

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hoàng Hồng Hạnh

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH KHẢ NĂNG MANG KHÁNG NGUYÊN
VIRUS GÂY DỊCH TỄ LỢN CỔ ĐIỂN CỦA CÁC TÚI NGOẠI BÀO EVs
TỪ TẾ BÀO ĐẠI THỰC BÀO NUÔI CẤY**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Hoàng Hồng Hạnh

**NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH KHẢ NĂNG MANG KHÁNG NGUYÊN
VIRUS GÂY DỊCH TẢ LỢN CỔ ĐIỂN CỦA CÁC TÚI NGOẠI BÀO EVs
TỪ TẾ BÀO ĐẠI THỰC BÀO NUÔI CẤY**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC
NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8 42 01 14**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. Lã Thị Huyền

Hà Nội – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Hà Nội, ngày 6 tháng 6 năm 2026

Hoàng Hồng Hạnh

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện Khoa học và Công nghệ – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tôi đã nỗ lực rèn luyện và hoàn thành bản luận văn Thạc sĩ thuộc lĩnh vực Sinh học thực nghiệm. Để có được kết quả này, trước hết tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Lã Thị Huyền cùng toàn thể cán bộ Phòng Công nghệ tế bào và thử nghiệm sinh học – Viện Sinh học, những người đã tận tình chỉ dẫn, động viên và đồng hành cùng tôi trong mọi giai đoạn nghiên cứu.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn tới Ban Lãnh đạo, Phòng Đào tạo và các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt để tôi có thể học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn đúng tiến độ.

Cuối cùng, tôi xin dành lời cảm ơn sâu sắc nhất tới gia đình và bạn bè đã luôn hỗ trợ, động viên và là chỗ dựa tinh thần vững chắc trong suốt thời gian tôi học tập và thực hiện luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 6 tháng 6 năm 2026

Học viên thực hiện

Hoàng Hồng Hạnh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	3
1.1. Tổng quan về túi ngoại bào (Extracellular Vesicles - EVs).....	3
1.1.1. Khái niệm túi ngoại bào và phân loại	3
1.1.2. Chức năng của các EV và phát triển vacxin dựa trên EV	3
1.1.3. Khả năng trình diện kháng nguyên.....	5
1.1.4. Vai trò của túi ngoại bào trong vận chuyển kháng nguyên virus và các ứng dụng thực nghiệm trong miễn dịch học thú y	7
1.2. Tổng quan về virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV)	8
1.2.1. Đặc điểm sinh học phân tử, cấu trúc bộ gen và vai trò của glycoprotein E2 của virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV)	8
1.2.2. Tình hình vaccine và kiểm soát CSFV	10
1.3. Cơ chế điều hòa miễn dịch của CSFV và vai trò của tế bào lympho T trong đáp ứng miễn dịch với CSFV	11
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	12
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	12
2.1.1. Nguyên vật liệu và thiết bị.....	12
2.1.2. Kháng nguyên Virus.....	12
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	12
2.2.1. Nuôi cấy tế bào.....	12
2.2.2. Đánh giá sự biệt hóa thành tế bào tua của tế bào 3D4/2	12
2.2.3. Phân tích biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II bằng kỹ thuật Flow cytometry.....	13
2.2.4. Tế bào tiếp xúc với kháng nguyên tái tổ hợp E2 và thu nhận dịch nuôi cấy.....	13

2.2.5. Phân lập EVs	13
2.2.6. Định lượng kháng nguyên E2 tích lũy trong túi ngoại bào (EVs) bằng phương pháp ELISA.....	14
2.2.7. Xác định đặc điểm sinh học của các EVs.....	14
2.2.8. Phân lập và nuôi cấy tế bào lympho T từ máu ngoại vi lợn.....	16
2.2.9. Túi ngoại bào nguồn gốc từ tế bào trình diện kháng nguyên mang CSFV điều hòa đáp ứng miễn dịch tế bào T.....	16
2.2.10. Đánh giá nồng độ cytokine IL-10 trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2.	17
2.2.11. Phương pháp xử lý số liệu.....	18
Chương 3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN.....	19
3.1. Nuôi cấy và biệt hoá tế bào đại thực bào trong điều kiện in vitro	19
3.1.1. Nuôi cấy tế bào 3D4/2 trong điều kiện tiêu chuẩn và khảo sát sự biệt hóa của tế bào 3D4/2 thành tế bào tua	19
3.1.2. Biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II trên tế bào 3D4/2 sau 5 ngày biệt hoá.....	22
3.2. Đánh giá quá trình xử lý kháng nguyên và tạo các túi ngoại bào (EVs) mang kháng nguyên E2 của CSFV	23
3.2.1. Biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II trên tế bào 3D4/2 sau khi tiếp xúc kháng nguyên.....	23
3.2.2. Đánh giá khả năng mang kháng nguyên của EVs.....	25
3.2.3. Xác định đặc điểm sinh học của túi ngoại bào (EVs) thu nhận từ tế bào 3D4/2 sau khi đã xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp của CSFV	27
3.2.3.1. Hình thái của EVs quan sát bằng SEM	27
3.2.3.2. Phân bố kích thước và nồng độ EVs bằng NTA	29
3.2.3.3. Đặc điểm sinh học của túi ngoại bào bằng phân tích biểu hiện CD63 (ELISA)..	30
3.3. Bước đầu phân tích ảnh hưởng của EVs mang kháng nguyên CSFV lên đáp ứng miễn dịch của tế bào T.	32
3.3.1. Kết quả phân lập và nuôi cấy tế bào lympho T từ máu ngoại vi lợn.....	32
3.3.2. EVs mang kháng nguyên CSFV ảnh hưởng đến tế bào T.....	33

3.3.3. Đánh giá nồng độ cytokine IL-10 trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2.....	35
3.3.4. Đánh giá nồng độ cytokine IFN- α trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2.....	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	39
KẾT LUẬN	40
KIẾN NGHỊ	41
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42

DANH MỤC CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Tiếng anh	Tiếng việt
CSFV	Classical swine fever virus	Virus dịch tả lợn cổ điển
MHC	Major histocompatibility complex	Phức hợp tương thích mô chính
CSF	Classical swine fever	Dịch tả lợn
EVs	Extracellular vesicles	Túi ngoại bào
APCs	Antigen-presenting cells	Tế bào trình diện kháng nguyên
OD	Optical Density	Mật độ quang
PBS	Phosphate-buffered saline	Dung dịch đệm phosphate
FBS	Fetal bovine serum	Huyết thanh bò thai
NTA	Nanoparticle tracking analysis	Phân tích kích thước/số lượng EVs
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	Môi trường nuôi cấy RPMI
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
ANOVA	Analysis of variance	Phân tích phương sai
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Yếu tố kích thích dòng bạch cầu hạt – đại thực bào
SEM	Scanning Electron Microscope	Kính hiển vi điện tử quét

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1: Tỷ lệ phần trăm tế bào 3D4/2 dương tính với các marker bề mặt.....	23
--	----

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Quá trình hình thành và vận chuyển các túi ngoại bào (EV) [7].	3
Hình 1.2. Vai trò của túi ngoại bào trong việc trình diện kháng nguyên [14].	4
Hình 1.3. Cấu trúc của virus CSFV [41].	10
Hình 3.1. Tế bào 3D4/2 nuôi cấy trong môi trường RPMI.	19
Hình 3.2. Tế bào được biệt hóa tại nồng độ 1	20
Hình 3.3. Tế bào được biệt hóa tại nồng độ 2	21
Hình 3.4. Biểu đồ Flow Cytometry đánh giá sự thay đổi kháng nguyên bề mặt của tế bào 3D4/2 sau xử lý: (A) Biểu hiện MHC I; (B) Biểu hiện MHC II.	22
Hình 3.5. Khả năng mang kháng nguyên virus CSFV của các mẫu EVs được xác định bằng phương pháp ELISA (giá trị OD)	25
Hình 3.6. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) của các túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) được phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp virus Dịch tả lợn cổ điển (CSFV). Các cấu trúc dạng cầu với kích thước đa dạng được quan sát rõ ràng.	28
Hình 3.7. Phân bố kích thước của các túi ngoại bào (EVs) thu nhận từ tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp của CSFV được phân tích bằng hệ thống NTA (Particle Metrix). Kết quả cho thấy quần thể EVs có kích thước tập trung chủ yếu trong khoảng 80–200 nm, với đỉnh phân bố tại khoảng 119,6 nm và kích thước trung bình khoảng 136,7 nm.	29
Hình 3.8. Đường chuẩn định lượng CD63 bằng phương pháp ELISA.	30
Hình 3.9. So sánh nồng độ CD63 giữa các túi ngoại bào (EVs).	31
Hình 3.10. Tế bào lympho T sau phân lập và nuôi cấy ổn định trong môi trường TexMACS.	32
Hình 3.11. Tương tác giữa các nhóm EVs và tế bào T qua thử nghiệm MTS.	33
Hình 3.12. Nồng độ cytokine IL-10 sinh ra từ quá trình tương tác giữa tế bào T với các nhóm EVs	35
Hình 3.13. Nồng độ IFN- α trong hệ tương tác giữa tế bào T và các túi ngoại bào (EVs) từ tế bào 3D4/2.	37

MỞ ĐẦU

Dịch tả lợn cổ điển (CSF) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi lợn. Các vaccine hiện có như vaccine sống giảm độc lực và vaccine bất hoạt đã chứng minh hiệu quả trong kiểm soát bệnh, tuy nhiên vẫn tồn tại một số hạn chế như nguy cơ tái độc lực, yêu cầu bảo quản nghiêm ngặt và khó phân biệt giữa động vật nhiễm tự nhiên với động vật đã tiêm phòng. Bên cạnh đó, sự lưu hành của các chủng virus độc lực trung bình hoặc thấp gây nhiễm trùng tiềm ẩn và ức chế miễn dịch tiếp tục đặt ra thách thức cho công tác kiểm soát dịch bệnh. Do đó, việc nghiên cứu các hướng vaccine mới mang tính bổ sung và cải tiến là cần thiết nhằm nâng cao hiệu quả phòng chống CSF trong thực tế.

Trong bối cảnh toàn cầu hóa, việc kiểm soát các bệnh truyền nhiễm xuyên biên giới (như CSF, ASF, PRRS) là ưu tiên hàng đầu để đảm bảo an ninh lương thực. Tại Việt Nam, chăn nuôi lợn là ngành sản xuất chủ lực, xếp thứ 5 thế giới về tổng đàn (năm 2022). Tuy nhiên, sự đe dọa thường trực từ dịch bệnh, đặc biệt là CSF, đang ảnh hưởng nặng nề đến sự phát triển bền vững của ngành.

Những năm gần đây, túi ngoại bào (Extracellular Vesicles – EVs) nổi lên như một nền tảng công nghệ đột phá trong phát triển vaccine thế hệ mới. EVs là các cấu trúc nano màng kép do tế bào tiết ra, mang theo protein, lipid và acid nucleic tham gia vào quá trình truyền tin và trình diện kháng nguyên. Nhiều nghiên cứu quốc tế chứng minh EVs từ tế bào nhiễm virus có thể chứa kháng nguyên đặc hiệu và kích thích mạnh mẽ cả đáp ứng miễn dịch dịch thể lẫn miễn dịch qua trung gian tế bào. Tuy nhiên, tại Việt Nam, các nghiên cứu ứng dụng EVs trong lĩnh vực thú y, đặc biệt là đối với virus CSFV, vẫn còn rất hạn chế.

Xuất phát từ những đòi hỏi thực tiễn và khoảng trống nghiên cứu trên, đề tài **“Nghiên cứu phân tích khả năng mang kháng nguyên virus gây dịch tả lợn cổ điển của các túi ngoại bào EVs từ tế bào đại thực bào nuôi cấy”** được thực hiện nhằm tìm kiếm một hướng tiếp cận mới, an toàn và hiệu quả trong phòng chống bệnh CSF.

Mục tiêu: Xây dựng và đánh giá được khả năng mang epitope kháng nguyên E2 từ virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV) của hệ thống túi ngoại bào (EVs) có nguồn gốc từ đại thực bào nuôi cấy.

Nội dung:

1. Nuôi cấy và biệt hoá tế bào đại thực bào 3D4/2 trong điều kiện *in vitro*.
2. Đánh giá quá trình xử lý kháng nguyên và tạo các túi ngoại bào (EVs) mang epitope kháng nguyên E2 của CSFV.
3. Bước đầu phân tích ảnh hưởng của EVs mang epitope kháng nguyên CSFV lên đáp ứng miễn dịch của tế bào T.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

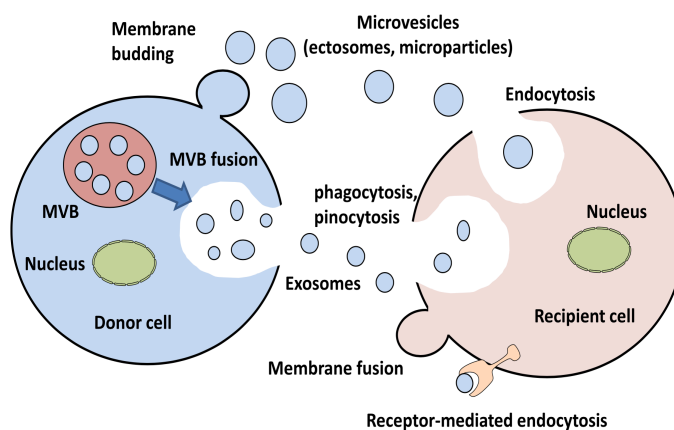
1.1. Tổng quan về túi ngoại bào (Extracellular Vesicles - EVs)

1.1.1. Khái niệm túi ngoại bào và phân loại

Túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) là các cấu trúc màng kép kích thước nano, được tiết ra từ hầu hết các loại tế bào và chứa nhiều phân tử hoạt tính sinh học như lipid, protein và RNA [1, 2]. EVs được mô tả lần đầu tiên vào năm 1967 và có thể được tìm thấy trong nhiều dịch cơ thể như máu, nước bọt và sữa mẹ [2, 3].

Dựa trên kích thước, cấu trúc và nguồn gốc sinh học, EVs thường được chia thành hai nhóm chính là exosome và vi túi (microvesicles – MVs) [4]. Exosome có kích thước khoảng 30–150 nm, được hình thành từ các thể đa túi (MVBs) trong tế bào và được giải phóng ra ngoại bào khi MVBs hợp nhất với màng sinh chất [5].

EVs phân bố rộng rãi trong cơ thể động vật có vú và có thể được phân lập từ nhiều loại dịch sinh học khác nhau [2]. Ở lợn, exosome đã được nghiên cứu từ nhiều nguồn, trong đó các marker như CD63, CD9 và CD81 cho thấy sự khác biệt về mức độ biểu hiện giữa exosome và microvesicle, phản ánh sự đa dạng về nguồn gốc và đặc tính sinh học của các EVs [6].



Hình 1.1. Quá trình hình thành và vận chuyển các túi ngoại bào (EV) [7].

1.1.2. Chức năng của các EV và phát triển vaccin dựa trên EV

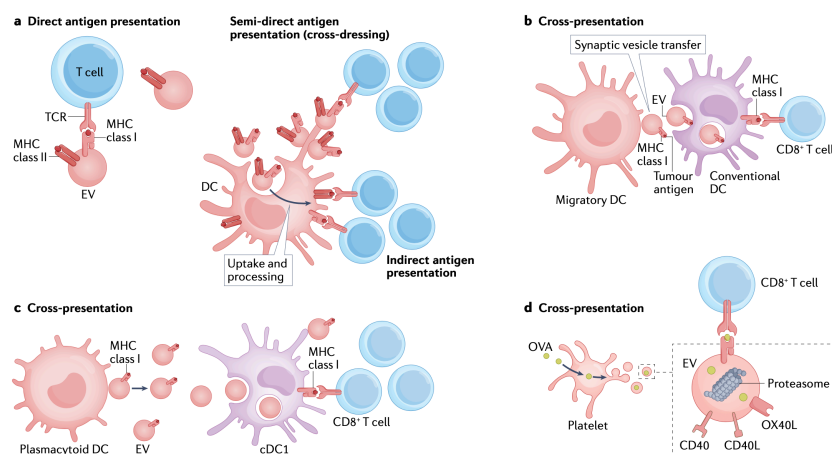
Các túi ngoại bào (EVs) là các cấu trúc màng kép hình cầu chứa cytosol, được tiết ra bởi cả tế bào nhân chuẩn và nhân sơ vào môi trường ngoại bào. EVs đóng vai trò quan trọng trong giao tiếp liên tế bào, thông qua việc vận chuyển các phân tử sinh học như protein, chất chuyển hóa và acid nucleic, từ đó điều hòa trạng thái sinh lý của tế bào nhận [1, 7]. Về mặt chức năng, EVs có khả năng điều hòa miễn dịch đa dạng, bao gồm giảm viêm thông qua các protein, yếu tố tăng trưởng, miRNA và

cytokine; tăng cường miễn dịch thông qua chemokine và cytokine; đồng thời thúc đẩy tái tạo mô nhờ các yếu tố tăng trưởng và interleukin [1, 8].

Trong nhiễm virus, EVs có thể đóng vai trò hai mặt. Một mặt, EVs có thể góp phần lan truyền virus bằng cách vận chuyển các thụ thể xâm nhập (ví dụ CCR5 trong HIV) hoặc mang các thành phần virus gây độc tế bào. Mặt khác, EVs cũng có thể mang các yếu tố kháng virus và kích thích đáp ứng miễn dịch, như exosome từ tế bào lympho B biểu hiện protein EBV gp350 giúp tăng cường miễn dịch chống virus [8, 9].

EVs ngày càng được quan tâm trong phát triển vaccine nhờ khả năng mang và trình diện kháng nguyên tự nhiên. Thành phần của EVs có thể xâm nhập vào tế bào đích và điều hòa quá trình nhiễm virus [8, 10]. Ví dụ, EVs mang microRNA có thể ức chế các thụ thể như CD163 hoặc sialoadhesin, từ đó hạn chế sự xâm nhập của virus PRRSV [10, 11]. Ngoài ra, EVs còn tham gia điều hòa miễn dịch bẩm sinh và thích ứng thông qua tương tác với các tế bào miễn dịch [8, 12]. Bên cạnh đó, EVs, đặc biệt là exosome, chứa nhiều acid nucleic và protein đặc hiệu, liên quan đến các quá trình bệnh lý như ung thư, do đó được xem là nguồn dấu ấn sinh học tiềm năng trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh [12, 13]. Đáng chú ý, thành phần của exosome có thể thay đổi theo trạng thái sinh lý hoặc bệnh lý, ảnh hưởng đến chức năng sinh học và khả năng nhắm đích của chúng.

EVs không chỉ đóng vai trò trung gian trong giao tiếp tế bào mà còn tham gia sâu vào cơ chế bệnh sinh, điều hòa miễn dịch và phát triển vaccine, mở ra nhiều hướng ứng dụng trong y học và thú y [8, 12].



Hình 1. 2. Vai trò của túi ngoại bào trong việc trình diện kháng nguyên [14].

EVs có thể trình diện kháng nguyên trực tiếp thông qua các phân tử MHC trên bề mặt cho tế bào T, hoặc gián tiếp thông qua tế bào tua (DC). EVs có thể gắn lên bề

mặt DC (cross-dressing) hoặc được nội hóa, xử lý và trình diện lại kháng nguyên, từ đó kích hoạt tế bào T CD8⁺. Ngoài ra, EVs còn tham gia vào quá trình trình diện chéo thông qua việc vận chuyển kháng nguyên giữa các DC trong hạch bạch huyết. Đáng chú ý, EVs có nguồn gốc từ tiểu cầu có thể xử lý protein thành peptide, nạp lên MHC lớp I và trình diện cho tế bào T, đồng thời mang các phân tử đồng kích thích, cho thấy khả năng hoạt động như các đơn vị trình diện kháng nguyên hoàn chỉnh.

1.1.3. Khả năng trình diện kháng nguyên

Việc chứng minh khả năng trình diện kháng nguyên của EV là phát hiện quan trọng đầu tiên cho thấy EV có thể có vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch thích ứng. Năm 1996, Graça Raposo và cộng sự lần đầu tiên cho thấy EVs có nguồn gốc từ tế bào lympho B mang phức hợp peptide–MHC (pMHC) và có khả năng trình diện trực tiếp kháng nguyên cho tế bào T, mở ra khái niệm EVs như các đơn vị trình diện kháng nguyên di động [15].

Hiệu quả của việc trình diện kháng nguyên sẽ tăng lên nếu EV mang pMHC được gắn vào bề mặt tế bào tua (DC) [12]. Trong trường hợp này, số exosome gắn DC ít hơn khoảng 100 lần so với exosome tự do để đạt được cùng mức độ kích hoạt tế bào T. Cơ chế được cho là các DC “trình diện chéo – cross dressing” tập trung một số lượng lớn pMHC liên quan đến EV để hình thành khớp thần kinh miễn dịch và kích hoạt tế bào T (Hình 1.2a). Cơ chế này được hỗ trợ bởi quan sát rằng tương tự như các DC “cross dressing”, các exosome cũng kích hoạt các tế bào T. Ngoài các cơ chế trình diện kháng nguyên trực tiếp và bán trực tiếp (qua trung gian) của EV, các túi mang pMHC cũng như kháng nguyên nguyên vẹn có thể được nội hóa và xử lý hiệu quả bởi các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) để trình bày kháng nguyên gián tiếp [12, 5].

Gần đây, sự tham gia của EV vào việc trình diện chéo đã thu hút được sự chú ý đáng kể. Sự trình diện chéo của các kháng nguyên ngoại sinh trên phức hợp MHC lớp I với tế bào T CD8⁺ có vai trò quan trọng trong khả năng miễn dịch chống lại virus và khối u cũng như trong phản ứng miễn dịch khi tiêm chủng và cảm ứng dung nạp. Các cDC được dung hợp với các exosome mang pMHC lớp I có thể tạo ra kích hoạt thành công các tế bào T CD8⁺ [16]. Hơn nữa, việc chuyển các túi synap giữa DC của người cho và người nhận thông qua liên kết tế bào–tế bào chặt chẽ và bền vững có liên quan đến quá trình môi chéo của các tế bào T CD8⁺ đặc hiệu của khối u [17]. (Hình 1.2b). Trong trường hợp này, các DC di cư mang kháng nguyên khối u rời khỏi môi trường vi mô khối u và di chuyển đến các hạch bạch huyết khu vực.

Trong các hạch bạch huyết, các DC di cư này giải phóng EV mang phức hợp pMHC lớp I có thể được chuyển tiếp qua khớp thần kinh đến các DC cư trú trong hạch bạch huyết. Cơ chế này được đề xuất là con đường chủ đạo để nạp các DC cư trú trong hạch để trình diện kháng nguyên cho tế bào T CD8+. Dữ liệu gần đây cũng cho thấy sự liên quan của EV có nguồn gốc từ plasmacytoid trong việc chuyển kháng nguyên sang các tế bào cDC1 để trình diện chéo sang các tế bào T CD8 + ngây thơ [18] (Hình 1.2c). Vẫn chưa rõ liệu EV có nguồn gốc từ plasmacytoid có cho phép trình diện kháng nguyên bởi cDC thông qua một quá trình tương tự như trình diện chéo hoặc thông qua sự hấp thu và xử lý EV để trình diện gián tiếp hay không.

Cuối cùng, một phát hiện mới thú vị là các EV có nguồn gốc từ tiểu cầu cỡ trung bình có thể hoạt động như các đơn vị chức năng hoàn chỉnh cho việc trình diện kháng nguyên; chúng không chỉ mang phức hợp pMHC lớp I và các phân tử đồng kích thích (CD40L, CD40 và OX40L) trên bề mặt mà còn chứa các proteasome 20S chức năng để cho phép tạo ra peptide để trình diện kháng nguyên. Điều quan trọng là trong điều kiện thí nghiệm, các proteasome của EV có nguồn gốc từ tiểu cầu có thể xử lý kháng nguyên ngoại sinh và nạp các peptide thu được vào các phân tử MHC lớp I, dẫn đến sự tăng sinh của các tế bào T CD8+ đặc hiệu của kháng nguyên [19].

Ở chiều ngược lại, EVs cũng đóng vai trò quan trọng trong việc cảm ứng dung nạp miễn dịch và hỗ trợ các cơ chế né tránh miễn dịch. EVs có nguồn gốc từ tế bào u hoặc tế bào tua chưa trưởng thành thường mang các phân tử ức chế như PD-L1 hoặc FasL, có khả năng tương tác với các thụ thể tương ứng trên tế bào T để làm suy giảm chức năng hiệu ứng của chúng [20]. Ngoài ra, EVs chứa các cytokine ức chế như TGF- β và IL-10 có thể thúc đẩy sự biệt hóa tế bào T điều hòa (Tregs), từ đó tạo ra một môi trường dung nạp miễn dịch bền vững [8]. Sự thiếu hụt các tín hiệu đồng kích thích (CD80/CD86) trên EVs mang pMHC cũng có thể dẫn đến trạng thái vô cảm (anergy) của tế bào T khi nhận diện kháng nguyên, làm suy giảm khả năng đáp ứng miễn dịch trong tương lai [12]. Bên cạnh đó, sự hiện diện của các phân tử gây chết theo chương trình như FasL hoặc TRAIL trên EVs có thể trực tiếp cảm ứng apoptosis ở các tế bào T đang hoạt động, góp phần làm giảm hiệu quả của đáp ứng miễn dịch [12, 21]. Về cơ chế phân tử, EVs tác động lên tế bào T thông qua nhiều con đường khác nhau, bao gồm truyền tải protein chức năng (như pMHC và các phân tử đồng kích thích), vận chuyển các phân tử acid nucleic như miRNA và mRNA để điều hòa biểu hiện gen, cũng như thông qua các tín hiệu cytokine [22].

Như vậy, EVs đóng vai trò là các trung gian quan trọng trong điều hòa đáp ứng miễn dịch tế bào T thông qua nhiều cơ chế khác nhau, từ hoạt hóa mạnh mẽ đến

ức chế miễn dịch. Tính chất hai mặt này phụ thuộc vào nguồn gốc EVs, trạng thái hoạt hóa của tế bào sinh ra chúng và bối cảnh sinh lý hoặc bệnh lý, đặc biệt trong nhiễm virus như CSFV [8, 22].

1.1.4. Vai trò của túi ngoại bào trong vận chuyển kháng nguyên virus và các ứng dụng thực nghiệm trong miễn dịch học thú y

Trong những năm gần đây, túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) đã được công nhận là một thành phần trung gian quan trọng trong tương tác giữa virus và vật chủ, không chỉ đóng vai trò trong truyền thông tin liên tế bào mà còn tham gia trực tiếp vào quá trình vận chuyển các thành phần của virus. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các tế bào nhiễm virus có khả năng tiết ra EVs mang các protein cấu trúc của virus, đặc biệt là các glycoprotein vỏ, thông qua sự tương tác với hệ thống phân loại nội bào như phức hợp ESCRT. Nhờ đó, các protein này được trình diện trên bề mặt EVs với cấu hình gần tương tự virus tự nhiên, cho phép tương tác với tế bào đích và ảnh hưởng đến các con đường tín hiệu miễn dịch [8, 23].

Bên cạnh protein, EVs còn có khả năng bao gói và vận chuyển các acid nucleic có nguồn gốc virus, bao gồm RNA bộ gen, mRNA mã hóa protein virus và các phân tử small non-coding RNA. Các phân tử này được bảo vệ trong lớp màng lipid kép của EVs, giúp tránh khỏi sự phân hủy bởi RNase trong môi trường ngoại bào và duy trì tính ổn định trong tuần hoàn sinh học. Quan trọng hơn, EVs mang RNA virus có thể được hấp thu bởi các tế bào chưa nhiễm, từ đó điều hòa biểu hiện gen hoặc khởi phát các quá trình sinh học tương tự như nhiễm virus, đại diện cho một cơ chế lan truyền tín hiệu di truyền không phụ thuộc virion [24, 25].

Từ các đặc điểm sinh học này, EVs được xem là một nền tảng đầy tiềm năng cho các ứng dụng trong miễn dịch học, đặc biệt là phát triển vaccine thế hệ mới và các chiến lược chẩn đoán. Các EVs mang kháng nguyên virus có thể hoạt động như một dạng “vaccine phi tế bào” (cell-free vaccines), có khả năng kích thích cả đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào nhờ cấu trúc màng lipid tương thích sinh học cao và khả năng trình diện kháng nguyên tự nhiên, đồng thời không mang nguy cơ tái hoạt hóa độc lực như vaccine sống giảm độc lực [26, 27]. Ngoài ra, do EVs hiện diện rộng rãi trong các dịch sinh học và phản ánh trạng thái của tế bào nguồn, việc phát hiện các protein hoặc RNA virus trong EVs được xem là một phương pháp chẩn đoán không xâm lấn có độ nhạy và độ đặc hiệu cao [13, 25].

Các bằng chứng thực nghiệm đã cho thấy tiềm năng ứng dụng đáng kể của túi ngoại bào (EVs) trong lĩnh vực thú y, đặc biệt trong phát triển vắc-xin. Một trong những nghiên cứu đầu tiên được thực hiện trên mô hình nhiễm *Eimeria tenella* ở gà. Kết quả cho thấy động vật được tiêm EV có mức độ tổn thương ruột giảm, tỷ lệ tử vong thấp hơn và tăng trưởng tốt hơn so với nhóm đối chứng [28].

Tuy nhiên, việc ứng dụng EV trong các bệnh do virus còn hạn chế do sự tương đồng về kích thước, tỷ trọng và con đường sinh học giữa EV và virus, gây khó khăn trong quá trình phân tách và phân tích [9]. Một số nghiên cứu ban đầu cho thấy kết quả chưa đồng nhất, như mô hình virus LCMV, trong đó EV từ tế bào tua không kích hoạt hiệu quả đáp ứng tế bào T gây độc và không bảo vệ vật chủ [29]. Ngược lại, một số hướng tiếp cận mới đã cho thấy tiềm năng rõ rệt. Điển hình là việc sử dụng EV để vận chuyển microRNA nhằm ức chế virus PRRSV ở lợn thông qua việc giảm biểu hiện các thụ thể quan trọng như CD163 và sialoadhesin. Kết quả cho thấy sự giảm đáng kể hiệu giá virus, chứng minh hiệu quả kháng virus và khả năng ứng dụng rộng rãi [30].

Mặc dù vẫn còn những thách thức như kỹ thuật tinh sạch, định lượng và đánh giá độ an toàn, EV được xem là một chiến lược đầy triển vọng trong phát triển vắc-xin và liệu pháp miễn dịch. Một số nghiên cứu tiền lâm sàng đã cho kết quả tích cực, mở ra tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát bệnh truyền nhiễm ở động vật [9, 30]. Bên cạnh đó, EV còn có khả năng tương tác trực tiếp với các tế bào miễn dịch, đặc biệt là tế bào lympho T, qua đó điều hòa và định hướng đáp ứng miễn dịch của vật chủ [9, 19].

1.2. Tổng quan về virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV)

1.2.1. Đặc điểm sinh học phân tử, cấu trúc bộ gen và vai trò của glycoprotein E2 của virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV)

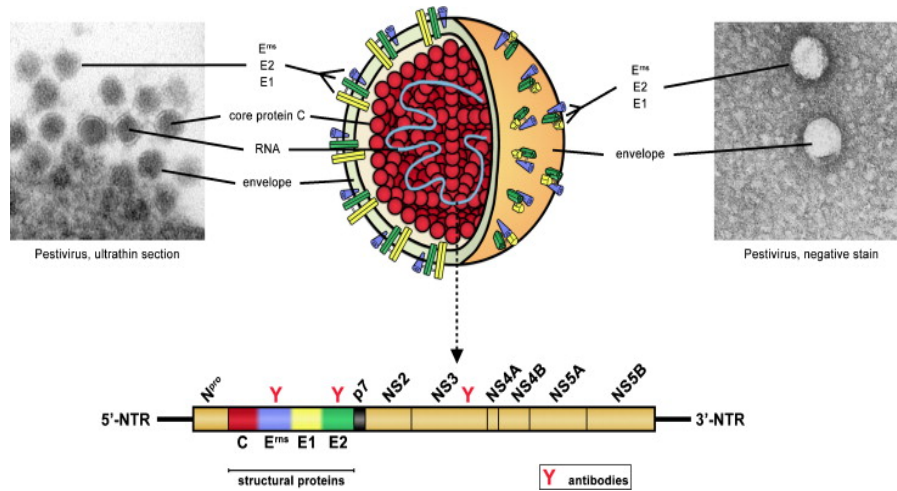
Dịch tả lợn cổ điển (CSF) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính nguy hiểm trên lợn, do virus dịch tả lợn cổ điển (Classical swine fever virus - CSFV) gây ra, có khả năng lây lan nhanh với tỷ lệ tử vong cao, kìm hãm nghiêm trọng sự phát triển của ngành chăn nuôi lợn [31, 32]. Bệnh có thể biểu hiện dưới nhiều thể lâm sàng khác nhau, bao gồm cấp tính, bán cấp và mãn tính, phụ thuộc vào độc lực của chủng CSFV, tình trạng miễn dịch của vật chủ cũng như các yếu tố môi trường tác động. Chiến lược kiểm soát CSF nói chung là sự kết hợp giữa tiêm phòng vắc-xin bắt buộc và loại bỏ lợn bệnh [33], nhưng dưới áp lực cao của việc tiêm phòng bắt buộc, CSF vẫn liên tục xuất hiện.

Classical swine fever virus là virus RNA sợi đơn dương, có kích thước bộ gen khoảng 12,3 kb, thuộc chi *Pestivirus*, họ *Flaviviridae* [34]. Bộ gen của virus bao gồm ba thành phần chính: vùng không mã hóa đầu 5' (5'-UTR), một khung đọc mở duy nhất (open reading frame – ORF) và vùng không mã hóa đầu 3' (3'-UTR). ORF này được dịch mã thành một polyprotein tiền thân, sau đó được xử lý bởi các protease của virus và enzyme của tế bào chủ để tạo thành các protein trưởng thành có chức năng riêng biệt [35, 36].

Cụ thể, polyprotein của CSFV được phân cắt thành bốn protein cấu trúc gồm capsid (C), Erns, E1 và E2, cùng với tám protein không cấu trúc bao gồm Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A và NS5B. Trong đó, các protein không cấu trúc chủ yếu tham gia vào quá trình sao chép RNA và điều hòa đáp ứng miễn dịch của vật chủ, trong khi các protein cấu trúc đóng vai trò quan trọng trong hình thành virion và tương tác với tế bào đích [33, 35]. Đáng chú ý, glycoprotein E2 được xem là kháng nguyên quan trọng nhất của CSFV do có khả năng sinh miễn dịch mạnh, kích thích cơ thể vật chủ tạo ra lượng lớn kháng thể trung hòa. Nhờ đặc tính này, E2 được lựa chọn làm ứng viên hàng đầu trong phát triển vắc-xin tiểu đơn vị cũng như các hệ thống chẩn đoán huyết thanh học [35, 37].

Protein E2 là glycoprotein quan trọng nhất của virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV), gồm khoảng 373 acid amin, có khối lượng ~55 kDa và chứa nhiều vị trí glycosyl hóa. E2 có peptide tín hiệu ở đầu N và vùng xuyên màng ở đầu C giúp neo vào màng virus, đồng thời có khả năng tạo homodimer thông qua liên kết disulfide. Về chức năng, E2 đóng vai trò trung tâm trong quá trình xâm nhập tế bào và là kháng nguyên chính kích thích đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là tạo kháng thể trung hòa bảo vệ. Các epitop kháng nguyên của E2 được chia thành bốn miền (A–D), trong đó miền A và D có tính bảo tồn cao và liên quan trực tiếp đến khả năng trung hòa virus. Một số epitop bảo tồn cao đã được ứng dụng trong phát triển vắc-xin đánh dấu và các xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh học. Ngoài ra, E2 còn tham gia vào cơ chế dung hợp màng thông qua tương tác với protein E1 trong điều kiện pH thấp của endosome. Một số nghiên cứu cũng cho thấy E2 có liên quan đến quá trình gắn virus lên tế bào chủ và tương tác với các yếu tố như CD46, góp phần vào vòng đời và độc lực của virus [38, 39].

Ngoài nhiễm trùng cấp tính, CSFV thường gây ra nhiễm trùng dai dẳng mãn tính. Lợn bị nhiễm bệnh mãn tính thải ra virus và các kháng thể cụ thể sẽ được phát hiện nhưng không loại bỏ được virus [40], điều này cho thấy CSFV có thể chống lại phản ứng kháng thể của vật chủ thông qua một cơ chế cụ thể.



Hình 1.3. Cấu trúc của virus CSFV [41].

1.2.2. Tình hình vaccine và kiểm soát CSFV

Hiện nay, kiểm soát bệnh dịch tả lợn cổ điển (CSF) chủ yếu dựa vào tiêm phòng vaccine kết hợp tiêu hủy động vật nhiễm nhằm hạn chế lây lan [40]. Trong đó, vaccine đóng vai trò trung tâm trong việc tạo miễn dịch chủ động và bảo vệ đàn vật nuôi.

Vaccine sống giảm độc lực (điển hình là chủng C-strain) được sử dụng rộng rãi nhờ khả năng kích thích miễn dịch mạnh và kéo dài. Tuy nhiên, loại vaccine này tồn tại nhiều hạn chế như nguy cơ tái hoạt virus, khó đảm bảo an toàn sinh học và không đáp ứng tiêu chí DIVA, gây khó khăn trong giám sát dịch tễ [37]. Vaccine bất hoạt có độ an toàn cao hơn nhưng hiệu quả miễn dịch thấp hơn, cần tiêm nhắc lại nhiều lần và phụ thuộc vào điều kiện bảo quản nghiêm ngặt [42].

Các nền tảng vaccine thế hệ mới như vaccine tiểu đơn vị, DNA và vector virus đã được phát triển nhằm khắc phục các hạn chế trên. Trong đó, glycoprotein E2 là kháng nguyên quan trọng nhất, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ và tạo kháng thể trung hòa. Tuy nhiên, các vaccine này vẫn gặp thách thức về hiệu quả bảo hộ, khả năng kích thích miễn dịch tế bào và chi phí sản xuất, đồng thời việc đáp ứng tiêu chí DIVA chưa hoàn toàn tối ưu [37]. Nhiều nghiên cứu đã tập trung phát triển vaccine tái tổ hợp và hệ thống DIVA dựa trên các protein như E2, Erns và NS3, trong đó E2 có tính sinh miễn dịch cao, còn Erns thường được sử dụng làm marker phân biệt [42].

Tại Việt Nam, mặc dù vaccine sống giảm độc lực được sử dụng rộng rãi, sự lưu hành của các biến chủng CSFV mới có thể ảnh hưởng đến hiệu quả bảo hộ của vaccine hiện hành [43]. Đồng thời, các hướng tiếp cận mới như ứng dụng túi ngoại bào (EVs) trong phát triển vaccine vẫn còn hạn chế.

Trong bối cảnh đó, EVs được xem là nền tảng tiềm năng nhờ khả năng mang và trình diện kháng nguyên tự nhiên, kích thích cả miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào. Các nghiên cứu trên *Eimeria tenella* và PRRSV cho thấy EVs có thể tạo đáp ứng miễn dịch hiệu quả và được đề xuất như một hướng phát triển vaccine an toàn, không chứa virus sống [10, 44]. Mặc dù vaccine truyền thống đã góp phần kiểm soát CSF, vẫn còn nhiều hạn chế cần khắc phục. Việc nghiên cứu các nền tảng mới như EVs mang kháng nguyên (đặc biệt là protein E2) là hướng đi tiềm năng nhằm nâng cao hiệu quả phòng bệnh và đáp ứng yêu cầu kiểm soát dịch bệnh hiện đại.

1.3. Cơ chế điều hòa miễn dịch của CSFV và vai trò của tế bào lympho T trong đáp ứng miễn dịch với CSFV

Virus Classical Swine Fever Virus (CSFV) sử dụng nhiều cơ chế để né tránh và điều hòa đáp ứng miễn dịch của vật chủ, qua đó tạo điều kiện cho sự nhân lên và tồn tại dai dẳng. Một cơ chế quan trọng là ức chế con đường interferon type I (IFN-I) thông qua protein Npro, làm giảm hoạt hóa các yếu tố phiên mã IRF-3/IRF-7 [45, 46]. Đồng thời, virus còn điều hòa các protein kháng virus nội sinh của tế bào, góp phần làm suy giảm khả năng kiểm soát virus [45].

Bên cạnh đó, CSFV điều chỉnh mạnh mẽ mạng lưới cytokine, với sự gia tăng các cytokine tiền viêm như IL-6 và TNF- α , đồng thời cảm ứng Interleukin-10 (IL-10) – cytokine có vai trò ức chế đáp ứng miễn dịch [47]. Sự mất cân bằng giữa các cytokine này dẫn đến tình trạng rối loạn miễn dịch, vừa làm suy yếu đáp ứng kháng virus vừa góp phần gây tổn thương mô [47].

Tế bào lympho T đóng vai trò trung tâm trong đáp ứng miễn dịch thích ứng chống lại CSFV. Tế bào T CD8⁺ tiêu diệt tế bào nhiễm thông qua cơ chế gây độc tế bào, trong khi tế bào T CD4⁺ điều hòa đáp ứng miễn dịch và hỗ trợ hoạt hóa các tế bào miễn dịch khác. Ngoài ra, tế bào T còn hình thành trí nhớ miễn dịch, giúp tăng hiệu quả bảo vệ khi tái nhiễm [48].

Tuy nhiên, nhiễm CSFV có thể làm suy giảm chức năng tế bào T thông qua ức chế trình diện kháng nguyên, gây lymphopenia và thúc đẩy trạng thái suy kiệt tế bào T [49, 50]. Do đó, tế bào lympho T là mô hình quan trọng để nghiên cứu các cơ chế điều hòa miễn dịch, đặc biệt trong bối cảnh tương tác giữa túi ngoại bào và đáp ứng miễn dịch trong nhiễm CSFV [50].

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên vật liệu và thiết bị

Dòng tế bào đại thực bào 3D4/2 (ATCC® CRL-2845™ - Hoa Kỳ), được duy trì tại Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào và thử nghiệm sinh học, Viện Sinh học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Cột lọc ly tâm 300 kDa và 100 kDa Vivaspin® (Sartorius, Đức) porcine GM-CSF (Gibco, Cat# RP-87798), porcine IL-4 (Gibco, Cat# RP-87793). Môi trường nuôi cấy RPMI-1640 (Gibco-Thermo Scientific, Hoa Kỳ), FBS (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ), kháng sinh Penicillin/Streptomycin (Gibco-Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Môi trường nuôi cấy TexMACS (Miltenyi Biotec, Đức), T Cell TransAct™, cytokine IL-2 (Miltenyi Biotec, Đức),...

Máy Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Đức), tủ ẩm CO₂ (Esco, Mỹ), tủ nuôi cấy tế bào (Sony, Nhật Bản), kính hiển vi thường, máy ly tâm (Eppendorf, Mỹ), bộ điện di DNA (Amersham Pharmacia Biotech, Mỹ), máy soi gel (Wealtec, Mỹ), tủ lạnh âm sâu -20°C; -80°C (Sanaky, Nhật Bản), bộ pipetman (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)... Các thiết bị được đặt tại phòng Công nghệ tế bào và thử nghiệm sinh học, Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Kháng nguyên Virus

Kháng nguyên sử dụng trong nghiên cứu là protein E2 tái tổ hợp của CSFV. Kháng nguyên tái tổ hợp E2 được cung cấp bởi công ty SinoBiological (Mỹ), và được bảo quản ở điều kiện -20°C cho đến khi sử dụng.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nuôi cấy tế bào

Tế bào 3D4/2 được nuôi trong môi trường RPMI-1640, bổ sung 10% FBS và 1% penicillin/streptomycin (PS), trong điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tế bào được cấy chuyển khi đạt mật độ khoảng 80–90%.

2.2.2. Đánh giá sự biệt hóa thành tế bào tua của tế bào 3D4/2

Tế bào được duy trì ở mật độ 80-90% trong môi trường đầy đủ trước thí nghiệm sau đó cấy 5×10^7 tế bào/ml vào môi trường có chứa 2 nồng độ cytokine:

Nồng độ 1: 100 ng/ml porcine GM-CSF + 50 ng/ml porcine IL-4

Nồng độ 2: 100 ng/ml porcine GM-CSF + 20 ng/ml porcine IL-4

Đối chứng âm tính sử dụng môi trường không cytokine. Đĩa nuôi cấy được ủ tại 37°C , 5% CO_2 , tế bào được quan sát hình thái học dưới kính hiển vi chiếu ngược.

2.2.3. Phân tích biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II bằng kỹ thuật Flow cytometry

Mức độ biểu hiện các phân tử phức hợp hòa hợp mô chủ yếu lớp I và II (SLA-I, SLA-II) trên bề mặt tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với protein tái tổ hợp E2 của Classical Swine Fever Virus được xác định bằng phương pháp dòng chảy tế bào (Flow Cytometry).

Sau xử lý, tế bào được thu hoạch, ly tâm và rửa hai lần bằng PBS. Cặn tế bào được huyền phù trong đệm nhuộm (FACS buffer: PBS bổ sung 1–2% BSA), sau đó ủ với kháng thể đơn dòng đặc hiệu SLA-I và SLA-II gắn huỳnh quang trong 30 phút ở 4°C , tránh ánh sáng. Sau ủ, tế bào được rửa để loại bỏ kháng thể tự do.

Mẫu được phân tích trên hệ thống Flow Cytometer (MACSQuant® VYB, Đức). Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng, trong đó giá trị cường độ huỳnh quang trung bình (MFI) hoặc tỷ lệ tế bào dương tính được sử dụng để đánh giá mức độ biểu hiện SLA-I và SLA-II.

2.2.4. Tế bào tiếp xúc với kháng nguyên tái tổ hợp E2 và thu nhận dịch nuôi cấy

Tế bào 3D4/2 sau khi đạt mật độ khoảng 70–80% được thay môi trường nuôi cấy bằng môi trường không chứa FBS. Kháng nguyên tái tổ hợp của CSFV được bổ sung vào môi trường với nồng độ thích hợp, sau đó tế bào được ủ trong điều kiện 37°C , 5% CO_2 trong khoảng 24–48 giờ để tạo điều kiện cho quá trình thu nhận và tiếp xúc kháng nguyên.

2.2.5. Phân lập EVs

Quy trình phân lập và làm giàu EVs bằng phương pháp ly tâm phân đoạn kết hợp lọc qua màng 0,22 μm được thực hiện dựa trên các tiêu chuẩn khuyến cáo của Hiệp hội Quốc tế về Túi ngoại bào [51].

Dịch nuôi cấy tế bào được thu thập và xử lý loại bỏ tế bào và mảnh vụn bằng ly tâm tuần tự: $300 \times g$ trong 5 phút để loại bỏ tế bào nguyên vẹn, sau đó $1.000 \times g$ trong 10 phút để loại bỏ mảnh vụn tế bào và các hạt kích thước lớn. Phần dịch nổi được lọc qua màng 0,22 μm nhằm loại bỏ các vi hạt lớn.

Dịch sau lọc được cô đặc bằng cột lọc ly tâm Vivaspin® (Sartorius, Đức) với màng polyethersulfone có ngưỡng cắt 300 kDa ($4.000 \times g$, 20 phút, 4°C) đến thể tích

200–500 μL . Mẫu tiếp tục được xử lý qua cột lọc 100 kDa trong cùng điều kiện nhằm tăng độ tinh sạch và làm giàu EVs kích thước nhỏ.

Sau hai bước lọc, dịch cô đặc chứa EVs được thu nhận (thể tích giảm từ khoảng 8–10 mL xuống 200–500 μL), chia aliquot và bảo quản ở -80°C . Mẫu chỉ được rã đông một lần trước khi sử dụng nhằm đảm bảo tính toàn vẹn cấu trúc và hoạt tính sinh học của EVs.

2.2.6. Định lượng kháng nguyên E2 tích lũy trong túi ngoại bào (EVs) bằng phương pháp ELISA

Sự hiện diện của kháng nguyên E2 từ Classical Swine Fever Virus trên bề mặt túi ngoại bào (EVs) được xác định bằng kỹ thuật ELISA gián tiếp. Mẫu dịch chứa EVs (thu nhận từ tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với protein tái tổ hợp E2) được pha loãng trong đệm carbonate–bicarbonate (pH 9,6), sau đó phủ lên đĩa ELISA 96 giếng và ủ qua đêm ở 4°C .

Sau khi rửa 3–5 lần bằng PBS chứa 0,05% Tween-20 (PBST), các giếng được chặn bằng dung dịch chứa 1–5% BSA hoặc sữa gầy trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, các giếng được ủ với kháng thể sơ cấp đặc hiệu kháng E2, rửa sạch và ủ với kháng thể thứ cấp cộng hợp enzyme HRP.

Sau bước rửa cuối, cơ chất tetramethylbenzidine (TMB) được bổ sung để phát triển màu; phản ứng được dừng sau 10–15 phút bằng dung dịch H_2SO_4 (1–2 M). Giá trị mật độ quang học (OD) được đo bằng máy đọc đĩa ELISA (Synergy™ HT Microplate Reader, BioTek Instruments, Hoa Kỳ) tại bước sóng thích hợp. Cường độ hấp thụ quang học thu được tỷ lệ thuận với lượng kháng nguyên E2 hiện diện trên EVs.

2.2.7. Xác định đặc điểm sinh học của các EVs

Phân tích kích thước và nồng độ EVs bằng Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Phân tích kích thước và nồng độ của các túi ngoại bào (EVs) được thực hiện bằng phương pháp phân tích quỹ đạo hạt (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA) trên hệ thống ZetaView (Particle Metrix, Đức). Sau khi phân lập, mẫu EVs được pha loãng trong dung dịch đệm phosphate chuẩn (PBS) vô trùng để đạt được dải nồng độ tối ưu theo khuyến cáo kỹ thuật của nhà sản xuất. Nguyên lý vận hành của hệ thống dựa trên việc ghi lại chuyển động Brown của các hạt dưới nguồn kích thích laser. Quỹ đạo dịch chuyển của từng hạt riêng lẻ được camera ghi nhận và xử lý thông qua phần mềm chuyên dụng; từ đó, kích thước thủy động học của hạt được tính toán dựa trên

phương trình Stokes–Einstein. Nhằm đảm bảo tính đại diện và độ lặp lại của phép đo, mỗi mẫu được quét tại 11 vị trí khác nhau trong buồng mẫu với 3 lần lặp lại độc lập. Kết quả trích xuất cuối cùng bao gồm phổ phân bố kích thước hạt (nm) và mật độ hạt (particles/mL).

Quan sát hình thái EVs bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Đặc điểm hình thái và cấu trúc bề mặt của túi ngoại bào (EVs) được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Mẫu EVs sau phân lập được cố định bằng dung dịch paraformaldehyde 2–4% trong PBS ở nhiệt độ phòng, sau đó nhỏ lên bề mặt giá đỡ mẫu (stub).

Mẫu được khử nước qua dãy ethanol tăng dần (50–100%) và làm khô (làm khô tới điểm tới hạn hoặc làm khô tự nhiên) nhằm loại bỏ hoàn toàn nước. Trước khi quan sát, mẫu được phủ một lớp kim loại dẫn điện mỏng (vàng hoặc vàng–palladium) bằng thiết bị sputter coater.

Các ảnh SEM thu được ở các độ phóng đại khác nhau được sử dụng để đánh giá hình dạng, kích thước bề mặt và tính đồng nhất của quần thể EVs.

Định lượng CD63 của túi ngoại bào (EVs) bằng phương pháp ELISA

Sự hiện diện của túi ngoại bào (EVs) trong các mẫu sau tách chiết được xác nhận thông qua định lượng protein CD63 bằng kỹ thuật ELISA sandwich. Đĩa 96 giếng được phủ sẵn kháng thể bắt giữ đặc hiệu CD63. Mẫu dịch chứa EVs và các dung dịch chuẩn được chuẩn bị theo hướng dẫn của bộ kit, sau đó 50 μ L mẫu hoặc dung dịch chuẩn được thêm vào mỗi giếng và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian quy định.

Sau khi ủ, các giếng được rửa bằng dung dịch rửa để loại bỏ các thành phần không gắn đặc hiệu. Kháng thể phát hiện liên hợp biotin đặc hiệu CD63 được bổ sung, tiếp theo là streptavidin liên hợp enzyme horseradish peroxidase (HRP) nhằm hình thành phức hợp miễn dịch có gắn enzyme.

Sau các bước rửa, cơ chất TMB được thêm vào và ủ trong tối để phát triển màu; phản ứng được dừng bằng dung dịch acid, tạo màu vàng. Mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA. Nồng độ CD63 trong các mẫu được xác định dựa trên đường chuẩn từ các dung dịch chuẩn có nồng độ biết trước.

Giá trị CD63 thu được được sử dụng để xác nhận sự hiện diện của EVs trong mẫu. Các mẫu được phân tích lặp lại tối thiểu hai lần kỹ thuật nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả.

2.2.8. Phân lập và nuôi cấy tế bào lympho T từ máu ngoại vi lợn

Tế bào lympho T được phân lập từ máu ngoại vi lợn khỏe mạnh bằng phương pháp ly tâm phân lớp mật độ kết hợp tách chọn lọc từ tính. Máu toàn phần được thu vào ống chứa chất chống đông (EDTA hoặc heparin), pha loãng với PBS (1:2), sau đó phủ lên Ficoll và ly tâm để thu lớp tế bào đơn nhân ngoại vi (PBMC). PBMC được rửa bằng PBS và huyền phù trong đệm tách (PBS bổ sung 0,5% BSA và 2 mM EDTA) với mật độ khoảng 10^7 tế bào/100 μ L.

Quần thể tế bào T được làm giàu bằng cách ủ PBMC với vi cầu từ tính gắn kháng thể đặc hiệu CD4 và CD8 trong 15 phút ở 4°C, sau đó tách qua cột từ để thu tế bào gắn vi cầu. Tế bào sau phân lập được đếm và đánh giá độ sống bằng Trypan Blue.

Tế bào được nuôi cấy trong môi trường TexMACS bổ sung 10% FBS, kháng sinh penicillin/streptomycin và Interleukin-2 (300 IU/mL), đồng thời bổ sung tác nhân hoạt hóa T cell TransAct để kích thích tăng sinh. Tế bào được duy trì ở 37°C, 5% CO₂ với mật độ khoảng 1×10^6 tế bào/mL bằng cách bổ sung môi trường mới chứa IL-2 và thay môi trường định kỳ 2–3 ngày/lần.

2.2.9. Túi ngoại bào nguồn gốc từ tế bào trình diện kháng nguyên mang CSFV điều hòa đáp ứng miễn dịch tế bào T

Chuẩn bị túi ngoại bào (EVs)

Túi ngoại bào (extracellular vesicles, EVs) được thu nhận từ môi trường nuôi cấy tế bào 3D4/2. Tế bào được nuôi trong điều kiện tiêu chuẩn và chia thành hai nhóm: (i) đối chứng (không xử lý) và (ii) xử lý với kháng nguyên CSFV trong 24 giờ và 48 giờ.

Sau xử lý, môi trường nuôi cấy được thu thập và loại bỏ tế bào, mảnh vụn bằng ly tâm tuần tự. EVs được làm giàu bằng lọc ly tâm qua cột có ngưỡng cắt 100 kDa nhằm loại bỏ protein hòa tan và phân tử nhỏ. Mẫu EVs được bảo quản ở -80°C và chuẩn hóa theo tổng protein hoặc thể tích trước khi sử dụng.

Tương tác giữa tế bào T và EVs

Tế bào lympho T được nuôi cấy và gieo vào đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^4 – 2×10^4 tế bào/giếng, sau đó ủ 24 giờ ở 37°C, 5% CO₂ để ổn định.

Sau đó, tế bào được chia thành các nhóm xử lý:

- Nhóm EVs đối chứng: xử lý với EVs từ tế bào không tiếp xúc kháng nguyên.

- Nhóm EVs xử lý kháng nguyên CSFV: xử lý với EVs thu nhận tại 24 giờ và 48 giờ, tương ứng với các mức nồng độ khác nhau.
- Nhóm kích thích biệt hóa: xử lý với GM-CSF và IL-4.
- Nhóm đối chứng âm: không xử lý.

Sau khi xử lý, tế bào được ủ tiếp 24 giờ trong điều kiện tiêu chuẩn. Kết thúc thí nghiệm, tế bào được đánh giá khả năng sống bằng MTS assay và dịch nuôi cấy được thu thập cho các phân tích tiếp theo.

Đánh giá khả năng sống tế bào bằng MTS assay

Khả năng sống của tế bào được xác định bằng phép thử MTS. Sau thời gian xử lý, thuốc thử MTS được bổ sung trực tiếp vào mỗi giếng nuôi cấy theo tỷ lệ 1:5 (so với thể tích môi trường) và ủ trong 2–4 giờ ở 37°C, 5% CO₂.

Sản phẩm formazan hòa tan được hình thành tỷ lệ thuận với hoạt động chuyển hóa của tế bào sống. Mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 490 nm bằng máy đọc đĩa. Giá trị OD thu được phản ánh số lượng tế bào sống và được chuẩn hóa so với nhóm đối chứng âm.

2.2.10. Đánh giá nồng độ cytokine IL-10 trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2.

Khả năng điều hòa miễn dịch của túi ngoại bào (EVs) có nguồn gốc từ tế bào 3D4/2 được đánh giá thông qua định lượng cytokine Interleukin-10 (IL-10) trong dịch nuôi cấy tế bào T bằng kỹ thuật ELISA sandwich.

Thí nghiệm được thiết kế nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ EVs và thời gian xử lý, bao gồm các nhóm: đối chứng dương (tế bào T xử lý với GM-CSF và IL-4 trong 24 giờ), các nhóm xử lý EVs ở hai mức nồng độ khác nhau, và các thời điểm đánh giá tương ứng là 24 giờ và 48 giờ. Sau thời gian ủ, dịch nuôi cấy được thu nhận, ly tâm (1.500 rpm, 10 phút, 4°C) để loại bỏ tế bào và cặn, sau đó thu phần dịch nổi, chia aliquot và bảo quản ở –80°C cho đến khi phân tích.

Việc định lượng IL-10 được thực hiện bằng bộ kit ELISA đặc hiệu cho lợn theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 100 µL mẫu hoặc dung dịch chuẩn được thêm vào các giếng đã phủ kháng thể bắt giữ IL-10 và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau các bước rửa, kháng thể phát hiện liên hợp biotin và streptavidin-HRP được bổ sung để hình thành phức hợp miễn dịch. Tiếp theo, cơ chất TMB được thêm vào để phát triển màu và phản ứng được dừng bằng dung dịch H₂SO₄.

Mật độ quang học (OD) được đo tại bước sóng 450 nm bằng máy đọc đĩa ELISA; nồng độ IL-10 được xác định dựa trên đường chuẩn. Dữ liệu được xử lý bằng

phần mềm GraphPad Prism, với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Các mẫu dưới ngưỡng phát hiện (ND) tại thời điểm 24 giờ được ghi nhận để so sánh với xu hướng biến đổi tại thời điểm 48 giờ.

2.2.11. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần và xử lý thống kê bằng phần mềm Excel. Từ đó, xác định giá trị trung bình, độ lệch chuẩn và biểu diễn kết quả bằng đồ thị trên phần mềm này.

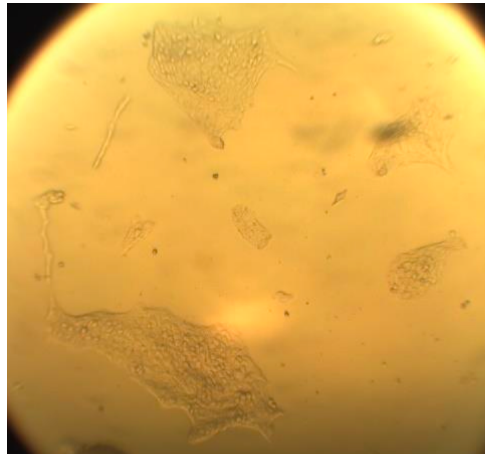
Chương 3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Nuôi cấy và biệt hoá tế bào đại thực bào trong điều kiện *in vitro*

3.1.1. Nuôi cấy tế bào 3D4/2 trong điều kiện tiêu chuẩn và khảo sát sự biệt hoá của tế bào 3D4/2 thành tế bào tua

Việc lựa chọn GM-CSF (100 ng/mL) kết hợp với IL-4 ở hai nồng độ 20 ng/mL và 50 ng/mL trong nghiên cứu này dựa trên các báo cáo trước đây về khả năng cảm ứng biệt hoá tế bào miễn dịch *in vitro*. Cụ thể, GM-CSF (100 ng/mL) phối hợp với IL-4 (20 ng/mL) đã được sử dụng để duy trì và biệt hoá tế bào tua, trong khi IL-4 ở nồng độ 50 ng/mL cũng cho thấy hiệu quả biệt hoá rõ rệt khi kết hợp với GM-CSF ở cùng nồng độ. Do đó, hai mức nồng độ IL-4 này được lựa chọn nhằm đánh giá ảnh hưởng của sự thay đổi nồng độ cytokine đến đặc điểm tế bào trong điều kiện thí nghiệm [52, 53].

Sự thay đổi hình thái của dòng tế bào 3D4/2 dưới tác động của các nồng độ cytokine khác nhau được theo dõi và ghi nhận dưới kính hiển vi đảo ngược tại các mốc thời gian ngày 3 và ngày 5 nuôi cấy.



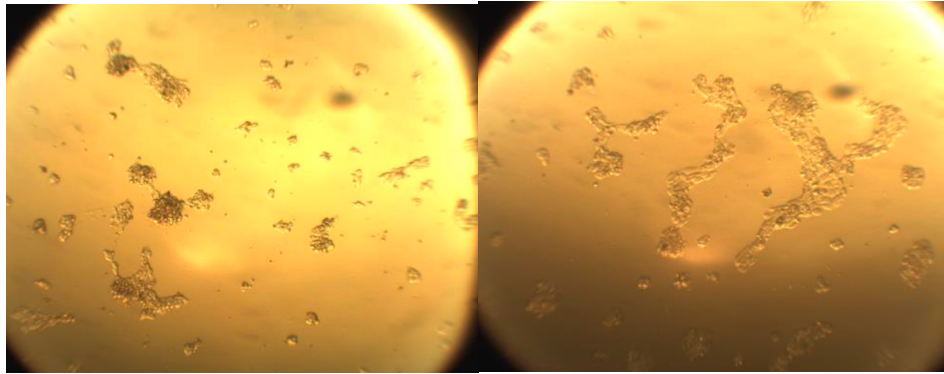
Hình 3.1. Tế bào 3D4/2 nuôi cấy trong môi trường RPMI

Hình 3.1 cho thấy tế bào 3D4/2 bám dính tốt trên bề mặt đĩa nuôi cấy và duy trì hình thái đặc trưng của đại thực bào. Các tế bào có kích thước lớn, dẹt, trải rộng với hình đa giác hoặc không đều, rìa tế bào tương đối nhẵn và chưa quan sát thấy sự hình thành các tua màng (dendrites), cho thấy tế bào vẫn ở trạng thái nghỉ hoặc chưa được hoạt hóa rõ rệt.

Đặc điểm hình thái này phản ánh trạng thái sinh lý ổn định của tế bào trong điều kiện nuôi cấy cơ bản, khi chưa có sự kích thích bởi các yếu tố ngoại sinh như cytokine hay kháng nguyên.

Kết quả cho thấy các tế bào không xuất hiện tua màng và cấu trúc phân nhánh;

hình thái tế bào tương đối đồng nhất.



Ngày 3

Ngày 5

Hình 3.2. Tế bào được biệt hóa tại nồng độ 1

Nhóm nồng độ 1 (100 ng/mL GM-CSF + 50 ng/mL IL-4) có sự thay đổi hình thái diễn ra rõ rệt và có tiến triển theo thời gian.

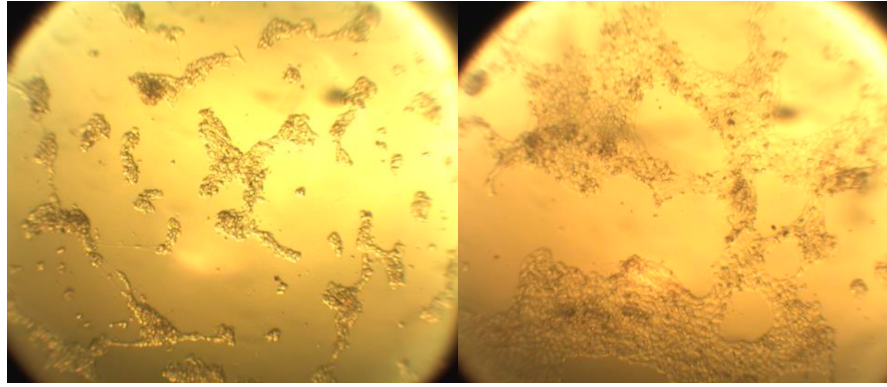
Tại ngày 3: Tế bào mất đi hình dáng dẹt trải rộng ban đầu, có xu hướng co tròn lại, giảm diện tích bám dính và bắt đầu tập hợp thành các cụm nhỏ rải rác trên vi trường.

Tại ngày 5: Các cụm tế bào tiếp tục phát triển, kéo dài ra và hình thành các dải tế bào liên kết với nhau. Mặc dù đã tạo thành các cấu trúc dạng chuỗi, nhưng các dải tế bào này vẫn tương đối phân tán.

Sự thay đổi hình thái này cho thấy tác động rõ rệt của GM-CSF và IL-4 lên quá trình biệt hóa và tái tổ chức bộ khung tế bào của dòng 3D4/2. Đã gây ra những thay đổi hình thái rõ rệt ở tế bào 3D4/2, bao gồm giảm diện tích bám dính, xu hướng co tròn ở giai đoạn đầu, đồng thời xuất hiện hiện tượng hình thành các cụm tế bào và các dải liên kết giữa các tế bào. Các cấu trúc này tuy đã hình thành nhưng vẫn còn phân tán, chưa tạo thành mạng lưới tế bào hoàn chỉnh. Tuy nhiên, việc các cấu trúc này vẫn còn phân tán cho thấy mức độ biệt hóa chưa đạt đến trạng thái tối ưu hoặc chưa hình thành mạng lưới tế bào hoàn chỉnh.

Ngoài ra, nồng độ IL-4 tương đối cao (50 ng/mL) có thể ảnh hưởng đến sự cân bằng tín hiệu trong quá trình biệt hóa. Trong một số trường hợp, IL-4 ở nồng độ cao có thể gây ra cơ chế điều hòa ngược, làm giảm khả năng kết dính và tổ chức cấu trúc của tế bào, từ đó dẫn đến hiện tượng các cụm tế bào phát triển nhưng không liên kết chặt chẽ với nhau.

Có thể thấy nồng độ 1 có khả năng cảm ứng sự thay đổi hình thái rõ rệt, tuy nhiên mức độ tổ chức và liên kết tế bào chưa cao.



Ngày 3

Ngày 5

Hình 3.3. Tế bào được biệt hóa tại nồng độ 2

Nhóm nồng độ 2 (100 ng/mL GM-CSF + 20 ng/mL IL-4) có sự chuyển đổi hình thái cực kỳ mạnh mẽ, thậm chí vượt trội hơn về mức độ kết mạng so với nồng độ 1.

Tại ngày 3: Tế bào đã nhanh chóng tập hợp và vươn dài, tạo thành một mạng lưới liên kết đan xen rõ rệt và trải rộng hơn hẳn so với sự co cụm đơn giản ở nồng độ 1 cùng thời điểm.

Tại ngày 5: Mạng lưới tế bào trở nên vô cùng dày đặc và phức tạp. Các cụm tế bào liên kết thành những mảng lớn, phân nhánh sâu rộng và bám chặt vào nhau, cho thấy mức độ tái cấu trúc bộ khung tế bào diễn ra cực kỳ mạnh.

Kết quả trên cho thấy dòng tế bào 3D4/2 trước khi hoạt hóa thể hiện hình thái bám dính, dẹt và phân tán. Khi bổ sung tổ hợp GM-CSF và IL-4, tế bào đã đáp ứng mạnh mẽ bằng cách co lại, giảm bám dính bề mặt và bắt đầu kết cụm, vươn tua màng tạo mạng lưới.

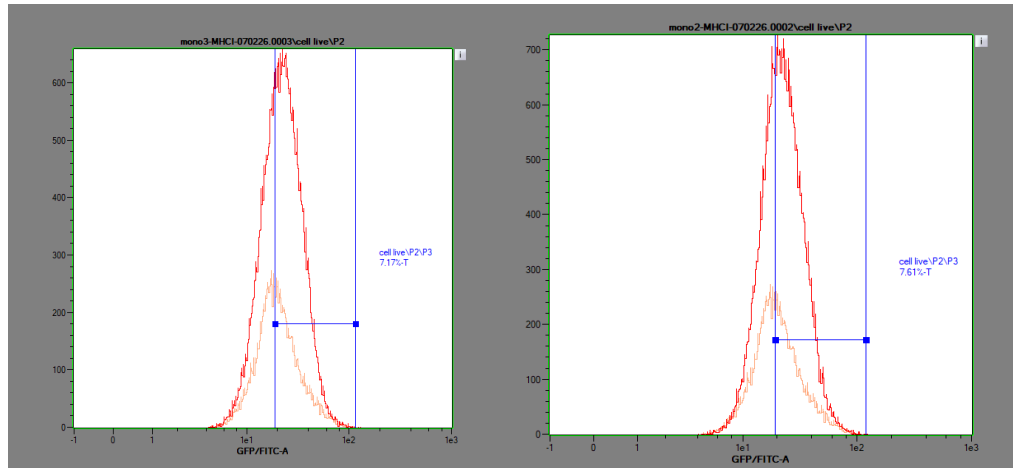
Kết quả cho thấy GM-CSF và IL-4 đã cảm ứng rõ rệt quá trình biệt hóa của tế bào 3D4/2, với sự xuất hiện của các đặc điểm hình thái phù hợp với tế bào trình diện kháng nguyên (APC), bao gồm hình thành mạng lưới tế bào dày đặc, liên kết chặt chẽ giữa các tế bào, đồng thời xuất hiện các tua màng và cấu trúc phân nhánh. Điều này phù hợp với các cơ chế đã được ghi nhận về vai trò của GM-CSF trong duy trì sự sống và tăng sinh tế bào, cũng như IL-4 trong định hướng biệt hóa và phát triển đặc điểm của tế bào APC [49, 50]

Ở điều kiện 20 ng/mL IL-4 kết hợp với 100 ng/mL GM-CSF (nồng độ 2), tế bào ghi nhận sự biến đổi hình thái rõ rệt hơn so với các điều kiện khác, bao gồm tăng mức độ co cụm, hình thành mạng lưới liên kết và xuất hiện rõ các cấu trúc tua màng. Đồng thời, sự thay đổi hình thái được quan sát sớm từ ngày thứ 3, cho thấy tế bào đáp ứng nhanh với điều kiện kích thích này.

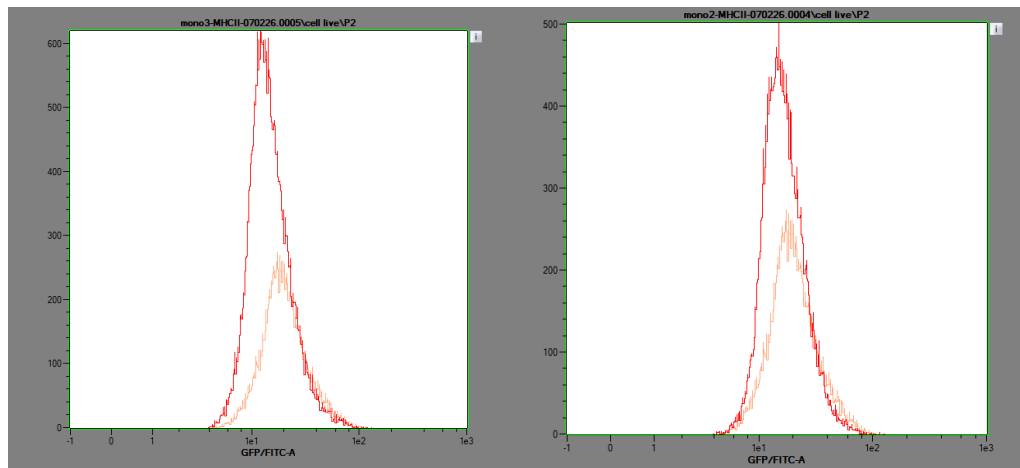
So với đó, điều kiện sử dụng IL-4 ở nồng độ 50 ng/mL không làm gia tăng mức độ co cụm tế bào tương ứng.

Từ các kết quả thu được, nồng độ 20 ng/mL IL-4 kết hợp với 100 ng/mL GM-CSF được xác định là điều kiện phù hợp và được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo, bao gồm phân tích bằng Flow cytometry.

3.1.2. Biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II trên tế bào 3D4/2 sau 5 ngày biệt hoá



(A) Biểu hiện SLA I



(B) Biểu hiện SLA II

Hình 3.4. Biểu đồ Flow Cytometry đánh giá sự thay đổi kháng nguyên bề mặt của tế bào 3D4/2 sau xử lý: (A) Biểu hiện SLA I; (B) Biểu hiện SLA II.

Biểu đồ thể hiện kết quả phân tích Flow Cytometry nhằm đánh giá sự biểu hiện của các kháng nguyên bề mặt SLA I và SLA II trên dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn 3D4/2 sau khi được xử lý kích thích bằng GM-CSF và IL-4 ở các nồng độ

tương ứng. Trong biểu đồ overlay, tín hiệu của mẫu thử được biểu diễn bằng màu đỏ, trong khi tín hiệu tự phát huỳnh quang của mẫu đối chứng (Blank) được thể hiện bằng màu hồng. Do hạn chế về mặt kỹ thuật, nghiên cứu chưa sử dụng Isotype control mà tiến hành so sánh trực tiếp với quần thể tế bào Blank.

Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào biểu hiện tín hiệu dương tính với SLA II ở mức rất thấp, với quần thể tế bào gần như không có sự dịch chuyển so với mẫu Blank. Đồng thời, marker SLA lớp I cũng ghi nhận mức biểu hiện thấp trên quần thể tế bào khảo sát, với tín hiệu thu nhận được không có sự khác biệt rõ rệt so với mẫu nền. Tổng thể, phân tích Flow cytometry cho thấy cả hai marker SLA lớp I và SLA lớp II đều có cường độ tín hiệu thấp, phản ánh mức biểu hiện hạn chế của các phân tử này trong điều kiện thí nghiệm.

Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây, trong đó ghi nhận rằng mức biểu hiện của các phân tử SLA trên đại thực bào có thể ở mức thấp trong những điều kiện nhất định [53,54]. Bên cạnh đó, các dòng tế bào bất tử hóa như 3D4/2 có thể có sự khác biệt về mức độ biểu hiện các phân tử trình diện kháng nguyên so với đại thực bào nguyên phát, bao gồm sự suy giảm biểu hiện các marker miễn dịch [54,55]. Sự khác biệt này cũng đã được ghi nhận đối với các marker như MHC II, CD86 hoặc CD206 trong các mô hình in vitro [56,57].

Trong điều kiện xử lý với GM-CSF và IL-4, mức biểu hiện của các phân tử MHC trên tế bào khảo sát tiếp tục duy trì ở mức thấp, cho thấy các tế bào đang tồn tại ở dạng tiền tế bào tua. Giai đoạn này, các tế bào thay đổi về hình dạng, đặc điểm nuôi cấy nhưng không thay đổi hệ SLA nhiều, chứng tỏ đây là giai đoạn tế bào có khả năng nuốt và chế biến kháng nguyên tốt nhất.

3.2. Đánh giá quá trình xử lý kháng nguyên và tạo các túi ngoại bào (EVs) mang kháng nguyên E2 của CSFV

3.2.1. Biểu hiện SLA lớp I và SLA lớp II trên tế bào 3D4/2 sau khi tiếp xúc kháng nguyên

Bảng 3.1: Tỷ lệ phần trăm tế bào 3D4/2 dương tính với các marker bề mặt

Marker	Nhóm đối chứng (%)	Nhóm xử lý với GM-CSF/IL-4 (%)	Mức tăng (%)	p-value
SLA I	75.3 ± 1,5	78.6 ± 3,1	+ 3.4%	0,199

SLA II	17.6 ± 3,7	65.8 ± 5,9	+ 58.2%	<0.001
--------	------------	------------	---------	--------

Kết quả phân tích Flow Cytometry nhằm đánh giá sự thay đổi kiểu hình của dòng tế bào đại thực bào phế nang lợn 3D4/2 sau khi xử lý với tổ hợp cytokine GM-CSF và IL-4 kết hợp tiếp xúc với kháng nguyên E2 của CSFV được thể hiện tại Bảng 3.1. Trong phân tích này, tín hiệu huỳnh quang của mẫu thử được so sánh trực tiếp với quần thể tế bào đối chứng (Blank) nhằm xác định tỷ lệ tế bào dương tính với các marker trình diện kháng nguyên SLA I và SLA II. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD), đồng thời sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phép kiểm định thống kê với ngưỡng ý nghĩa $p < 0,05$.

Kết quả cho thấy một sự chuyển dịch rõ rệt về kiểu hình của tế bào sau khi kích thích. Đối với marker SLA II, tỷ lệ tế bào dương tính ở nhóm đối chứng chỉ đạt $17,6 \pm 3,7\%$, phản ánh trạng thái cơ bản của dòng tế bào 3D4/2. Sau khi xử lý với GM-CSF, IL-4 và protein E2 ở nồng độ $80 \mu\text{g/mL}$, tỷ lệ tế bào biểu hiện SLA II tăng mạnh lên $65,8 \pm 5,9\%$, tương ứng mức tăng $58,2\%$ so với đối chứng. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê rất cao ($p < 0,001$), cho thấy tác động rõ rệt của quá trình kích thích lên khả năng trình diện kháng nguyên của tế bào. Kết quả chứng minh rằng tổ hợp cytokine GM-CSF và IL-4 kết hợp với kháng nguyên E2 đã kích hoạt thành công dòng tế bào 3D4/2, thúc đẩy sự chuyển đổi từ trạng thái đại thực bào sang kiểu hình có đặc tính tương đồng với tế bào trình diện kháng nguyên chuyên nghiệp (APC). Đồng thời, sự gia tăng mạnh của SLA II cũng phản ánh khả năng nâng cao hiệu quả trình diện kháng nguyên ngoại sinh cho tế bào T, một đặc điểm quan trọng trong việc khởi phát đáp ứng miễn dịch đặc hiệu.

Đối với marker SLA I, xu hướng biểu hiện có sự khác biệt đáng kể so với SLA II. Ở nhóm đối chứng, tỷ lệ tế bào biểu hiện SLA I đã ở mức cao, đạt $75,3 \pm 1,5\%$, cho thấy phần lớn tế bào 3D4/2 vốn đã mang đặc tính trình diện kháng nguyên nội sinh thông qua con đường MHC lớp I. Sau khi xử lý với GM-CSF, IL-4 và protein E2, tỷ lệ này tăng nhẹ lên $78,6 \pm 3,1\%$, tương ứng mức tăng $3,4\%$ so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,199$; $p > 0,05$). Kết quả cho thấy quá trình kích thích không làm thay đổi đáng kể tỷ lệ tế bào biểu hiện SLA I, có thể do marker này đã được biểu hiện ở mức nền rất cao và gần đạt ngưỡng bão hòa trước khi xử lý. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho rằng các tế bào thuộc dòng đơn nhân – đại thực bào thường duy trì biểu hiện MHC lớp I ở mức cao nhằm phục vụ chức năng trình diện kháng nguyên nội bào và giám sát miễn dịch thường trực [56, 57].

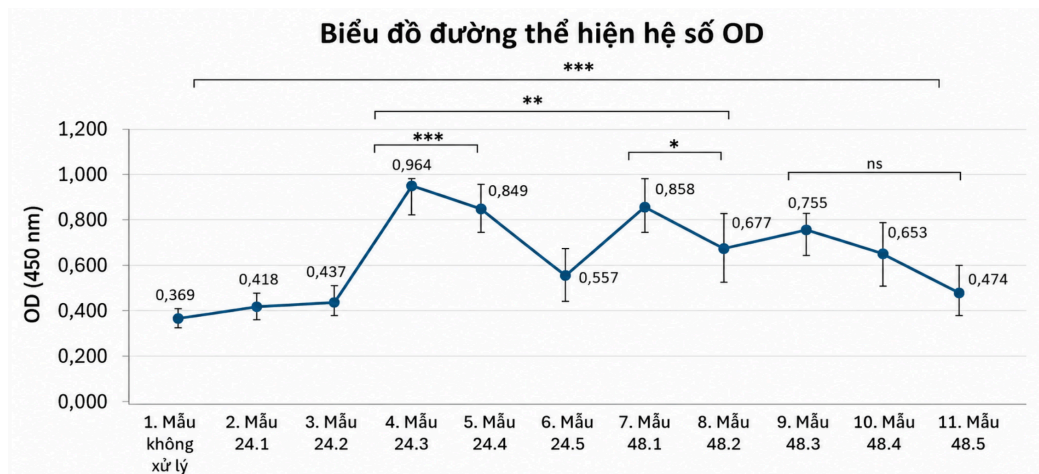
Sự gia tăng đáng kể biểu hiện SLA II đồng thời với việc duy trì mức biểu hiện cao của SLA I cho thấy tế bào 3D4/2 sau kích thích đã đạt trạng thái hoạt hóa tối ưu cho quá trình trình diện kháng nguyên ngoại sinh. Kết quả này khẳng định dòng tế bào 3D4/2 sau kích thích là nguồn nguyên liệu để sản xuất các túi ngoại bào (EVs) mang hàm lượng cao các phân tử trình diện kháng nguyên, tạo tiền đề vững chắc cho các nghiên cứu về vaccine thể hệ mới dựa trên nền tảng EVs.

Nuôi cấy, biệt hóa tế bào 3D4/2 và thu nhận túi ngoại bào (EVs) mang kháng nguyên E2 của CSFV

Sau khi thiết lập thành công mô hình biệt hóa dòng tế bào 3D4/2 trong môi trường RPMI-1640 (bổ sung 10% FBS và 1% PS) bằng tổ hợp cytokine porcine GM-CSF (100 ng/ml) và IL-4 (20 ng/ml), nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của quần thể tế bào này thông qua việc xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp E2 của virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV). Các tế bào sau biệt hóa được tiếp xúc với kháng nguyên E2 ở các dải nồng độ biến thiên từ 10 $\mu\text{g/ml}$ đến 80 $\mu\text{g/ml}$ nhằm xác định liều lượng tối ưu cho sự kích thích. Sau đó EVs được thu nhận để tiến hành đánh giá bằng phương pháp ELISA.

3.2.2. Đánh giá khả năng mang kháng nguyên của EVs

Xác định khả năng mang kháng nguyên của CSFV của EVs bằng phương pháp ELISA



Hình 3.5. Khả năng mang kháng nguyên virus CSFV của các mẫu EVs được xác định bằng phương pháp ELISA (giá trị OD)

Sau khi thu nhận thành công các túi ngoại bào (EVs) từ dòng đại thực bào 3D4/2, mục tiêu tiếp theo là xác định liệu các EVs này có mang kháng nguyên của virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV) sau quá trình xử lý hay không. Để thực hiện điều này, các mẫu EVs thu nhận từ đại thực bào được xử lý với kháng nguyên CSFV ở các

nồng độ và khoảng thời gian khác nhau, sau đó được kiểm tra bằng phương pháp ELISA nhằm đánh giá khả năng trình diện kháng nguyên thông qua chỉ số hấp thụ quang học (OD).

Tín hiệu OD tăng theo các điều kiện xử lý khác nhau, phản ánh sự hiện diện của kháng nguyên trong các mẫu EVs thu được. Tất cả các nhóm thực nghiệm đều có giá trị OD cao hơn nhóm đối chứng (EVs từ tế bào không xử lý kháng nguyên). Điều này chứng minh rằng sau khi được xử lý với kháng nguyên của CSFV, các EVs thu nhận được đều có khả năng mang kháng nguyên của CSFV, cho phép kháng thể đặc hiệu phát hiện qua phương pháp ELISA. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó EVs được ghi nhận có thể chứa protein và kháng nguyên nguồn gốc tế bào và tồn tại ổn định trong môi trường ngoại bào [4, 13, 57].

Tại thời điểm thu nhận 24 giờ, tín hiệu OD tăng từ $0,418 \pm 0,02$ ($10 \mu\text{g/mL}$) và $0,437 \pm 0,10$ ($20 \mu\text{g/mL}$) lên mức cao nhất $0,964 \pm 0,07$ ở nồng độ $40 \mu\text{g/mL}$, sau đó giảm xuống $0,849 \pm 0,08$ ($60 \mu\text{g/mL}$) và $0,557 \pm 0,01$ ($80 \mu\text{g/mL}$). Sự khác biệt giữa nhóm $40 \mu\text{g/mL}$ và $60 \mu\text{g/mL}$ có ý nghĩa thống kê rất cao ($***p < 0,001$), cho thấy đây là điều kiện tối ưu cho quá trình đóng gói kháng nguyên E2 vào EVs.

Tại thời điểm 48 giờ, giá trị OD cao nhất được ghi nhận ở nhóm $10 \mu\text{g/mL}$ ($0,858 \pm 0,13$), tiếp theo là nhóm $40 \mu\text{g/mL}$ ($0,755 \pm 0,20$), trong khi các nhóm $20 \mu\text{g/mL}$, $60 \mu\text{g/mL}$ và $80 \mu\text{g/mL}$ lần lượt đạt $0,677 \pm 0,09$; $0,653 \pm 0,12$ và $0,474 \pm 0,12$. Sự khác biệt giữa nhóm $10 \mu\text{g/mL}$ và $20 \mu\text{g/mL}$ có ý nghĩa thống kê ($*p < 0,05$), trong khi nhóm $40 \mu\text{g/mL}$ và $80 \mu\text{g/mL}$ không khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$). Nhìn chung, khả năng mang kháng nguyên của EVs phụ thuộc vào cả nồng độ kháng nguyên và thời gian xử lý, trong đó điều kiện 24 giờ với $40 \mu\text{g/mL}$ cho hiệu quả cao nhất.

Kết quả cũng cho thấy khi nồng độ kháng nguyên xử lý tăng lên mức cao nhất ($80 \mu\text{g/mL}$), tín hiệu OD không tiếp tục tăng mà ngược lại có xu hướng giảm đáng kể ở cả hai thời điểm khảo sát. Cụ thể, tại 24 giờ giá trị OD giảm từ $0,964 \pm 0,07$ ở nồng độ $40 \mu\text{g/mL}$ xuống $0,557 \pm 0,01$ ở nồng độ $80 \mu\text{g/mL}$; tại 48 giờ giảm từ $0,858 \pm 0,13$ xuống $0,474 \pm 0,12$. Hiện tượng này cho thấy việc tăng nồng độ kháng nguyên vượt quá ngưỡng tối ưu không đồng nghĩa với tăng hiệu quả đóng gói kháng nguyên vào EVs. Ngược lại, nồng độ kháng nguyên cao có thể gây stress tế bào hoặc ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của màng tế bào, từ đó làm thay đổi quá trình sinh tổng hợp EVs cũng như thành phần cargo bên trong. Một số nghiên cứu trước đây cũng ghi nhận rằng các điều kiện stress tế bào có thể ảnh hưởng trực tiếp đến số lượng, kích thước và chức năng sinh học của EVs [58, 2]

Sự khác biệt về giá trị đỉnh giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ phản ánh sự thay đổi theo thời gian trong khả năng mang kháng nguyên của EVs. Tại thời điểm 24 giờ, tín hiệu cao nhất được ghi nhận ở nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($0,964 \pm 0,07$), trong khi tại thời điểm 48 giờ giá trị OD cao nhất lại xuất hiện ở nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($0,858 \pm 0,13$). Quan sát này phản ánh đặc điểm phụ thuộc vào thời gian và điều kiện kích thích của quá trình hình thành và giải phóng EVs từ tế bào. Một số nghiên cứu cho thấy quá trình sinh EVs và đóng gói các phân tử nguồn gốc tế bào có thể thay đổi theo trạng thái hoạt hóa và thời gian xử lý kích thích của tế bào [4, 58]. Điều này góp phần giải thích sự khác biệt về mức tín hiệu giữa các thời điểm thu mẫu trong nghiên cứu.

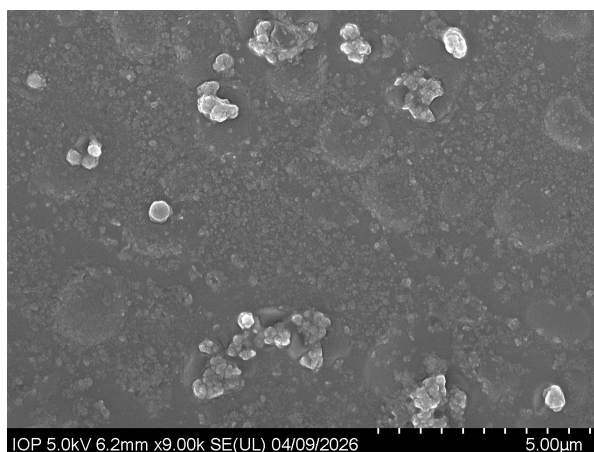
Kết quả nghiên cứu cho thấy các túi ngoại bào (EVs) thu nhận từ đại thực bào 3D4/2 sau khi xử lý với kháng nguyên CSFV đều có khả năng mang kháng nguyên, thể hiện qua giá trị OD cao hơn so với nhóm đối chứng. Tại các mốc thời gian 24 giờ và 48 giờ, sự khác biệt về giá trị OD giữa các nồng độ cho thấy tồn tại khoảng nồng độ tối ưu cho khả năng mang kháng nguyên của EVs. Cụ thể, tại 24 giờ, các mẫu xử lý ở nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho tín hiệu cao và ổn định, trong khi tại 48 giờ, nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cũng duy trì mức tín hiệu tương đương và cao hơn so với các điều kiện khác.

Trên cơ sở đó, các điều kiện gồm 24 giờ (nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và 48 giờ (nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đảm bảo hiệu quả mang kháng nguyên của EVs và tính ổn định của hệ thống thí nghiệm.

3.2.3. Xác định đặc điểm sinh học của túi ngoại bào (EVs) thu nhận từ tế bào 3D4/2 sau khi đã xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp của CSFV

Từ kết quả thí nghiệm ELISA, hai điều kiện 24 giờ (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và 48 giờ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Trong các phân tích đặc trưng hình thái và kích thước của túi ngoại bào bằng SEM và NTA, chỉ mẫu thu nhận tại thời điểm 24 giờ với nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ được sử dụng. Việc lựa chọn này nhằm đại diện cho điều kiện có đáp ứng tối ưu, đồng thời giúp đảm bảo tính đồng nhất của mẫu và hạn chế sai số kỹ thuật trong quá trình phân tích hình thái và phân bố kích thước.

3.2.3.1. Hình thái của EVs quan sát bằng SEM



Hình 3.6. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) của các túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) được phân lập từ dịch nuôi cấy tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp virus Dịch tả lợn cổ điển (CSFV). Các cấu trúc dạng cầu với kích thước đa dạng được quan sát rõ ràng.

Kết quả quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy sự hiện diện của các cấu trúc dạng túi ngoại bào trong mẫu thu nhận. Các hạt quan sát được chủ yếu có hình dạng cầu điển hình, phù hợp với đặc trưng hình thái của extracellular vesicles. Bề mặt các túi tương đối đồng nhất, tuy nhiên một số cấu trúc biểu hiện hiện tượng xẹp hoặc biến dạng nhẹ (dạng hình đĩa), có thể là hệ quả của quá trình khử nước và xử lý mẫu trong kỹ thuật SEM, trong khi màng túi vẫn được bảo toàn tương đối.

Ở độ phóng đại 9.000×, các EVs xuất hiện dưới dạng các hạt đơn lẻ xen kẽ với các cụm hạt (aggregates). Sự hình thành các cụm này có thể liên quan đến nồng độ EVs cao trong mẫu hoặc do tương tác giữa các túi trong quá trình cố định và làm khô mẫu. Mật độ các hạt quan sát được tương đối lớn, cho thấy tế bào 3D4/2 có khả năng giải phóng EVs đáng kể sau khi được xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp CSFV.

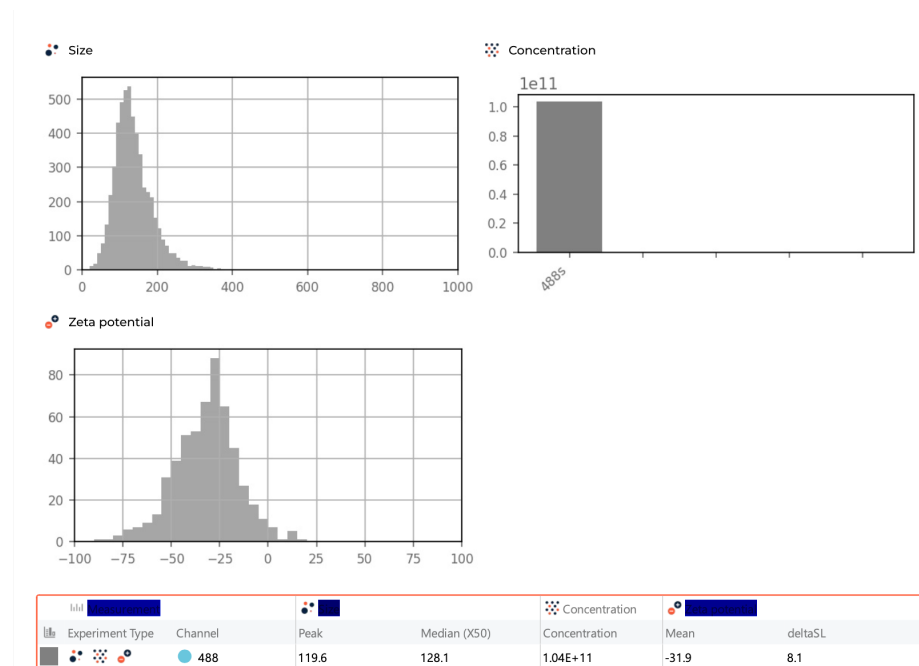
Tuy nhiên, cần lưu ý rằng ảnh SEM trong nghiên cứu này chủ yếu mang tính chất định tính nhằm xác nhận sự hiện diện và đặc điểm hình thái của EVs. Thanh tỷ lệ 5.00 μm ở độ phóng đại 9.000× chưa thực sự tối ưu để đánh giá chính xác kích thước các cấu trúc ở thang nano, do đó việc ước lượng kích thước chỉ mang tính tương đối. Dựa trên quan sát, các hạt có kích thước ước tính nằm trong khoảng từ vài chục đến vài trăm nanomet, phù hợp với dải kích thước đặc trưng của các loại túi ngoại bào như exosomes và microvesicles.

Bên cạnh đó, sự đa dạng về kích thước quan sát được cho thấy quần thể EVs thu nhận có tính không đồng nhất, phản ánh đặc điểm sinh học vốn có của EVs được

tiết ra từ tế bào. Điều này cũng gợi ý rằng mẫu có thể bao gồm nhiều phân nhóm EVs khác nhau với nguồn gốc và chức năng riêng biệt.

Kết quả SEM xác nhận sự hiện diện của các cấu trúc có hình thái phù hợp với EVs và cung cấp thông tin mô tả ban đầu về đặc điểm hình học của mẫu. Đồng thời, các kết luận về kích thước được diễn giải thận trọng và cần được đối chiếu với các phương pháp phân tích khác, góp phần củng cố độ tin cậy cho các đánh giá chức năng trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.2.3.2. Phân bố kích thước và nồng độ EVs bằng NTA



Hình 3.7. Phân bố kích thước của các túi ngoại bào (EVs) thu nhận từ tế bào 3D4/2 sau khi xử lý với kháng nguyên tái tổ hợp của CSFV được phân tích bằng hệ thống NTA (Particle Metrix). Kết quả cho thấy quần thể EVs có kích thước tập trung chủ yếu trong khoảng 80–200 nm, với đỉnh phân bố tại khoảng 119,6 nm và kích thước trung bình khoảng 136,7 nm.

Phân tích bằng phương pháp theo dõi hạt nano (NTA) cho thấy các túi ngoại bào thu nhận có phân bố kích thước đặc trưng trong khoảng nano. Kích thước trung vị (X50) đạt 128,1 nm, với kích thước đỉnh (mode) tại 119,6 nm, trong khi kích thước trung bình là 136,7 nm. Khoảng phân bố từ 81,2 nm (X10) đến 201,4 nm (X90) cho thấy quần thể EVs có sự không đồng nhất về kích thước.

Khoảng kích thước này phù hợp với đặc điểm điển hình của các túi ngoại bào, đặc biệt là exosome (30–150 nm) và một phần microvesicle có kích thước lớn hơn, cho thấy mẫu EVs thu nhận bao gồm nhiều phân nhóm khác nhau. Sự phân bố kích

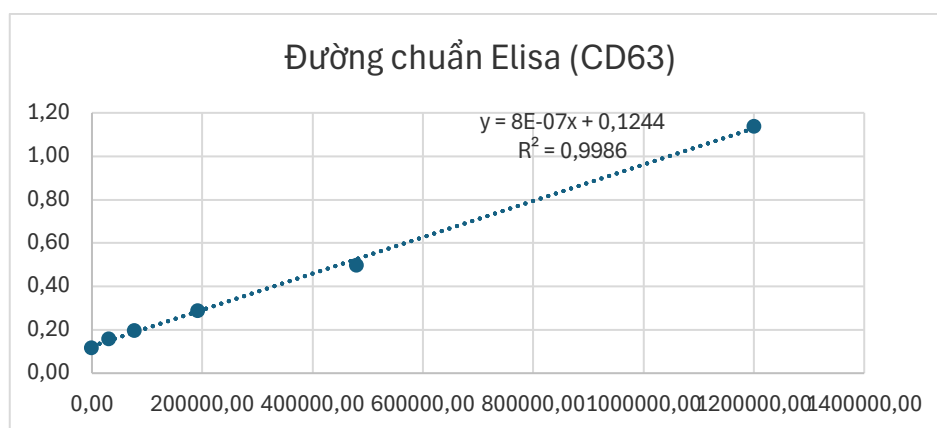
thước tương đối rộng (độ lệch chuẩn 52,6 nm) phản ánh tính không đồng nhất vốn có của EVs có nguồn gốc từ tế bào đại thực bào.

Kết quả cho thấy nồng độ hạt EVs đạt khoảng $1,04 \times 10^{11}$ particles/mL, phản ánh hiệu suất thu nhận EVs ở mức cao trong điều kiện thí nghiệm. Giá trị này nằm trong khoảng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây về EVs có nguồn gốc từ tế bào miễn dịch, trong đó nồng độ EVs có thể dao động từ khoảng 10^9 đến trên 10^{10} particles/mL tùy thuộc vào loại tế bào và điều kiện nuôi cấy [2, 59].

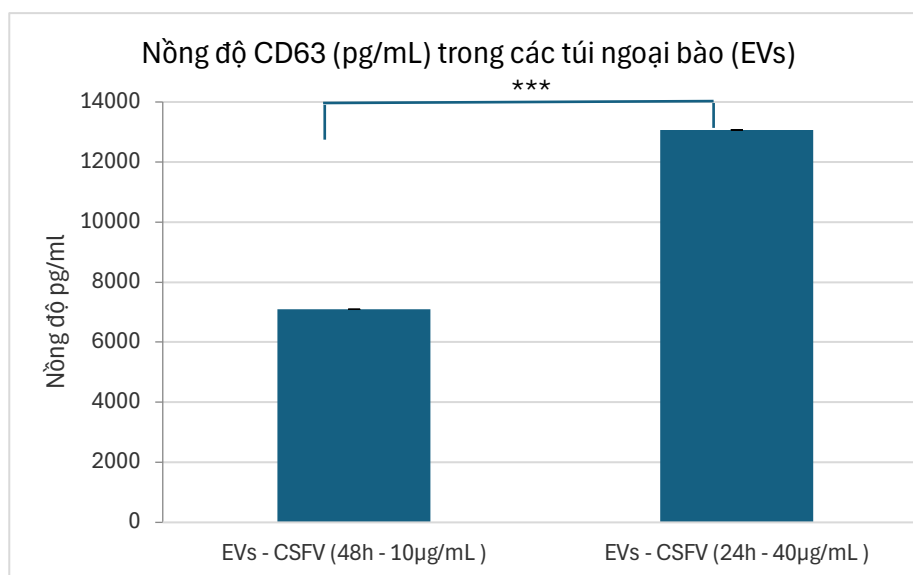
Về đặc điểm kích thước, các EVs thu nhận được thể hiện sự phân bố đa dạng nhưng vẫn tập trung trong khoảng giá trị mục tiêu. Biểu đồ phân bố kích thước cho thấy giá trị mode đạt xấp xỉ 120 nm, là nhóm kích thước chiếm tỷ trọng lớn nhất và ưu thế trong mẫu, chủ yếu nằm trong khoảng kích thước đặc trưng của exosome. Đồng thời, kết quả cũng ghi nhận sự hiện diện của các hạt có kích thước lớn hơn, lên đến khoảng 200 nm, phản ánh sự tồn tại của các phân nhóm EVs khác, tiêu biểu là microvesicles, trong mẫu phân tích.

Kết quả phân tích NTA cho thấy phân bố kích thước hạt có độ phân tán tương đối rộng trong mẫu EVs. Kích thước hạt đo bằng NTA có xu hướng lớn hơn so với kích thước quan sát bằng SEM, đồng thời vẫn ghi nhận sự tương đồng về xu hướng phân bố kích thước giữa hai phương pháp. Dữ liệu thu được từ phân tích SEM và NTA xác nhận sự hiện diện của các túi ngoại bào với đặc điểm kích thước và hình thái phù hợp, đồng thời phản ánh tính không đồng nhất của quần thể EVs trong mẫu phân tích. Các kết quả này thể hiện tính nhất quán giữa các phương pháp khảo sát và tạo cơ sở cho các định hướng ứng dụng tiếp theo.

3.2.3.3. Đặc điểm sinh học của túi ngoại bào bằng phân tích biểu hiện CD63 (ELISA)



Hình 3.8. Đường chuẩn định lượng CD63 bằng phương pháp ELISA



Hình 3.9. So sánh nồng độ CD63 giữa các túi ngoại bào (EVs)

Nồng độ CD63 trong các túi ngoại bào (EVs) được xác định bằng phương pháp ELISA. Sự khác biệt giữa nhóm EVs không tiếp xúc với kháng nguyên CSFV và nhóm EVs tiếp xúc với kháng nguyên CSFV được đánh giá bằng phép kiểm định Student's t-test. *** biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê rất cao ($p < 0,001$).

Để xác định sự hiện diện và định lượng các túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) thu nhận từ dòng tế bào đại thực bào 3D4/2, phương pháp ELISA được sử dụng nhằm định lượng CD63 – một protein marker đặc trưng thuộc họ tetraspanin, thường được biểu hiện phổ biến trên bề mặt exosome. Kết quả xây dựng đường chuẩn CD63 (Hình 3.8) cho thấy mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa mật độ quang (OD) và nồng độ protein trong khoảng khảo sát, với phương trình hồi quy $y = 8 \times 10^{-7}x + 0,1244$ và hệ số xác định $R^2 = 0,9986$. Giá trị R^2 cao chứng tỏ độ tin cậy của mô hình nội suy, cho phép sử dụng để xác định chính xác nồng độ CD63 trong các mẫu EVs.

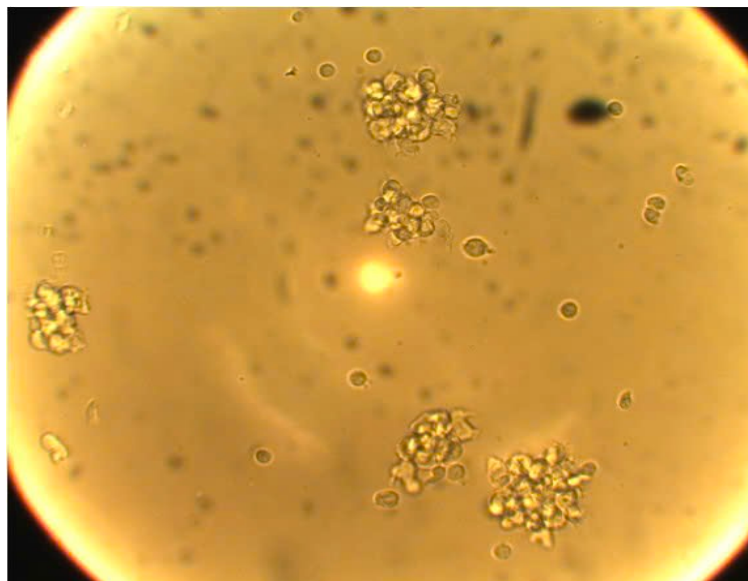
Dựa trên đường chuẩn, nồng độ CD63 trong các mẫu EVs được xác định và so sánh giữa hai điều kiện thí nghiệm (Hình 3.9). Kết quả cho thấy mẫu EVs thu nhận ở điều kiện 24 giờ – 40 µg/mL có nồng độ CD63 đạt khoảng 13.000 pg/mL, cao hơn rõ rệt so với mẫu 48 giờ – 10 µg/mL (khoảng 7.000 pg/mL). Sự chênh lệch gần gấp đôi này phản ánh mối tương quan thuận giữa lượng EVs và tín hiệu CD63 thu được, đồng thời cho thấy điều kiện 40 µg/mL tạo ra lượng EVs hoặc mật độ marker đặc trưng cao hơn đáng kể.

Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy CD63 là một trong những marker phổ biến và ổn định của EVs, đặc biệt là exosome, và mức độ biểu

hiện của CD63 thường tỷ lệ với số lượng túi ngoại bào trong mẫu [51]. Do đó, sự gia tăng nồng độ CD63 quan sát được trong nghiên cứu này có thể phản ánh sự gia tăng về số lượng EVs được tiết ra hoặc sự làm giàu của quần thể EVs mang marker CD63 dưới điều kiện xử lý kháng nguyên tối ưu.

3.3. Bước đầu phân tích ảnh hưởng của EVs mang kháng nguyên CSFV lên đáp ứng miễn dịch của tế bào T.

3.3.1. Kết quả phân lập và nuôi cấy tế bào lympho T từ máu ngoại vi lợn



Hình 3.10. Tế bào lympho T sau phân lập và nuôi cấy ổn định trong môi trường TexMACS

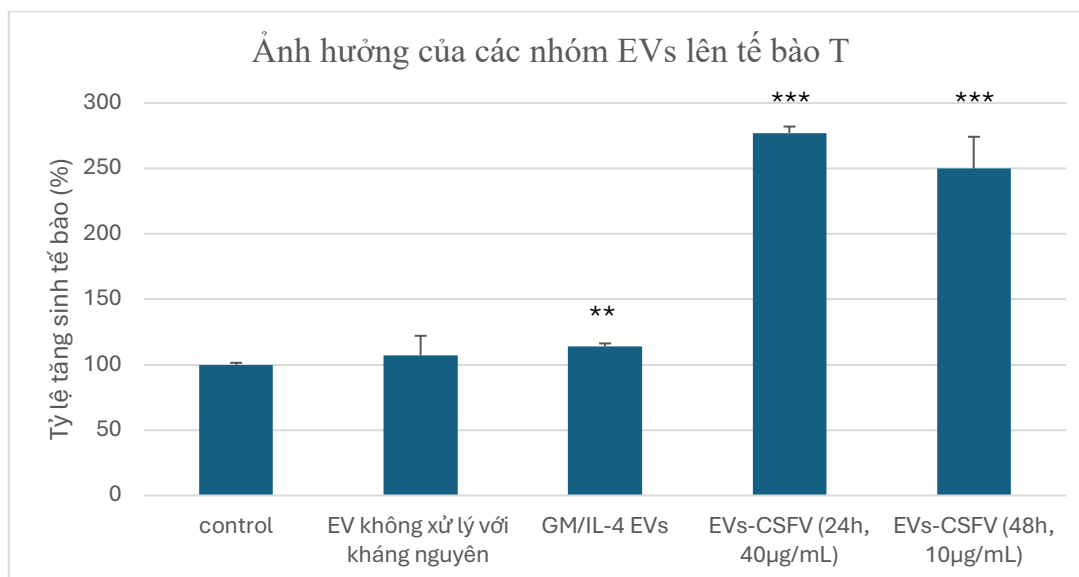
Quy trình phân lập tế bào lympho T từ máu ngoại vi lợn được thực hiện thành công, thu được quần thể tế bào có hình thái đặc trưng và khả năng thích nghi tốt trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Sau khi tách bằng phương pháp ly tâm từ tính gắn kháng thể, lớp tế bào đơn nhân (PBMCs) được thu nhận rõ ràng tại lớp interface, với độ sạch tương đối cao, ít lẫn hồng cầu và các mảnh vụn tế bào.

Sau quy trình phân lập và làm giàu bằng phương pháp từ tính, quần thể tế bào thu được thể hiện các đặc điểm hình thái điển hình của tế bào lympho. Quan sát dưới kính hiển vi cho thấy các tế bào có dạng hình cầu đặc trưng, kích thước nhỏ đồng nhất. Về đặc tính sinh trưởng, tế bào tồn tại ở trạng thái huyền phù, phân bố rải rác hoặc tập trung thành các cụm nhỏ và hoàn toàn không có hiện tượng bám dính bề mặt, phù hợp với đặc tính sinh học của dòng tế bào lympho T. Điều này không chỉ phản ánh chất lượng môi trường nuôi cấy mà còn cho thấy quần thể tế bào thu nhận

có tiềm năng đáp ứng tốt với các kích thích kháng nguyên hoặc tín hiệu hoạt hóa trong các thí nghiệm chức năng.

Đánh giá khả năng sống sót và thích nghi trong điều kiện *in vitro* cho thấy quần thể tế bào duy trì trạng thái sinh lý ổn định. Tỷ lệ tế bào sống đạt mức cao sau 24–48 giờ nuôi cấy, không xuất hiện các dấu hiệu của sự thoái hóa tế bào hay sự tập nhiễm vi sinh vật. Trong môi trường nuôi cấy chuyên dụng, tế bào biểu hiện sự tăng trưởng nhẹ về mật độ trong khi vẫn bảo tồn được tính nguyên vẹn về hình thái học. Các dữ liệu này khẳng định quy trình phân lập đã tối ưu hóa được độ tinh sạch và chất lượng tế bào, thiết lập nền tảng tin cậy cho các thử nghiệm đánh giá chức năng miễn dịch trong những giai đoạn nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. EVs mang kháng nguyên CSFV ảnh hưởng đến tế bào T



Hình 3.11. Tương tác giữa các nhóm EVs và tế bào T qua thử nghiệm MTS.

Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phép phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA), theo sau bởi phép kiểm định hậu nghiệm Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng (control).

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các nhóm túi ngoại bào (EVs) đều ghi nhận khả năng thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào lympho T so với nhóm đối chứng âm ($100,00 \pm 1,44\%$). Nhóm EV không xử lý với kháng nguyên đạt tỷ lệ tăng sinh $107,21 \pm 14,87\%$, trong khi nhóm GM/IL-4 EVs đạt $113,92 \pm 2,34\%$. Đặc biệt, hai nhóm EVs mang kháng nguyên CSFV cho hiệu quả kích thích mạnh hơn rõ rệt, với tỷ lệ tăng sinh đạt $277,03 \pm 5,03\%$ ở điều kiện xử lý 24 giờ với $40 \mu\text{g/mL}$ protein E2 và $249,89 \pm 24,34\%$ ở điều kiện xử lý 48 giờ với $10 \mu\text{g/mL}$ protein E2. Các kết quả này phản ánh sự khác biệt đáng kể về khả năng kích thích tăng sinh tế bào T giữa các

nhóm xử lý và đối chứng. Đồng thời, dữ liệu thu được cho thấy EVs trong nghiên cứu có liên quan trực tiếp đến đáp ứng tăng sinh của tế bào lympho T trong điều kiện in vitro.

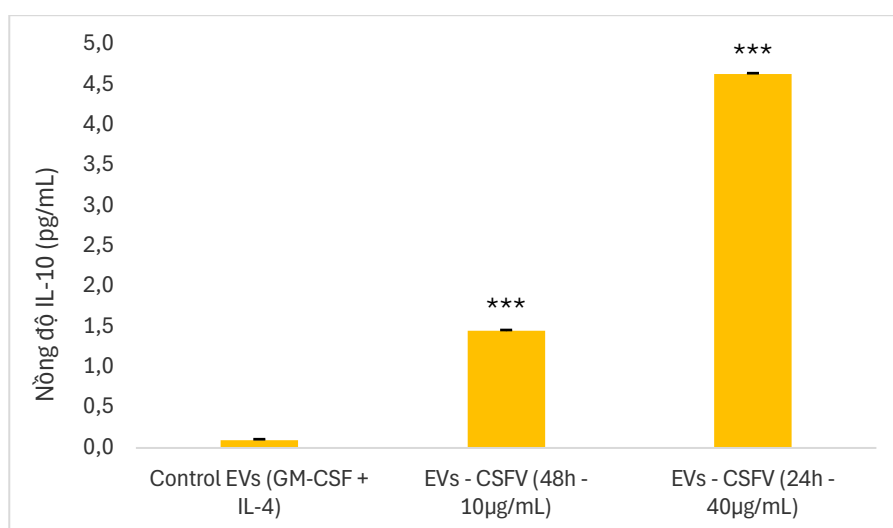
Dữ liệu thực nghiệm cũng ghi nhận hiệu quả kích thích tế bào của các nhóm EVs xử lý với kháng nguyên CSFV cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng dương sử dụng cytokine đơn lẻ (GM-CSF và IL-4). Cụ thể, nhóm GM/IL-4 EVs chỉ làm tăng mức tăng sinh lên $113,92 \pm 2,34\%$, mặc dù sự khác biệt so với đối chứng âm đạt ý nghĩa thống kê (** $p < 0,01$). Trong khi đó, nhóm EVs-CSFV (24 giờ, 40 $\mu\text{g/mL}$) và EVs-CSFV (48 giờ, 10 $\mu\text{g/mL}$) đạt lần lượt $277,03 \pm 5,03\%$ và $249,89 \pm 24,34\%$, cao hơn khoảng 2,4–2,5 lần so với nhóm GM/IL-4 EVs và có ý nghĩa thống kê rất cao so với đối chứng âm (** $p < 0,001$). Sự khác biệt này cho thấy việc mang kháng nguyên đặc hiệu của CSFV trên EVs đã làm tăng đáng kể khả năng hoạt hóa và kích thích tăng sinh tế bào lympho T so với việc chỉ sử dụng các cytokine biệt hóa đơn thuần.

Sự vượt trội này có thể được giải thích dựa trên cơ chế trình diện kháng nguyên đặc thù của EVs. Không giống như các cytokine đơn lẻ chỉ đóng vai trò điều hòa biệt hóa và hoạt hóa tế bào miễn dịch, EVs hoạt động như một hệ thống vận chuyển sinh học tích hợp, có khả năng mang đồng thời nhiều thành phần chức năng như protein kháng nguyên (E2), phân tử MHC lớp I/II và các tín hiệu đồng kích thích từ tế bào nguồn. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng EVs có thể tham gia trực tiếp vào quá trình trình diện kháng nguyên hoặc chuyển giao kháng nguyên cho các tế bào trình diện chuyên nghiệp (APCs), từ đó kích hoạt hiệu quả thụ thể tế bào T (TCR) và thúc đẩy đáp ứng miễn dịch tế bào [1, 2]. Đặc biệt, sự gia tăng biểu hiện MHC II trên EVs trong nghiên cứu này củng cố giả thuyết rằng EVs có thể đóng vai trò như “vi thể APC”, giúp tăng hiệu quả nhận diện kháng nguyên so với dạng kháng nguyên hòa tan.

Kết quả cho thấy hoạt tính kích thích của các EVs mang kháng nguyên CSFV phụ thuộc vào nồng độ xử lý ban đầu và thời gian thu nhận. Cụ thể, EVs thu từ tế bào 3D4/2 xử lý với protein E2 ở nồng độ 40 $\mu\text{g/mL}$ sau 24 giờ tạo ra mức tăng sinh tế bào T cao nhất trong thí nghiệm MTS. Điều này có thể liên quan đến trạng thái hoạt hóa tối ưu của tế bào tại thời điểm 24 giờ, khi quá trình nội hóa, xử lý và đóng gói kháng nguyên vào EVs đạt hiệu suất cao nhất. Ngược lại, EVs thu ở điều kiện nồng độ thấp hơn (10 $\mu\text{g/mL}$) hoặc tại thời điểm muộn hơn (48 giờ) cho thấy hiệu quả kích thích giảm hoặc có xu hướng bão hòa. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu cho thấy thành phần và chức năng của EVs phụ thuộc chặt chẽ vào trạng thái sinh lý của tế bào nguồn cũng như điều kiện nuôi cấy [4].

Các kết quả thu được cho thấy các túi ngoại bào (EVs) xử lý với kháng nguyên của CSFV có khả năng thúc đẩy mạnh mẽ sự tăng sinh của tế bào lympho T trong điều kiện *in vitro*, với mức tăng sinh cao hơn rõ rệt so với các nhóm đối chứng. Hiệu quả kích thích này phụ thuộc vào nồng độ kháng nguyên và thời gian xử lý, trong đó điều kiện 24 giờ – 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cho thấy đáp ứng tối ưu. Đồng thời, các EVs mang kháng nguyên CSFV thể hiện hoạt tính kích thích vượt trội so với nhóm chỉ sử dụng cytokine (GM-CSF và IL-4), cho thấy vai trò quan trọng của EVs trong việc truyền tải kháng nguyên và hoạt hóa đáp ứng miễn dịch. Những kết quả này khẳng định tiềm năng của EVs như một nền tảng hiệu quả trong việc kích thích tăng sinh tế bào T, định hướng ứng dụng trong nghiên cứu vaccine hoặc liệu pháp miễn dịch.

3.3.3. *Đánh giá nồng độ cytokine IL-10 trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2.*



Hình 3.12. *Đáp ứng tiết cytokine IL-10 của tế bào lympho T khi tương tác với các mẫu EVs mang kháng nguyên E2 của CSFV*

Nồng độ IL-10 được xác định bằng phương pháp ELISA. Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phép phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA), theo sau bởi phép kiểm định hậu nghiệm Tukey. *** biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$ so với nhóm đối chứng.

Biểu đồ thể hiện nồng độ cytokine IL-10 do tế bào T tiết ra khi được kích thích bởi EVs thu nhận từ đại thực bào trong các điều kiện xử lý khác nhau, bao gồm nhóm đối chứng và các nhóm EVs sau khi tiếp xúc với kháng nguyên ở 24 giờ (nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và 48 giờ (nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Ở nhóm đối chứng (GM-CSF + IL-4), nồng độ IL-10 được ghi nhận ở mức rất thấp, chỉ đạt $0,10 \pm 0,01$ pg/mL. Kết quả này cho thấy trong điều kiện biệt hóa cơ bản, khi không có sự hiện diện của kháng nguyên E2, các EVs không mang đủ tín hiệu cần thiết để kích hoạt mạnh đáp ứng điều hòa miễn dịch của tế bào T. Điều này phù hợp với vai trò chủ yếu của GM-CSF và IL-4 trong cảm ứng biệt hóa tế bào miễn dịch hơn là thúc đẩy trực tiếp sự tiết cytokine điều hòa từ tế bào T[57, 60].

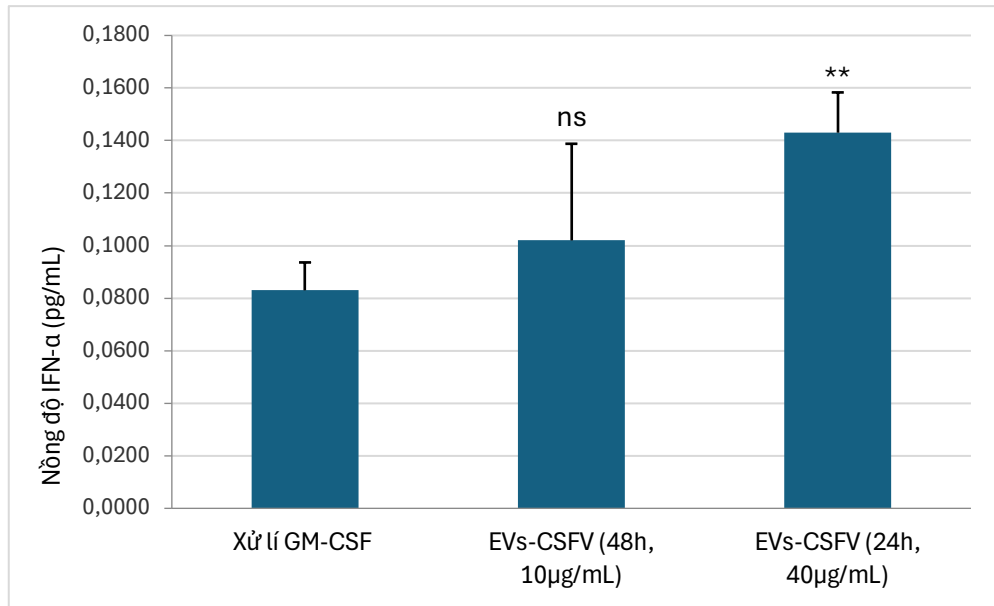
Tại nhóm EVs-CSFV thu nhận sau 48 giờ với nồng độ xử lý protein E2 là 10 μ g/mL, nồng độ IL-10 tăng lên $1,40 \pm 0,013$ pg/mL, cao gấp khoảng 14 lần so với nhóm đối chứng. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê rất cao ($p = 0,00070$; $p < 0,001$). Kết quả cho thấy ngay cả khi được xử lý với nồng độ kháng nguyên tương đối thấp, các EVs vẫn có khả năng mang theo các tín hiệu miễn dịch cần thiết để kích thích tế bào T tiết IL-10. Sự gia tăng này phản ánh quá trình nhận diện kháng nguyên và khởi phát đáp ứng miễn dịch đặc hiệu thông qua các thành phần được vận chuyển bởi EVs.[61].

Ở nhóm EVs-CSFV thu nhận sau 24 giờ với nồng độ protein E2 là 40 μ g/mL, nồng độ IL-10 đạt $4,60 \pm 0,013$ pg/mL, là giá trị cao nhất trong toàn bộ thí nghiệm. Mức IL-10 này cao gấp khoảng 46 lần so với nhóm đối chứng và cao hơn khoảng 3,3 lần so với nhóm EVs-CSFV 48 giờ – 10 μ g/mL. Sự khác biệt so với nhóm đối chứng có ý nghĩa thống kê rất cao ($p = 0,00085$; $p < 0,001$). Kết quả cho thấy việc xử lý tế bào với nồng độ kháng nguyên E2 cao hơn giúp tăng hiệu quả đóng gói kháng nguyên vào EVs, từ đó tạo ra tín hiệu kích thích mạnh mẽ hơn đối với tế bào T.

Sự gia tăng nồng độ IL-10 tỷ lệ thuận với liều lượng kháng nguyên E2 tiếp xúc ban đầu là minh chứng quan trọng cho thấy các túi ngoại bào (EVs) có nguồn gốc từ đại thực bào 3D4/2 đã thực hiện hiệu quả vai trò của một "giá thể" sinh học trong việc vận chuyển và trình diện thông tin kháng nguyên đến tế bào lympho T. Hiện tượng tăng IL-10 ở nhóm 40 μ g/mL cho thấy hai đặc điểm chính: (i) cơ chế tự điều hòa giúp duy trì cân bằng miễn dịch và hạn chế viêm quá mức; (ii) phản ánh tế bào T đã nhận diện và đáp ứng rõ rệt với kháng nguyên E2 được trình diện qua EVs.

Kết quả khẳng định tác động của EVs lên hệ miễn dịch phụ thuộc chặt chẽ vào cả thời gian thu nhận và nồng độ protein tiếp xúc, trong đó EVs nồng độ cao (40 μ g/mL) cho thấy tiềm năng vượt trội trong việc kích hoạt đáp ứng tế bào [15, 61].

3.3.4. Đánh giá nồng độ cytokine IFN- α trong sự tương tác giữa tế bào T với các túi ngoại bào (EVs) từ đại thực bào 3D4/2



Hình 3.13. Nồng độ IFN- α trong hệ tương tác giữa tế bào T và các túi ngoại bào (EVs) từ tế bào 3D4/2

Nồng độ IFN- α được xác định bằng phương pháp ELISA. Sự khác biệt giữa các nhóm được đánh giá bằng phép phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA), theo sau bởi phép kiểm định hậu nghiệm Tukey. ** biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$; ns: không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Biểu đồ hình 3.14 thể hiện nồng độ cytokine IFN- được tiết ra từ tế bào lympho T sau khi tương tác với các mẫu EVs thu nhận từ đại thực bào 3D4/2. Kết quả cho thấy các túi ngoại bào mang kháng nguyên E2 đã kích thích hiệu quả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh thông qua việc gia tăng sản xuất IFN- theo nồng độ kháng nguyên xử lý.

Ở nhóm đối chứng GM-CSF, nồng độ IFN- α được ghi nhận ở mức thấp nhất, đạt $0,0830 \pm 0,0106$ pg/mL. Đây được xem là mức cytokine nền trong điều kiện nuôi cấy cơ bản khi tế bào lympho T chưa nhận được tín hiệu kích thích đặc hiệu từ kháng nguyên E2. Kết quả này phản ánh trạng thái hoạt hóa miễn dịch thấp và cho thấy các EVs không mang kháng nguyên không đủ khả năng kích thích mạnh quá trình sản xuất interferon.

Tại nhóm EVs-CSFV thu nhận sau 48 giờ từ tế bào xử lý với protein E2 ở nồng độ 10 µg/mL, nồng độ IFN- α tăng lên $0,1020 \pm 0,0368$ pg/mL, cao hơn khoảng 22,9% so với nhóm đối chứng. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (ns; $p > 0,05$). Kết quả cho thấy mặc dù EVs đã bắt đầu mang các tín hiệu miễn dịch có nguồn gốc từ kháng nguyên E2 và có khả năng kích thích tế bào T sản xuất

IFN- α , nhưng cường độ đáp ứng vẫn còn tương đối hạn chế ở điều kiện nồng độ kháng nguyên thấp.

Ngược lại, nhóm EVs-CSFV thu nhận sau 24 giờ từ tế bào xử lý với protein E2 ở nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ghi nhận nồng độ IFN- α cao nhất, đạt $0,1430 \pm 0,0153$ pg/mL, tăng khoảng 72,3% so với nhóm đối chứng và cao hơn khoảng 40,2% so với nhóm EVs-CSFV (48 giờ, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sự gia tăng này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) so với nhóm đối chứng. Kết quả cho thấy hiệu quả kích thích miễn dịch phụ thuộc chặt chẽ vào lượng kháng nguyên được đóng gói trong EVs cũng như trạng thái sinh lý của tế bào nguồn tại thời điểm thu nhận. Điều kiện xử lý 24 giờ với nồng độ E2 cao dường như tạo ra các EVs mang nhiều tín hiệu miễn dịch hơn, từ đó thúc đẩy mạnh mẽ quá trình sản xuất IFN- α của tế bào T.

Sự gia tăng IFN- α tỷ lệ thuận với liều lượng kháng nguyên E2 cho thấy EVs có khả năng kích hoạt hiệu quả đáp ứng miễn dịch bẩm sinh chống virus. Mẫu EVs thu nhận tại 24 giờ với nồng độ 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ghi nhận mức IFN- α cao nhất, phản ánh khả năng kích thích mạnh mẽ lên tế bào lympho T so với đối chứng.

Về mặt cơ chế, sự gia tăng IFN- α khi tế bào lympho T tiếp xúc với EVs mang kháng nguyên CSFV cho thấy EVs không chỉ đơn thuần là phương tiện vận chuyển kháng nguyên mà còn có khả năng kích hoạt các con đường miễn dịch bẩm sinh. Các EVs có thể chứa RNA virus hoặc các phân tử liên quan đến mầm bệnh (PAMPs), từ đó kích hoạt các thụ thể nhận diện mẫu như TLRs trong tế bào miễn dịch, dẫn đến hoạt hóa các yếu tố phiên mã như IRF3/IRF7 và thúc đẩy sản xuất interferon type I [62]. Đồng thời, IFN- α đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường trình diện kháng nguyên và thúc đẩy biệt hóa tế bào T, qua đó tạo cầu nối giữa miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng [63]

Kết quả này khẳng định vai trò của IFN- α trong việc hỗ trợ trình diện kháng nguyên và định hướng đáp ứng tế bào T, đồng thời cho thấy EVs từ đại thực bào 3D4/2 đã mang và truyền tải hiệu quả tín hiệu miễn dịch. Tổng thể, dữ liệu củng cố tiềm năng ứng dụng EVs, đặc biệt ở điều kiện 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, như một nền tảng mang kháng nguyên giúp tăng cường hiệu quả vaccine mà không cần hỗ trợ truyền thống.

Các kết quả thực nghiệm cho thấy các túi ngoại bào (extracellular vesicles – EVs) thu nhận tại thời điểm 24 giờ với nồng độ xử lý kháng nguyên 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đạt hiệu quả kích thích miễn dịch cao nhất, với tỷ lệ tăng sinh tế bào lympho T gần 300% so với đối chứng. Hiệu quả này đi kèm với sự gia tăng rõ rệt của IFN- α và IL-10, phản ánh khả năng của EVs trong việc vừa kích hoạt đáp ứng miễn dịch kháng virus, vừa duy trì cơ chế điều hòa miễn dịch. Sự gia tăng IFN- α – một interferon loại I đóng

vai trò trung tâm trong miễn dịch bẩm sinh – cho thấy EVs có thể góp phần tái thiết lập trạng thái kháng virus của tế bào, đặc biệt quan trọng trong bối cảnh virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV) có khả năng ức chế con đường interferon thông qua các protein không cấu trúc như N^{pro} và E^{ms} [48]. Đồng thời, sự tăng IL-10 phản ánh một cơ chế phản hồi âm sinh lý, giúp kiểm soát cường độ đáp ứng miễn dịch, hạn chế nguy cơ tổn thương mô do phản ứng viêm quá mức [64]. Sự phối hợp giữa hai cytokine này cho thấy EVs đóng vai trò như một hệ thống điều phối miễn dịch cân bằng, vừa thúc đẩy vừa kiểm soát đáp ứng miễn dịch.

Về mặt cơ chế, kết quả nghiên cứu củng cố giả thuyết rằng EVs là một nền tảng trình diện kháng nguyên hiệu quả. Kháng nguyên E2 của CSFV khi được đóng gói hoặc trình diện trên bề mặt EVs có thể duy trì cấu trúc không gian ổn định hơn so với dạng hòa tan, từ đó tăng khả năng nhận diện bởi thụ thể tế bào T (TCR). Bên cạnh đó, EVs có thể mang theo các phân tử MHC lớp I/II và các tín hiệu đồng kích thích từ tế bào nguồn, cho phép chúng tham gia trực tiếp hoặc gián tiếp vào quá trình trình diện kháng nguyên, góp phần tăng hiệu quả hoạt hóa tế bào T [1,12]. Cơ chế này phù hợp với mô hình “synapse miễn dịch di động”, trong đó EVs đóng vai trò như các đơn vị truyền tải tín hiệu miễn dịch hoàn chỉnh, giúp khuếch đại đáp ứng miễn dịch so với kháng nguyên tự do.

Ngoài ra, sự phụ thuộc rõ rệt của đáp ứng miễn dịch vào nồng độ kháng nguyên và thời gian xử lý cho thấy vai trò quan trọng của động học sinh học trong quá trình hình thành EVs. Điều kiện tối ưu (24 giờ – 40 µg/mL) có thể tương ứng với giai đoạn tế bào 3D4/2 đạt trạng thái hoạt hóa chuyên hóa cao nhất, cho phép nội hóa, xử lý và đóng gói kháng nguyên vào EVs với hiệu suất tối ưu. Ngược lại, hiệu quả giảm ở thời điểm muộn hơn hoặc nồng độ thấp hơn có thể liên quan đến sự thay đổi thành phần EVs, sự suy giảm hoạt tính tế bào hoặc hiện tượng bão hòa tín hiệu trên tế bào đích. Những quan sát này phù hợp với các nghiên cứu cho thấy thành phần và chức năng của EVs phụ thuộc chặt chẽ vào trạng thái sinh lý và điều kiện môi trường của tế bào đích [4].

Các kết quả nghiên cứu không chỉ xác nhận khả năng của EVs trong việc mang và trình diện kháng nguyên CSFV mà còn làm rõ cơ chế kích hoạt và điều hòa đáp ứng miễn dịch thông qua sự cân bằng giữa tín hiệu kháng virus và điều hòa miễn dịch. Việc xác định được điều kiện tối ưu (24 giờ – 40 µg/mL) cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc chuẩn hóa quy trình sản xuất EVs, đồng thời mở ra triển vọng ứng dụng EVs như một nền tảng vaccine tiềm năng trong các nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt là các thử nghiệm *in vivo* nhằm đánh giá hiệu quả bảo hộ thực tế.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Dòng tế bào đại thực bào 3D4/2 nuôi cấy trong môi trường RPMI thể hiện khả năng sinh trưởng ổn định và duy trì trạng thái sinh lý phù hợp. Khi được xử lý với các yếu tố kích thích 20 ng/mL IL-4 kết hợp với 100 ng/mL GM-CSF tế bào có sự thay đổi hình thái theo hướng biệt hóa thể bào tua. Tuy nhiên, sau 5 ngày biệt hoá biểu hiện các SLA lớp I và lớp II trên bề mặt tế bào vẫn ở mức thấp và ổn định, thể hiện dòng tế bào thể hiện ở trạng thái tiền tế bào tua, có khả năng thực bào, sau khi tiếp xúc kháng nguyên tỉ lệ SLA I và SLA II biểu hiện ra bề mặt mạnh hơn.
2. Tiền tế bào tua 3D4/2 tiếp xúc với kháng nguyên E2 ở nồng độ 40 µg/mL sau 24h tạo EVs mang kháng nguyên tốt nhất. Các EVs thu nhận được từ tế bào trình diện kháng nguyên có hình thái dạng cầu đặc trưng, kích thước phân bố chủ yếu trong khoảng 80–200 nm (kích thước trung bình 136,7 nm), số lượng đạt $1,04 \times 10^{11}$ particles/mL, biểu hiện dương tính với marker CD63 và mang epitope kháng nguyên E2
3. Các EVs mang epitope kháng nguyên E2 của CSFV có khả năng thúc đẩy mạnh mẽ đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào, thể hiện qua việc làm tăng sinh số lượng tế bào lympho T lên khoảng 250% - 280% (theo kết quả thử nghiệm MTS). Đồng thời, sự gia tăng đồng thời của hàm lượng IFN- α và IL-10 cho thấy EVs mang kháng nguyên có khả năng định hướng đáp ứng miễn dịch theo xu hướng tối ưu: vừa tăng cường trạng thái hoạt hóa chống virus mạnh mẽ, vừa kích thích tín hiệu IL-10 đóng vai trò điều hòa, kiểm soát pha kháng viêm để duy trì cân bằng sinh học nội môi, đặc biệt biểu hiện rõ nét ở thời điểm 24 giờ

KIẾN NGHỊ

1. Cần tiếp tục tối ưu hóa quy trình xử lý kháng nguyên nhằm nâng cao hiệu quả đóng gói epitope vào EVs, bao gồm việc lựa chọn nồng độ kháng nguyên, thời gian xử lý và điều kiện nuôi cấy phù hợp. Đồng thời, cần đánh giá khả năng trình diện kháng nguyên của EVs thông qua các chỉ dấu phân tử đặc hiệu, từ đó đảm bảo EVs mang epitope có tính sinh miễn dịch cao và ổn định.
2. Sau khi xác định được tiềm năng kích thích miễn dịch in vitro, cần triển khai các nghiên cứu in vivo trên mô hình động vật (chuột hoặc lợn) nhằm đánh giá toàn diện hiệu quả của nền tảng vaccine dựa trên EVs. Các chỉ tiêu cần khảo sát bao gồm khả năng tạo kháng thể trung hòa, đáp ứng miễn dịch tế bào và hiệu quả bảo hộ thực tế. Đây là bước quan trọng để xác nhận tính ứng dụng và chuyển giao kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Raposo G., Stoorvogel W., 2013, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends, *Journal of Cell Biology*, 200(4), 373-383.
- [2] Doyle L.M., Wang M.Z., 2019, Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis, *Cells*, pp. 8(7), 727.
- [3] Wolf P., 1967, The nature and significance of platelet products in human plasma, *British Journal of Haematology*, 13(3), 269–288.
- [4] Yáñez-Mó M., Siljander P.R.M., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., et al., 2015, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *Journal of Extracellular Vesicles*, pp. 4(1), 27066.
- [5] Théry C., Duban L., Segura E., Véron P., Lantz O., Amigorena S., 2012, Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes, *Nature Immunology*, pp. 3(12), 1156–1162.
- [6] Suresh Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J., 2010, Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication, *Journal of Proteomics*, pp. 73(10), 1907–1920.
- [7] Colombo M., Raposo G., Théry C., 2014, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 30(1), 255–289.
- [8] Samir EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.A., 2013, Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities, *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 12(5), 347–35.
- [9] Vallhov H., Gutzeit C., Johansson S.M., Nagy N., Paul M., Li Q., Friend S., George T.C., Klein E., Scheynius A., Gabrielsson S., 2011, Exosomes containing glycoprotein 350 released from Epstein–Barr virus-transformed B cells induce a CD4⁺ T cell response, *Journal of Immunology*, pp. 186(10), 5586–5595.
- [10] Montaner-Tarbes S., del Portillo H.A., Montoya M., Fraile L., 2018, Key gaps in the knowledge of the porcine respiratory reproductive syndrome virus (PRRSV), *Frontiers in Veterinary Science*, pp. 6(38), 1–8.
- [11] Zhu, L., Bao, L., Zhang, X., Xia, X., & Sun, H., 2015, Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication with exosome-transferred artificial microRNA targeting the 3' untranslated region, *Journal of virological methods*, pp. 223, 61-68.
- [12] Robbins P.D., Morelli A.E., 2014, Regulation of immune responses by extracellular vesicles, *Nature Reviews Immunology*, pp. 14(3), 195–208.
- [13] Kalluri R., LeBleu V.S., 2020, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, pp. 367(6478), eaau6977.
- [14] Zeng F., Morelli A.E., 2018, Extracellular vesicle-mediated MHC cross-dressing in immune homeostasis, transplantation, infectious diseases, and cancer, *In Seminars in immunopathology*, pp. (Vol. 40, No. 5, pp. 477-490).9, 1–9.
- [15] Graça Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Leijendekker R., Harding C.V., Melief C.J.M., Geuze H.J., 1996, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles, *Journal of Experimental Medicine*, pp. 183(3), 1161–1172.

- [16] Segura E., Nicco C., Lombard B., Véron P., Raposo G., Batteux F., Amigorena S., Théry C., 2005, ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming, *Blood*, pp. 106(1), 216–223.
- [17] Mittelbrunn M., Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., González S., Sánchez-Cabo F., González M.A., Bernad A., Sánchez-Madrid F., 2011, Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells, *Nature Communications*, pp. 2, 282.
- [18] Dreux M., Garaigorta U., Boyd B., Décembre E., Chung J., Whitten-Bauer C., Wieland S., Chisari F.V., 2012, Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity, *Cell Host & Microbe*, pp. 12(4), 558–570.
- [19] Marcoux G., Laroche A., Hasse S., Boilard E., 2021, Platelet extracellular vesicles contain active proteasome involved in protein processing for antigen presentation via MHC-I molecules, *Blood*, pp. 138(9), 770–784.
- [20] Poggio M., Hu T., Pai C.C., Chu B., Belair C.D., Chang A., Montabana E., Lang U.E., Fu Q., Fong L., et al., 2019, Suppression of exosomal PD-L1 induces systemic anti-tumor immunity and memory, *Cell*, pp. 177(2), 414–427.
- [21] Huber V., Fais S., Iero M., Lugini L., Canese P., Squarcina P., Zaccheddu A., Colone M., Arancia G., Gentile M., et al., 2005, Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape, *Cancer Research*, pp. 65(17), 7756–7763.
- [22] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O., 2007, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nature Cell Biology*, pp. 9(6), 654–659.
- [23] Nolte-'t Hoen E.N.M., Cremer T., Gallo R.C., Margolis L.B., 2016, Margolis L.B., 2016, Extracellular vesicles and viruses: Are they close relatives?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 113(33), 9155–9161.
- [24] Meckes D.G., Raab-Traub N., 2011, Microvesicles and viral infection, *Journal of Virology*, pp. 85(24), 12844–12854.
- [25] Urbanelli L., Buratta S., Sagini K., Ferrara G., Lanni M., Emiliani C., 2019, Exosome-based strategies for diagnosis and therapy," *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, pp. 14(2), 1–12.
- [26] Anticoli S., Manfredi F., Chiozzini C., Arenaccio C., Olivetta E., Ferrantelli F., Leone P., Federico M., 2018, An exosome-based vaccine platform imparts cytotoxic T lymphocyte immunity against viral antigens, *Biotechnology Journal*, pp. 13(4), e1700443.
- [27] Escudier B., Dorval T., Chaput N., André F., Caby M.P., Novault S., Flament C., Leboulaire C., Borg C., Amigorena S., et al., 2005, Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell-derived exosomes: results of a phase I clinical trial, *Journal of Translational Medicine*, pp. 3(1), 10.
- [28] Lillehoj H.S., Kim C.H., Keeler C.L., Zhang S., 2007, Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens in poultry, *Poultry Science*, pp. 86(7), 1491–1500.
- [29] Zeelenberg I.S., Ostrowski M., Krumeich S., Bobrie A., Jancic C., Boissonnas A., Delcayre A., Le Pecq J.B., Combadière B., Amigorena S., Théry C., 2008, Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses, *Cancer Research*, pp. 68(4), 1228–1235.

- [30] Hui Wang H., Peng R., Wang J., Qin Z., Xue L., Wang Y., 2019, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection is inhibited by exosomes derived from microRNA-expressing cells, *Veterinary Microbiology*, pp. 233, 140–146.
- [31] Edwards S., Fukusho A., Lefèvre P.C., Lipowski A., Pejsak Z., Roehe P., Westergaard J., 2000, Classical swine fever: the global situation, *Veterinary Microbiology*, pp. 73(2–3), 103–119.
- [32] Postel A., Austermann-Busch S., Petrov A., Moennig V., Becher P., 2018, Epidemiology, diagnosis and control of classical swine fever: recent developments and future challenges, *Transboundary and Emerging Diseases*, pp. 65(1), 248–261.
- [33] Blome S., Staubach C., Henke J., Carlson J., Beer M., 2017, Classical swine fever—an updated review," *Viruses*, pp. 9(4), 86.
- [34] Mo Ningyi N., Li S., 2019, Classical swine fever virus: pathogenesis, immunosuppression and vaccination," *Viruses*, pp. 11(8), 1–18, 2019.
- [35] Meyers G., Thiel H.J., 1996, Molecular characterization of pestiviruses, *Advances in Virus Research*, pp. 47, 53–118.
- [36] Tautz N., Tews B.A., Meyers G., 2015, The molecular biology of pestiviruses, *Advances in Virus Research*, pp. 93, 47–160.
- [37] Dong X.N., Chen Y.H., 2007, Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines, *Vaccine*, pp. 25, (2), 205–230.
- [38] v. R. P.A., 2007, A common neutralizing epitope on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus, *Journal of General Virology*, pp. 88, (1), 70–77.
- [39] Li Y., Wang X., Bo K., Wang X., Tang B., Yang B., Jiang W., Jiang P., 2013, Emergence of a novel classical swine fever virus with increased virulence and antigenic variation, *Journal of Virology*, pp. 87, (8), 4627–4636.
- [40] Moennig V., Floegel-Niesmann G., Greiser-Wilke I., 2003, Clinical signs and epidemiology of classical swine fever: a review of new knowledge, *The Veterinary Journal*, pp. 165, (1), 11–20.
- [41] Fan J., Li S., Wang L., 2021, Anti-classical swine fever virus strategies," *Microorganisms*, pp. 9, (4), 761.
- [42] v. O. J.T., 2003, Vaccinology of classical swine fever: from lab to field, *Veterinary Microbiology*, pp. 96, (4), 367–384.
- [43] Nguyễn Phúc Hưng, Nguyễn Thị Lan, Bùi Thị Tô Nga, Trương Thắng, Lê Văn Phan, 2019, Genetic characterization of classical swine fever virus circulating in Vietnam from 2014 to 2018, *Transboundary and Emerging Diseases*, pp. 66 (6), 2467–2476.
- [44] del Cacho E., Gallego M., López-Bernad F., Quílez J., Sánchez-Acedo C., 2012, Isolation of extracellular vesicles from *Eimeria tenella* and their role in host–parasite interaction, *Veterinary Parasitology*, pp. 187, (3–4), 507–516.
- [45] Ruggli N., Summerfield A., McCullough K.C., 2009, Classical swine fever virus interferes with cellular antiviral defenses: evidence for a novel function of Npro, *Journal of Virology*, pp. 83, (9), 4649–4658.
- [46] Seago J., Hilton L., Reid E., Doceul V., Jeyatheesan J., Moganeradj K., McCauley J., Charleston B., Goodbourn S., 2007, The Npro product of classical swine fever virus and bovine viral diarrhoea virus uses a conserved mechanism to target interferon regulatory factor-3, *Journal of General Virology*, pp. 88, (11), 3002–3006.

- [47] Sánchez-Cordón P.J., Núñez A., Neimanis A., Wikström-Lassa E., Montoya M., Crooke H., Gavier-Widén D., 2005, Classical swine fever: pathology, pathogenesis and immune response, *Veterinary Journal*, pp. 169, (2), 169–177.
- [48] Summerfield A., Knötig S.M., McCullough K.C., 2002, Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death, *Journal of Virology*, pp. 76, (18), 9153–9162.
- [49] Sánchez-Cordón P.J., Montoya M., Reis A.L., Dixon L.K., 2008, African swine fever: a re-emerging viral disease threatening the global pig industry, *Veterinary Journal*, p. 175, (3).
- [50] Summerfield A., Ruggli N., 2015, Immune responses against classical swine fever virus: between ignorance and lunacy, *Frontiers in Veterinary Science*, pp. 2, (10), 1–9.
- [51] Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Jovanovic-Talisman, T., 2018, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *Journal of extracellular vesicles*, p. 7(1), 1535750.
- [52] Lellahi, S. M., Azeem, W., Hua, Y., Gabriel, B., Paulsen Rye, K., Reikvam, H., & Kalland, K. H., 2023, GM-CSF, Flt3-L and IL-4 affect viability and function of conventional dendritic cell types 1 and 2, *Frontiers in Immunology*, pp. 13, 1058963.
- [53] Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., et al., 1994, Proliferating dendritic cell progenitors in human blood, *Journal of Experimental Medicine*, pp. 180(1), 83–93.
- [54] Gordon S., Martinez F.O., 2010, Alternative activation of macrophages: mechanism and functions, *Immunity*, pp. 32(5), 593–604.
- [55] Jirong Zhou J., Li S., Wang X., Zou Y., 2014, Characterization of porcine alveolar macrophage cell line 3D4/2 and its immune functions, *eterinary Immunology and Immunopathology*, pp. 159(1–2), 1–10.
- [56] Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R.R., 2010, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine, *Virus Research*, pp. 154(1–2), 1–6.
- [57] Martinez F.O., Helming L., Gordon S., 2009, Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, *Annual Review of Immunology*, pp. 27, 451–483.
- [58] Guillaume van Niel G., D'Angelo G., Raposo G., 2018, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, pp. 19(4), 213–228.
- [59] Kenneth W Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötval J., Nolte't Hoen E.N.M., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., et al., 2013, Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research, *Journal of Extracellular Vesicles*, p. 2(1), 20360.
- [60] Peter J Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerd S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T., et al., 2014, Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines, *Immunity*, pp. 41(1), 14–20.
- [61] Kevin N Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M., 2008, IL-10: the master regulator of immunity to infection, *Journal of Immunology*, pp. 180(9), 5771–5777.
- [62] Schorey J.S., Cheng Y., Singh P.P., Smith V.L., 2015, Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions, *EMBO Reports*, 16(1), 24–43.
- [63] vashkiv L.B., Donlin L.T., 2014, Regulation of type I interferon responses, *Nature Reviews Immunology*, pp. 14(1), 36–49.

- [64] Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M., 2008, IL-10: The master regulator of immunity to infection, *Journal of Immunology*, pp. 180(9), 5771–5777.

CHARACTERIZATION OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED STEM CELL EXTRACELLULAR VESICLES AND THEIR COMBINED EFFECTS WITH CURCUMIN ON CAFLUX-HepG2 REPORTER CELLS

La Thi Huyen^{1,2*}, Hoang Hong Hanh¹, Tran Manh Hung¹, Luong Quang Ha³, Le Thi Minh Phuc¹, Ha Thi Minh Tam⁴, Nguyen Thuy Linh¹, Nguyen Thi Da¹, Nguyen Trong Linh⁵, Nguyen Thu Trang⁵

¹Institute of Biology – VAST, ²Graduate University of Science and Technology - VAST

³USTH University, ⁴HaNoi Pedagogical University 2, ⁵Phenikaa Hospital

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 31/7/2025</p> <p>Revised: 10/01/2026</p> <p>Published: 12/01/2026</p>	<p>Hepatocellular carcinoma is a malignancy with poor prognosis and limited therapeutic options. Recently, extracellular vesicles derived from adipose-derived stem cells and curcumin have emerged as potential modulators of oncogenic signaling pathways, including the aryl hydrocarbon receptor axis. To investigate their regulatory effects on AhR signaling, this study employed the CAFLUX-HepG2 reporter cell line, which harbors an EGFP reporter gene under the control of an XRE-containing promoter. The effects of ADSC-EVs and curcumin on AhR activation, target gene expression, and cell viability were assessed. ADSC-EVs were characterized by nanoparticle tracking analysis; cell viability was determined by MTT assay; and the expression levels of <i>Cyp1a1</i> and <i>Cyp1b1</i> genes were measured using qPCR. The results showed that ADSC-EVs exhibited high biocompatibility with no cytotoxic effects, while curcumin induced dose-dependent cytotoxicity and robust activation of AhR signaling. Both ADSC-EVs and curcumin downregulated the expression of <i>Cyp1a1</i> and <i>Cyp1b1</i>, with curcumin exerting a stronger inhibitory effect. Notably, the combination treatment enhanced selective suppression of <i>Cyp1a1</i> without further affecting <i>Cyp1b1</i> expression, indicating a non-synergistic, selective regulatory pattern on the AhR axis.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>CAFLUX HepG2 Extracellular vesicles Curcumin AhR signaling</p>	

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA EVs TỪ TẾ BÀO GỐC MỠ MỠ PHỐI HỢP VỚI CURCUMIN TRÊN DÒNG TẾ BÀO CẢM ỨNG CAFLUX-HepG2

Lã Thị Huyên^{1,2*}, Hoàng Hồng Hạnh¹, Trần Mạnh Hùng¹, Lương Quảng Hà³, Lê Thị Minh Phúc¹, Hà Thị Minh Tâm⁴, Nguyễn Thuỳ Linh¹, Nguyễn Thị Đà¹, Nguyễn Trọng Linh⁵, Nguyễn Thu Trang⁵

¹Viện Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học USTH, ⁴Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, ⁵Bệnh viện Phenikaa

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 31/7/2025</p> <p>Ngày hoàn thiện: 10/01/2026</p> <p>Ngày đăng: 12/01/2026</p>	<p>Ung thư biểu mô tế bào gan là bệnh lý có tiên lượng xấu và hiện vẫn còn thiếu các phương pháp điều trị hiệu quả. Gần đây, túi ngoại bào từ tế bào gốc mỡ ADSC-EVs và curcumin nổi lên như các yếu tố điều hòa tiềm năng đối với các trục tín hiệu liên quan đến sinh ung, trong đó có thụ thể aryl hydrocarbon receptor. Nhằm làm sáng tỏ vai trò điều hòa của hai tác nhân này trên trục AhR, nghiên cứu sử dụng dòng tế bào cảm ứng CAFLUX-HepG2 mang gen báo cáo EGFP dưới promoter chứa XRE để đánh giá tác động của ADSC-EVs và curcumin đến hoạt hóa AhR, biểu hiện gen đích và khả năng sống sót của tế bào. EVs được xác định bằng phương pháp phân tích hạt nano, độc tính tế bào được đánh giá bằng thử nghiệm MTT, và biểu hiện gen <i>Cyp1a1</i>, <i>Cyp1b1</i> được phân tích bằng qPCR. Kết quả cho thấy ADSC-EVs có tính tương thích sinh học cao, không gây độc, trong khi curcumin gây độc tế bào phụ thuộc liều và hoạt hóa mạnh trục tín hiệu AhR. Cả hai tác nhân đều làm giảm biểu hiện gen <i>Cyp1a1</i> và <i>Cyp1b1</i>, trong đó curcumin có tác dụng ức chế mạnh hơn. Đáng chú ý, khi kết hợp hai tác nhân, hiệu ứng ức chế chọn lọc trên gen <i>Cyp1a1</i> tăng lên nhưng không làm thay đổi thêm biểu hiện của <i>Cyp1b1</i>, cho thấy tác động điều hòa trục AhR theo cơ chế không cộng hưởng.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>CAFLUX HepG2 Túi ngoại bào Curcumin Tín hiệu AhR</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.13336>

* Corresponding author. Email: lahuyenibt@gmail.com

1. Giới thiệu

Ung thư biểu mô tế bào gan (Hepatocellular carcinoma – HCC) là dạng phổ biến nhất của ung thư gan nguyên phát, chiếm tới 90% số ca được chẩn đoán và là một trong những nguyên nhân gây tử vong do ung thư hàng đầu trên toàn cầu [1], [2]. Bệnh thường phát sinh trên nền các bệnh lý gan mạn tính như viêm gan B/C, xơ gan, gan nhiễm mỡ, và chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường như độc tố aflatoxin và lạm dụng rượu [1]. Dù phẫu thuật và ghép gan là lựa chọn điều trị ở giai đoạn sớm, phần lớn bệnh nhân HCC ở giai đoạn muộn phải phụ thuộc vào điều trị toàn thân, chủ yếu bằng các thuốc ức chế kinase (TKIs) [2]. Tuy nhiên, khả năng kháng thuốc và hiệu quả hạn chế đã làm nổi bật nhu cầu tìm kiếm các chiến lược điều trị thay thế [2].

Tế bào gốc trung mô (MSCs), đặc biệt là MSCs phân lập từ mô mỡ (ADSCs), được quan tâm nhờ khả năng hướng đích khối u và điều hòa các quá trình sinh học liên quan đến ung thư như hình thành mạch, viêm, và chuyển dạng biểu mô – trung mô (EMT) [3]. Các túi ngoại bào (EVs) tiết ra từ MSCs là các vi hạt màng bao có khả năng mang theo nhiều phân tử sinh học và mô phỏng hoạt tính sinh học của tế bào mẹ mà không mang theo nguy cơ cấy ghép tế bào sống [4]. EVs từ ADSCs (ADSC-EVs) đặc biệt thu hút do dễ thu nhận, độ tương thích sinh học cao, và khả năng mang chất điều trị. Chúng đã được ứng dụng trong tái tạo mô, chống viêm và phục hồi tổn thương [5].

Curcumin, một polyphenol chiết xuất từ nghệ (*Curcuma longa*), đã được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, kháng viêm, bảo vệ gan, và chống ung thư [6]. Curcumin có thể tương tác với nhiều phân tử đích, bao gồm thụ thể aryl hydrocarbon receptor (AhR) – một yếu tố phiên mã cảm ứng bởi ligand, tham gia điều hòa chuyển hóa ngoại sinh, miễn dịch và sinh ung [7]. Khi được hoạt hóa, AhR chuyển vào nhân, tạo dị hợp với ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), rồi gắn vào vùng XRE (xenobiotic/dioxin responsive DNA elements) trên DNA để kích hoạt các gen mục tiêu như *Cyp1a1* và *Cyp1b1* [8]. Đặc biệt thú vị, curcumin có thể đóng vai trò chất chủ vận hoặc đối vận của AhR tùy theo điều kiện tế bào [7]. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá tác động riêng lẻ và phối hợp của ADSC-EVs và curcumin lên khả năng sống và trực tín hiệu AhR trong dòng tế bào báo cáo CAFLUX-HepG2 – một mô hình theo dõi tín hiệu AhR theo thời gian thực.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nuôi cấy tế bào

Tế bào ADSC PT-5006 (Lonza, Mỹ) được nuôi trong môi trường DMEM/F12 (PAN-Biotech, Đức) bổ sung 10% huyết thanh bò (FBS, Sigma-Aldrich, Đức), 1 μ l/ml yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi (FGF, Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và 1% dung dịch penicillin-streptomycin (Gibco-Thermo Scientific, Mỹ). Dòng tế bào HepG2 (ATCC) được nuôi trong môi trường DMEM (PAN-Biotech, Đức), bổ sung 10% FBS và 1% penicillin-streptomycin. Tất cả các dòng tế bào được nuôi trong tủ ấm ẩm có CO₂ 5% ở 37°C. Hình thái tế bào ADSC được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược (Optika, Ý).

2.2. Thu nhận và phân tích túi ngoại bào EVs [9]

Khi các tế bào ADSC đạt độ phủ 80–90%, môi trường nuôi cấy được loại bỏ và thay thế bằng môi trường DMEM/F12 mới, có bổ sung FGF nhưng không chứa FBS. Tế bào tiếp tục được ủ ở 37°C với 5% CO₂ trong 24 giờ. Môi trường thu được sau ủ chứa các EVs tiết ra từ ADSC. Phân bố kích thước hạt trong mẫu được phân tích bằng kỹ thuật phân tích theo dõi hạt nano (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA), sử dụng thiết bị ZetaView PMX-230-S-488/660 (Particle Metrix, Đức).

2.3. Thử nghiệm biểu hiện huỳnh quang cảm ứng hóa học (CAFLUX assay)

Thử nghiệm CAFLUX được thực hiện trên dòng tế bào chuyển gen ổn định biểu hiện protein huỳnh quang (Enhanced Green Fluorescent Protein - EGFP) dưới sự điều khiển của promoter tổng

hợp chứa XRE. Tế bào CAFLUX-HepG2 được cấy vào đĩa 96 giếng (2×10^4 tế bào/giếng) và được sử dụng cho hai thí nghiệm:

- Thí nghiệm 1: Nuôi tế bào trong các nồng độ EVs khác nhau (0%, 10%, 20%, 40%, 60% và 80% trong môi trường DMEM), so sánh với nhóm đối chứng được nuôi trong DMEM bổ sung DMEM/F12 với nồng độ tương ứng (0%–80%).
- Thí nghiệm 2: Curcumin được hòa tan trong DMSO, sau đó bổ sung vào môi trường nuôi tế bào với các nồng độ lần lượt là 0, 5, 10, 15, 20, 30 và 40 $\mu\text{g/ml}$. Tế bào được ủ trong 24 giờ, đảm bảo nồng độ DMSO cuối cùng không vượt quá 0,1%.

Sau thời gian ủ, cường độ huỳnh quang được đo bằng đầu đọc đa chức năng Biotek Synergy HT (Marshall Scientific, Mỹ). Đơn vị huỳnh quang tương đối (RFU) được chuẩn hóa so với nhóm đối chứng dung môi.

2.4. Thử nghiệm đánh giá khả năng sống tế bào (MTT assay)

Sau thời gian xử lý, khả năng sống của tế bào được đánh giá bằng phép thử MTT (Methylthiazol Tetrazolium) [10]. Đầu đọc Biotek Synergy HT được sử dụng để đo mật độ quang học (OD) tại bước sóng 570 nm theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5. Phân tích biểu hiện gen

Tế bào CAFLUX-HepG2 sau xử lý với ADSC-EVs và curcumin được phân tích biểu hiện các gen liên quan đến trục tín hiệu AhR gồm: *Cyp1a1* và *Cyp1b1*. RNA được tách chiết bằng bộ Easy – Blue™ Total RNA Extraction (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc), sau đó tổng hợp cDNA bằng bộ Maxime™ RT PreMix (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Biểu hiện gen được định lượng theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta CT}$ bằng máy Real-time PCR MyGo Pro (QuantaBio, Mỹ). Gen *GAPDH* được sử dụng làm đối chứng nội tại để chuẩn hóa dữ liệu [10]. Trình tự mỗi vùng trong RT-qPCR được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mỗi vùng sử dụng trong RT-qPCR

Mỗi	Trình tự (5'-3')	Kích thước (bp)
Cyp1a1	F: GATTGAGCACTGTCAGGAGAAGC	138 bp [11]
	R: ATGAGGCTCCAGGAGATAGCAG	
Cyp1b1	F: GCCACTATCACTGACATCTTCGG	129 bp [12]
	R: CACGACCTGATCCAATTCTGCC	
GAPDH	F: TTGTCTCACTTGTTCTCT	87 bp [10]
	R: ATGGGAGTTGTTTTCTTG	

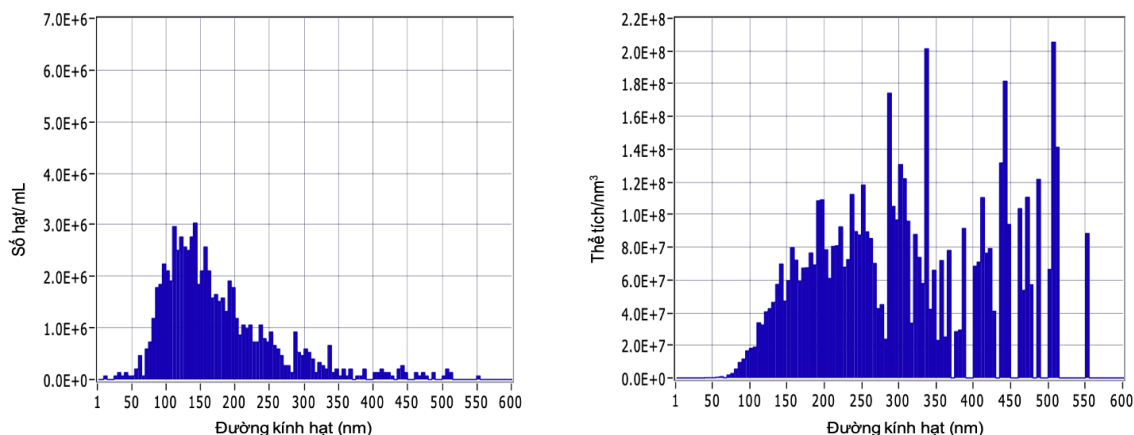
2.6. Phân tích thống kê

Các dữ liệu thí nghiệm được phân tích bằng phần mềm Excell. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm được xác định bằng phép phân tích phương sai một chiều (ANOVA). Giá trị $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê. Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình của ba thí nghiệm độc lập, với thanh sai số biểu thị sai số chuẩn của trung bình.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định đặc tính của túi ngoại bào EVs từ tế bào gốc mỡ ADSC

Các túi ngoại bào thu được từ môi trường nuôi cấy điều kiện của tế bào ADSC đã được phân tích về phân bố kích thước bằng kỹ thuật theo dõi hạt nano (NTA) (Hình 1). Kết quả cho thấy các hạt có đường kính dao động từ 20 nm đến 400 nm, với đỉnh phân bố chủ yếu nằm trong khoảng 100–150 nm. Trong đó, 83,5% mẫu bao gồm các hạt có kích thước xấp xỉ 133,0 nm với nồng độ $1,8 \times 10^6$ hạt/mL. Phân tích NTA cũng phát hiện một số hạt có kích thước vượt quá 300 nm, nhiều khả năng do hiện tượng kết tụ.

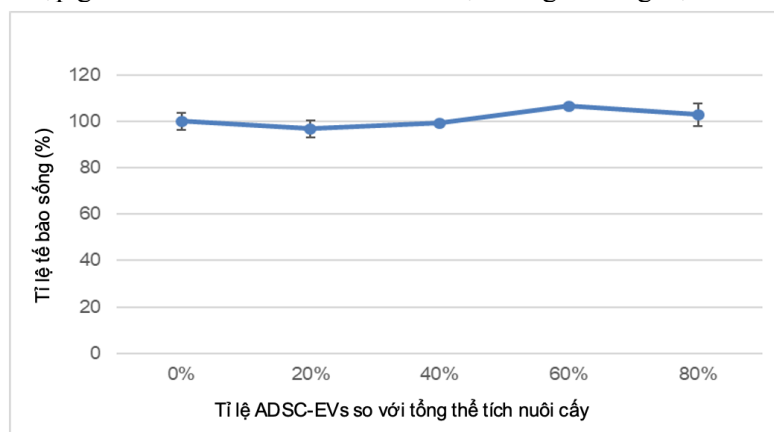


Hình 1. Đặc điểm của EVs-ADSC – Kết quả phân tích NTA. Biểu đồ thể hiện kích thước các hạt dao động từ 50 nm đến 300 nm, với đỉnh phân bố chủ yếu nằm trong khoảng từ 100 nm đến 150 nm

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của EVs-ADSC lên sự tăng sinh của tế bào HepG2

Các nghiên cứu cho thấy EVs-ADSC không gây ra tác động đáng kể trong việc thúc đẩy hay ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư gan CAFLUX-HepG2 (Hình 2). Một sự ức chế nhẹ hoặc tăng nhẹ sự tăng sinh của tế bào được ghi nhận tại các nồng độ EVs lần lượt là 20% và 60%; tuy nhiên, những thay đổi này không có ý nghĩa thống kê. Do đó, không ghi nhận được tác động gây độc tế bào hay kích thích phân chia tế bào rõ rệt trong điều kiện thí nghiệm.

Tại nồng độ EVs cao hơn, khả năng ức chế của EVs đối với tế bào HepG2 giảm dần và gần như không đáng kể ở mức 80%, khi mà tỷ lệ sống của tế bào ở nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng gần như tương đương. Để đánh giá khách quan hơn tác động của EVs-ADSC lên khả năng sống của tế bào CAFLUX-HepG2, nồng độ EVs 40% đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm khảo sát hiệu quả phối hợp giữa curcumin và EVs lên biểu hiện các gen trong trực tin hiệu AhR.

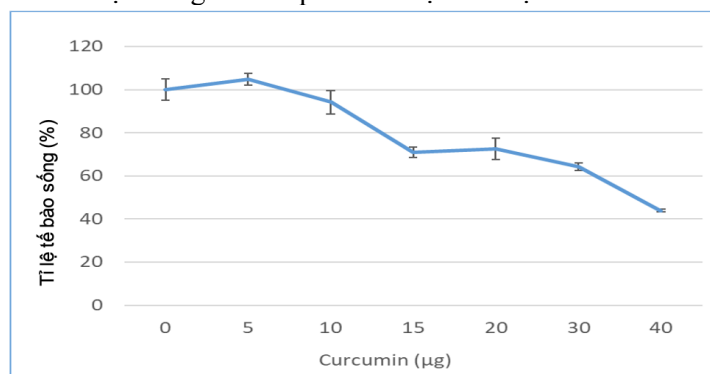


Hình 2. Ảnh hưởng của EVs-ADSC ở các nồng độ khác nhau (0–80%) lên sự tăng sinh của tế bào CAFLUX-HepG2

3.3. Tác động của curcumin đến khả năng sống của tế bào CAFLUX-HepG2

Kết quả nghiên cứu tác động của curcumin đến khả năng sống sót của tế bào CAFLUX-HepG2 được thể hiện trong Hình 3, cho thấy khả năng sống của tế bào giảm phụ thuộc vào liều lượng curcumin. Ở các nồng độ thấp (0–10 $\mu\text{g/ml}$), tỷ lệ sống của tế bào vẫn duy trì trên 90%, cho thấy curcumin hầu như không gây độc tế bào ở mức thấp. Tuy nhiên, từ nồng độ 10 $\mu\text{g/ml}$ trở lên, tỷ lệ sống giảm rõ rệt, chỉ còn hơn 40% ở nồng độ cao nhất (40 $\mu\text{g/ml}$).

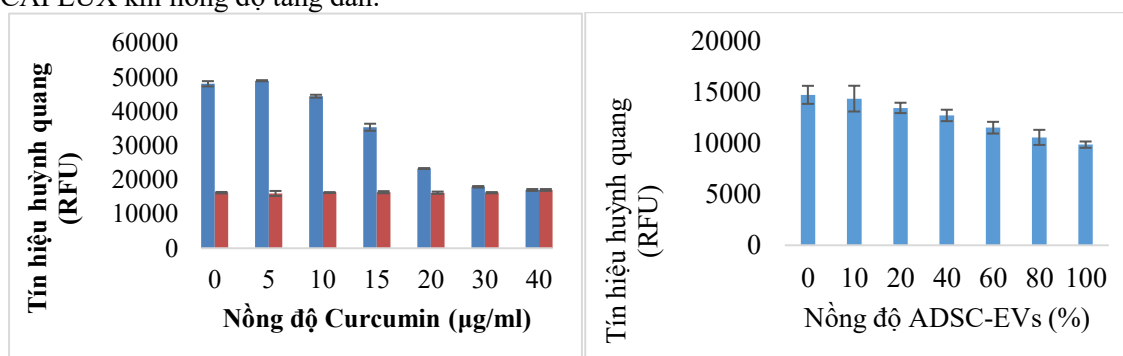
Curcumin có giá trị ức chế tăng trưởng 50% (IC50) là $37,00 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$. Giá trị IC50 này thể hiện curcumin có tác dụng gây độc đáng kể lên tế bào CAFLUX-HepG2 ở liều cao. Để đảm bảo đánh giá khách quan ảnh hưởng của curcumin đến khả năng sống của tế bào, nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$ curcumin đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm khảo sát tác động phối hợp giữa curcumin và EVs lên biểu hiện các gen liên quan đến trục tín hiệu AhR.



Hình 3. Tác động của curcumin đến khả năng sống của tế bào CAFLUX-HepG2

3.4. Kết quả thử nghiệm CAFLUX

Biểu đồ Hình 4 cho thấy sau 24h tín hiệu huỳnh quang của dòng tế bào báo cáo CAFLUX giảm dần theo nồng độ curcumin. Ở điều kiện không xử lý curcumin (Cur 0), tín hiệu huỳnh quang đạt mức cao nhất (~52.000 RFU). Khi tăng dần nồng độ curcumin từ 5 đến 40 $\mu\text{g/mL}$, tín hiệu huỳnh quang giảm mạnh, đặc biệt từ nồng độ 15 $\mu\text{g/mL}$ trở đi. Tại nồng độ 30–40 $\mu\text{g/mL}$, tín hiệu huỳnh quang gần như chạm ngưỡng nền (~17.000 RFU), tương đương nhóm không cảm ứng tín hiệu AhR. Kết quả này cho thấy curcumin ức chế mạnh tín hiệu AhR theo kiểu phụ thuộc nồng độ trên dòng tế bào CAFLUX. Tương tự, các ADSC-EVs cũng làm giảm tín hiệu huỳnh quang ở tế bào CAFLUX khi nồng độ tăng dần.



Hình 4. Ảnh hưởng của curcumin và ADSC-EVs ở các nồng độ khác nhau đến tín hiệu huỳnh quang của tế bào CAFLUX-HepG2

3.5. Biến đổi biểu hiện gen trong trục tín hiệu AhR của tế bào CAFLUX-HepG2 sau xử lý với ADSC-EVs và curcumin

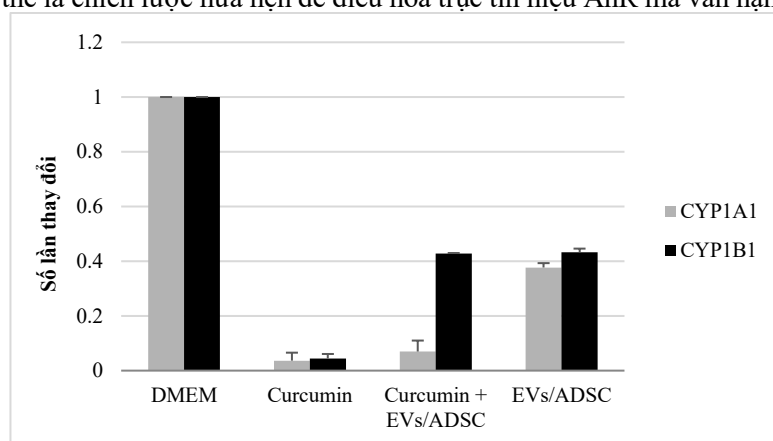
Phản ứng PCR định lượng (qPCR) đã được thực hiện để đánh giá mức độ biểu hiện của hai gen chủ chốt trong trục tín hiệu AhR gồm: *Cyp1a1* và *Cyp1b1* dưới tác động của ADSC-EVs và curcumin.

Biểu đồ Hình 5 cho thấy cả curcumin (Cur) và EVs có hiệu quả ức chế rõ rệt đối với biểu hiện của *Cyp1a1* và *Cyp1b1*, tuy nhiên Cur có khả năng ức chế 2 gen mạnh hơn ở mức mRNA so với EVs. Mặc dù cả hai loại xử lý đều thể hiện tác dụng ức chế đối với các gen này, nhưng tế bào CAFLUX-HepG2 được xử lý đồng thời bằng curcumin và ADSC-EVs cho thấy mức độ ức

chế *Cyp1a1* mạnh hơn đáng kể so với nhóm chỉ xử lý bằng EVs và kém hơn nhóm chỉ có Cur. Như vậy khả năng các ADSC-EVs đã làm giảm tác dụng của các Cur.

3.6. Thảo luận

Kết quả cho thấy ADSC-EVs không gây độc tế bào trên dải nồng độ rộng, khẳng định tính tương thích sinh học cao. Ngược lại, curcumin làm giảm mạnh khả năng sống của tế bào CAFLUX-HepG2 theo cách phụ thuộc liều, đặc biệt từ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trở lên. Do đó, việc phối hợp curcumin liều thấp và ADSC-EVs có thể là chiến lược hứa hẹn để điều hòa trực tiếp hiệu AhR mà vẫn hạn chế độc tính.



Hình 5. So sánh biểu hiện các gen liên quan đến trực tiếp hiệu AhR trong tế bào CAFLUX-HepG2 có và không xử lý với ADSC-EVs và curcumin sau 24 giờ

Thử nghiệm CAFLUX xác nhận curcumin và ADSC-EVs ức chế con đường AhR, thể hiện qua giảm huỳnh quang EGFP và giảm biểu hiện gen *Cyp1a1* và *Cyp1b1*. Curcumin có thể hoạt hóa AhR bằng cách ức chế enzyme *Cyp1a1* – vận chuyển hóa chất hoạt hóa tự nhiên 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)– hoặc tăng các chất cảm ứng nội sinh như kynurenine và kynurenic acid [7]. ADSC-EVs cũng góp phần điều hòa con đường AhR, có thể thông qua miRNA điều hòa các trực tiếp hiệu như Wnt, NF- κ B, TGF- β [13].

Đáng chú ý, curcumin và ADSC-EVs ức chế *Cyp1a1* và *Cyp1b1* – đặc biệt là *Cyp1a1* khi phối hợp cả hai tác nhân. Điều này cho thấy cơ chế điều hòa chọn lọc kiểu SAhRM, đồng thời gợi ý khả năng ức chế gen sinh ung quan trọng của nhóm cytochrome P450 [14]. Biểu hiện giảm của *Cyp1a1* có thể do tác động epigenetic như methyl hóa promoter, tương tác histone hoặc tuyển chọn yếu tố đồng hoạt hóa [14].

Tóm lại, ADSC-EVs có thể điều hòa tác dụng của curcumin trên trực AhR, đặc biệt ở mức độ phiên mã gen đích. Cần thêm các nghiên cứu về cơ chế biểu sinh (methyl hóa DNA, sửa đổi histone, vai trò miRNA) để làm rõ cách thức phối hợp curcumin–EVs nhằm tối ưu hiệu quả điều trị HCC.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã chứng minh rằng EVs từ tế bào gốc mô mỡ người có độ tương thích sinh học cao và không gây độc lên dòng tế bào CAFLUX-HepG2 trong dải nồng độ rộng. Curcumin thể hiện tác dụng ức chế trực tiếp hiệu AhR, đồng thời ức chế biểu hiện các gen đích *Cyp1a1* và *Cyp1b1*, đặc biệt khi kết hợp với ADSC-EVs. Hiệu ứng phối hợp giữa ADSC-EVs và curcumin trong ức chế gen *Cyp1a1* – một enzyme liên quan đến sinh ung thư cho thấy tiềm năng ứng dụng của chiến lược kết hợp này trong điều trị ung thư biểu mô tế bào gan. Tuy nhiên, cơ chế điều hòa biểu hiện gen theo hướng chọn lọc vẫn cần được làm rõ qua các nghiên cứu sâu hơn về biến đổi biểu sinh, methyl hóa promoter, và vai trò của các miRNA trong trực tiếp hiệu AhR.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) [mã số đề tài TĐDIOX.04/22-24].

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] A. Forner, M. Reig, and J. Bruix, "Hepatocellular carcinoma," *Lancet*, vol. 391, no. 10127, pp. 1301-1314, 2018.
- [2] M. S. Grandhi, A. K. Kim, S. M. Ronnekleiv-Kelly, I. R. Kamel, M. A. Ghasebeh, and T. M. Pawlik, "Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment," *Surgical Oncology*, vol. 25, no. 2, pp. 74-85, 2016.
- [3] S. M. Ridge, F. J. Sullivan, and S. A. Glynn, "Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression," *Molecular Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 31-40, 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0597-8.
- [4] E. Karnas, P. Dudek, and E. K. Zuba-Surma, "Stem cell-derived extracellular vesicles as new tools in regenerative medicine – Immunomodulatory role and future perspectives," *Frontiers in Immunology*, vol. 14, 2023, Art. no. 1120175, doi: 10.3389/fimmu.2023.1120175.
- [5] J. Chen, Y. Xu, X. Wang, Y. Ge, C. Zhang, and Y. Li, "Adipose stem cells-released extracellular vesicles as a next-generation cargo delivery vehicles: a survey of minimal information implementation, mass production and functional modification," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 13, no. 1, p. 182-198, 2022, doi: 10.1186/s13287-022-02849-5.
- [6] C. S. Divya and M. R. Pillai, "Antitumor action of curcumin in human papillomavirus-associated cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFκB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis," *Molecular Carcinogenesis*, vol. 45, no. 5, pp. 320-332, 2006.
- [7] A. Mohammadi-Bardbori, A. R. Akbarizadeh, N. Delirez, and A. Rannug, "Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR)," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 25, no. 9, pp. 1878-1884, 2012.
- [8] C. Rejano-Gordillo, A. Álvarez-Barrientos, J. Barroso-González, R. S. Rosales, and S. Mulero-Navarro, "Aryl hydrocarbon receptor: From homeostasis to tumor progression," *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 10, 2022, Art. no. 884004.
- [9] G. Kowkabany and Y. Bao, "Nanoparticle Tracking Analysis: An Effective Tool to Characterize Extracellular Vesicles," *Molecules*, vol. 29, no. 19, 2024, Art. no. 4672.
- [10] H. T. La, D. B. T. Tran, H. M. Tran, and L. T. Nguyen, "Third-Generation Anti-CD47-Specific CAR-T Cells Effectively Kill Cancer Cells and Reduce the Genes Expression in Lung Cancer Cell Metastasis," *Journal of Immunology Research*, vol. 2021, 2021, Art. no. 5575260, doi: 10.1155/2021/5575260.
- [11] Y. Liu, L. Ouyang, C. Mao, Y. Chen, N. Liu, L. Chen, Y. Shi, D. Xiao, S. Liu, and Y. Tao, "Inhibition of RNF182 mediated by Bap promotes non-small cell lung cancer progression," *Frontiers in Oncology*, vol. 12, 2023, Art. no. 1009508, doi: 10.3389/fonc.2022.1009508.
- [12] C. Li, D. B. Allison, D. He, F. Mao, X. Wang, P. Rychahou, I. A. Imam, Y. Kong, Q. Zhang, Y. Zhang, J. Liu, R. Wang, X. Rao, S. Wu, Q. Shao, C. Wang, Z. Li, and X. Liu, "Phosphorylation of AHR by PLK1 promotes metastasis of LUAD via DIO2-TH signaling," *PLoS Genetics*, vol. 19, no. 11, 2023, Art. no. e1011017, doi: 10.1371/journal.pgen.1011017.
- [13] B. Ahrabi, Z. Farzaneh, R. Heidari, M. Khaledi, and F. Fathi, "Autophagy-induced mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorated renal fibrosis in an in vitro model," *Bioimpacts*, vol. 13, no. 5, pp. 359-372, 2023.
- [14] S. R. Beedanagari, R. T. Taylor, P. Bui, F. Wang, D. W. Nickerson, and O. Hankinson, "Role of epigenetic mechanisms in differential regulation of the dioxin-inducible human CYP1A1 and CYP1B1 genes," *Molecular Pharmacology*, vol. 78, no. 4, pp. 608-616, 2010.