúc CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4 (25,88% với 14,72%). Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy với các cấu trúc minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB và CAR-T iCasp9-IL15/pSB (35,12% với 23,48%) (Hình 1).

2. Kết quả đánh giá hiệu quả quá trình chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB vào tế bào T



Hình 2. Tỷ lệ tế bào sống sau chuyển nạp với các plasmid và minicircle tạo tế bào CAR-T.

Tương tự với hiệu suất chuyển nạp, tỷ lệ tế bào sống sau chuyển nạp có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 (48,9%) so với CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4 (25,4%); giữa plasmid và minicircle (Hình 2). Trong khi đó, hai cấu trúc minicircle cho tỷ lệ sống sau chuyển nạp là 60,7% và 36,9%.



Hình 3. Số tế bào sống khi tăng sinh với IL-2.

Có thể thấy sự tăng sinh của tế bào khi quan sát trong thời gian ngắn (4 ngày) nuôi cùng với IL-2 (100 U/mL), qua đó chứng minh một phần rằng quần thể PBMC vẫn giữ được chức năng sau quá trình chuyển nạp (Hình 3).

BÀN LUẬN

1. Kết quả chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB vào tế bào T

Sau khi đã tối ưu hóa quá trình chuyển nạp, chúng tôi đã thực hiện chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle tạo khối tế bào CAR-T tương ứng. Kết quả cho thấy cấu trúc plasmid CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 cho hiệu suất chuyển nạp cao hơn đáng kể so với cấu trúc CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4 (25,88% so với 14,72%).

Kết quả tương tự cũng quan sát thấy đối với các cấu trúc minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB và CAR-T iCasp9-IL15/pSB (35,12% so với 23,48%). Điều này có thể được giải thích bởi sự khác biệt về kích thước giữa cấu trúc thế hệ 2 và thế hệ 4 (≈ 7100 bp so với ≈ 10.000 bp). Chuyển gene bằng điện là một kỹ thuật an toàn và hiệu quả để chuyển acid nucleic ở mọi kích thước. Sử dụng plasmid phóng viên nhỏ (3,5kbp), chuyển điện hơn 90% tế bào, với khả năng sống $\approx 70\%$, có thể đạt

được thường xuyên ngay cả trong các tế bào nguyên phát như tế bào gốc trung mô. Tuy nhiên, trong cùng điều kiện thử nghiệm, chuyển điện plasmid lớn hơn (từ 6 - 16kbp) dẫn đến khả năng sống và hiệu quả chuyển gene rất thấp. Những sự suy giảm mạnh này có liên quan trực tiếp đến kích thước vật lý của phân tử plasmid. Hơn nữa, plasmid lớn chỉ độc hại khi các tế bào tiếp xúc với xung chuyển điện. Độc tính cụ thể này của plasmid lớn trong quá trình chuyển điện không phải do biểu hiện gene chuyển và xảy ra trong vòng chưa đầy 45 phút. Thật vậy, thời gian phục hồi sau xung lên đến 45 phút có thể loại bỏ hoàn toàn độc tính cụ thể của chuyển điện plasmid lớn, dẫn đến hiệu quả sống sót và chuyển gene giống hệt như plasmid nhỏ. Quá trình chuyển điện của plasmid nhỏ và lớn có thể đạt tới 90 - 99% quá trình chuyển gene với tỷ lệ sống sót là 60 - 90% [1]. Khi so sánh giữa dạng cấu trúc plasmid và minicircle, kết quả cũng cho thấy các cấu trúc minicircle cho hiệu suất chuyển nạp tốt hơn plasmid đúng như dự đoán. Một lần nữa, hiệu suất của phản ứng chuyển nạp có thể đã bị ảnh hưởng bởi kích thước của các cấu trúc. Có thể trong cùng một điều kiện chuyển nạp, cấu trúc minicircle CAR-T CD19RCD137/pSB cho hiệu suất cao nhất.

2. Kết quả đánh giá hiệu quả quá trình chuyển nạp các cấu trúc plasmid và minicircle SB vào tế bào T

Tương tự với hiệu suất chuyển nạp, kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tế bào sống sau chuyển nạp của CAR-T CD19RCD137/pSB thế hệ 2 cao hơn có ý nghĩa so với CAR-T iCasp9-IL15/pSB thế hệ 4, và plasmid cao hơn minicircle. Ngoài ra, có thể quan sát thấy sự tăng sinh của tế bào khi quan sát trong thời gian ngắn (4 ngày) nuôi cùng với IL-2 (100 U/mL), qua đó chứng minh một phần rằng quần thể PBMC vẫn giữ được chức năng sau quá trình chuyển nạp. Hiệu suất chuyển nạp plasmid và minicircle CD19RCD137 trong nghiên cứu này là tương đương với các nghiên cứu trước đây [2, 3]. Đối với cấu trúc iCasp9-IL15, nghiên cứu tiên phong bởi Hoyos V và CS (2010) thực hiện tải nạp với vector virus với hiệu suất $\approx 70\%$ [4]. Ngoài ra, một nghiên cứu gần đây với cấu trúc CAR mang IL-15 (không mang iCasp9) cho hiệu suất chuyển nạp $\approx 50\%$ [5].

KẾT LUẬN

Đã chuyển nạp và tạo thành công khối tế bào CAR-T dựa trên các cấu trúc plasmid và minicircle thế hệ 2 và thế hệ 4. Khối tế bào này là nền tảng cho các thí nghiệm tăng sinh và thử chức năng tế bào CAR-T trong điều trị bệnh bạch cầu lymphocytic cấp tính (ALL).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lesueur LL, Mir LM, André FM. Overcoming the specific toxicity of large plasmids electrotransfer in primary cells in vitro. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. 2016; 5.
2. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*. 2013; 341(6148):1233151.
3. Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*. 2013; 341(6148): 1233158.
4. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010; 24(6):1160-1170.
5. Hurton LV, Singh H, Najjar AM, et al. Tethered IL-15 augments antitumor activity and promotes a stem-cell memory subset in tumor-specific T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(48):E7788-E7797.