Tạp chí Công nghệ Sinh học 5(2): 157-161, 2007

XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA INTERLEUKIN-2 (IL-2) TÁI TỔ HỢP BẰNG PHÉP THỬ SINH HỌC TRÊN TẾ BÀO CTLL2

Đỗ Thị Thảo, Đỗ Thị Phương, Vũ Minh Đức, Đặng Trần Hoàng, Trương Nam Hải

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Là một cytokine do tế bào lympho T của hệ miễn dịch tổng hợp nên, Interleukin-2 (IL-2) hiện được sử dụng nhiều trong y học. Một trong những ứng dụng quan trọng nhất của IL-2 là để chữa trị một số loại bệnh ung thư. Nhờ vào công nghệ gen hiện đại, hiện đã có những sản phẩm IL-2 tái tổ hợp với chất lượng tốt và bán dưới dạng thương phẩm. Để xác định hoạt tính của các sản phẩm IL-2 nghiên cứu, dòng tế bào CTLL2 do Ngân hàng tế bào ATCC của Hoa Kỳ cung cấp đã được lựa chọn. Tế bào CTLL2 là tế bào hoàn toàn phụ thuộc vào IL-2 để có thể sống và phát triển. Hoạt tính của các mẫu IL-2 nghiên cứu sẽ được xác định nhờ vào khả năng kích hoạt sự phát triển và sinh sản của tế bào CTLL2. Nhờ phép thử sinh học được xác lập dựa vào đặc tính nói trên của tế bào CTLL2, sau quá trình sàng lọc ban đầu 15 mẫu IL-2 tái tổ hợp, chúng tôi đã thu được 03 mẫu có hoạt tính sinh học cao nhất và tiến hành xác định các chỉ số sinh học khác. Kết quả là mẫu số 3 của chúng tôi chứa đựng hoạt tính sinh học cao nhất đạt 2,7 $\times 10^6$ Units/mg và gần tương đương với hoạt tính của thương phẩm IL-2 của Trung Quốc đang dược lưu hành (2,9 $\times 10^6$ Units/mg), nhưng vẫn thấp hơn so với sản phẩm này của Hoa Kỳ (2 $\times 10^7$ Units/mg).

Từ khóa: *CTLL2, cytokine, Interleukin-2, macrophage, melanoma*

MỞ ĐẦU

Interleukin 2 (IL-2) là một cytokine do các tế bào lympho T hoạt hóa tổng hợp nên (Gill *et al.*, 1978). IL-2 kích thích sự sinh sôi của các tế bào lympho T phụ thuộc IL-2 và đóng vai trò như một chất điều hoà miễn dịch đối với các tế bào lympho B, macrophages và các tế bào giết tự nhiên NK (natural killer cells) (Taniguchi *et al.*, 1986). IL-2 thực hiện chức năng sinh lý của mình thông qua sự tương tác hoạt động với các phức hợp thụ cảm được tạo ra từ ba tiểu phần α, β và γ (IL-2Rα, -β và -γ). Rất nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng IL-2 đóng vai trò rất quan trọng đối với hệ miễn dịch nói riêng và đối với sự sống của con người nói chung. Một trong số này là IL-2 có khả năng kích thích sự sinh sôi, biệt hóa và tồn tại của các tế bào lympho T độc nhận biết kháng nguyên đặc thù (antigen-selected cytotoxic T cells) thông qua việc hoạt hóa biểu hiện của một số gen đặc trưng (Nelson, Willerford, 1998). IL-2 rất cần thiết cho sự hình thành trí nhớ miễn dịch của các tế bào T, một trong những đặc tính quan trọng và đặc trưng của hệ miễn dịch. Lợi dụng đặc tính này của IL-2, hiện tại một số hãng dược phẩm danh tiếng như NOVATIS đã sản xuất thành công IL-2 tái tổ hợp để sử dụng trong chữa trị một số loại bệnh ung thư (ung thư thận, ung thư melanoma ...) (McDermott, Atkins, 2004). Ngoài ra, IL-2 cũng đã được Cục Quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ FDA cho phép sử dụng trong chữa trị một số bệnh lây nhiễm do virus, như chất kích hoạt trong vaccince (booster)... (http://www.ebioscience.com).

Trong thông báo trước đây, chúng tôi đã trình bày kết quả tổng hợp thành công IL-2 tái tổ hợp trong *E. coli* (Đặng Trần Hoàng *et al.*, 2005). Trong thông báo này, chúng tôi trình bày kết quả kiểm tra hoạt tính sinh học của sản phẩm IL-2 tái tổ hợp trên tế bào CTLL2 phụ thuộc IL-2 và thiết lập phép thử sinh học mong muốn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp tinh chế IL-2 tái tổ hợp

IL-2 tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực Ni (Amersham Pharmacia Biotech.). Đầu tiên, dịch protein được cho qua cột sắc kí đã được hoạt hóa bằng đệm cân bằng (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5). Thành phần protein không bám bị loại khỏi cột bằng đệm rửa (5 mM Imidazole, 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5). Protein IL2-Trx gắn trên cột ái lực được thu lại bằng đệm cân bằng có chứa 500 mM Imidazole. Tiến hành cắt protein dung hợp IL2-Trx bằng enterokinase (4°C

trong 16 h với đệm Tris-HCl, pH 8,0) để thu lại IL-2 tinh sạch. Dịch protein tinh sạch được cho qua cột Hiprep Chelating 26/10 (Amersham Pharmacia Biotech.) để loại bỏ muối. Kiểm tra độ sạch của IL-2 tái tổ hợp trên bằng SDS-PAGE 12.6%.

Phương pháp nuôi cấy tế bào CTLL2 *in vitro*

Tế bào CTLL2 được mua từ Ngân hàng tế bào của Hoa Kỳ ATCC nhờ sự giúp đỡ của GS. Pezzuto, Hiệu trưởng Đại học Hawaii, Hoa Kỳ. Tế bào CTLL2 được nuôi cấy dưới dạng hỗn dịch trong môi trường nuôi cấy RPMI-1640 kèm theo 2 mM L-glutamine, 1,5 g/l sodium bicarbonate, 4,5 g/l glucose, 10 mM HEPES, và 1,0 mM sodium pyruvate, ngoài ra bổ sung 20% T-STIM Con A và 10% fetal bovine serum - FBS (GIBCO). Tế bào được cấy chuyển sau 3 - 5 ngày với tỷ lệ (1:3) và nuôi trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2.

Phép thử sinh học xác định hoạt tính của IL-2 tái tổ hợp

Nguyên lý của phép thử sinh học

Tế bào CTLL-2 là tế bào hoàn toàn phụ thuộc vào IL-2. Khi môi trường nuôi cấy không được bổ sung IL-2 thì tế bào sẽ chết trong khoảng 24 - 48 h. Vì thế, dòng tế bào CTLL2 được xem là dòng chuẩn để xác định hoạt tính của IL-2 tự nhiên cũng như tổng hợp. Khi bổ sung IL-2 vào môi trường nuôi cấy, tuỳ theo hoạt tính của IL-2 mà tế bào CTLL2 sẽ duy trì sự sống và được kích hoạt để phát triển và sinh sản. Hoạt tính của IL-2 càng mạnh thì khả năng hoạt hóa sự phát triển và sinh sản của tế bào CTLL2 càng tốt. Dựa vào nguyên lý trên, khi cần xác định hoạt tính của mẫu IL-2 nào đó thì chỉ cần xác định khả năng hoạt hóa tế bào CTLL2 của mẫu nghiên cứu so với đối chứng âm (không được bổ sung IL-2 vào môi trường nuôi cấy).

Quy trình của phép thử sinh học:

Các mẫu IL-2 tái tổ hợp trước khi đưa vào hệ thống sàng lọc để kiểm tra bằng phép thử sinh học được lọc khuẩn bằng màng lọc có kích cỡ 0,22 µm. Tiếp đó, các mẫu này được tiến hành pha loãng bằng PBS tiệt trùng để có nồng độ gốc là 0,1 mg/ml. Các mẫu sẽ được sàng lọc ban đầu ở nồng độ là 10 µg/ml. Hai mẫu IL-2 của Trung Quốc và Hoa Kỳ sẽ được sử dụng làm đối chứng dương.

Mẫu IL-2 của Trung Quốc được ghi nhận là sản phẩm thương mại chứa đựng 1 mg IL-2 và hoạt tính là $2,9 \times 10^6$ Units/mg. Trong khi đó, mẫu IL-2 của Hoa Kỳ cũng được ghi nhận là sản phẩm thương mại hóa nhưng chỉ sử dụng cho nghiên cứu khoa học. Hàm lượng IL-2 của mẫu này là 50 µg và hoạt tính là $2,5 \times 10^7$ Units/mg.

Hai ngày sau lần cấy chuyển cuối cùng, tế bào CTLL2 được rửa sạch 3 lần bằng môi trường RPMI-1640 cơ bản (không có huyết thanh và không có IL-2). Tế bào tiếp tục được hòa trong môi trường RPMI-1640 với nồng độ 1×10^5 tế bào/ml và được đưa vào đĩa 96 giếng để thí nghiệm (190 µl/giếng). Tiếp tục bổ sung các mẫu IL-2 cần kiểm tra vào các giếng thí nghiệm với các nồng độ khác nhau. Tỷ lệ lặp lại thí nghiệm là 3 lần. Trong đó, các giếng đối chứng âm chỉ có tế bào và môi trường nuôi cấy cơ bản có bổ sung huyết thanh, không có IL-2. Đĩa thí nghiệm được tiếp tục ủ trong tủ ấm CO_2 ở điều kiện 37°C, 5% CO_2. Sau 48 h, thí nghiệm được kết thúc bằng cách thêm vào mỗi giếng 30 µl dung dịch thuốc nhuộm từ bộ kit Non-radioactive proliferation kit của Promega để định tính và định lượng mẫu IL-2 tái tổ hợp. ủ tiếp trong bóng tối thêm 4 h và đọc kết quả bằng máy ELISA reader bước sóng 525 nm (Fukushima, Yamashita, 2001).

Sau khi có kết quả đo OD, chỉ số ED_{50} được xác định bằng phần mềm TableCurve. Tiếp đó, chúng tôi tiến hành quy đổi và xác định hoạt tính của mẫu IL-2 kiểm tra theo quy chuẩn quốc tế.

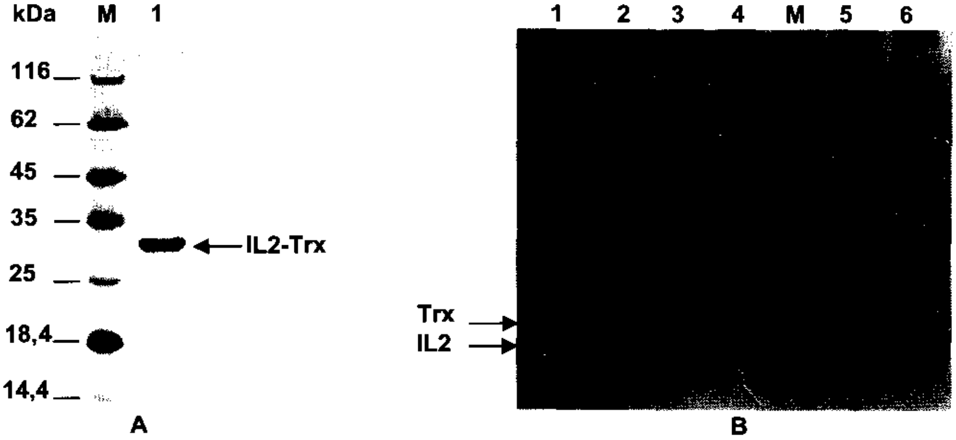
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tinh chế IL-2 tái tổ hợp

IL-2 tái tổ hợp được biểu hiện trong *E. coli* ở dạng lai với thioredoxin có chứa đuôi His-tag gồm 6 Histidine (gọi tắt là protein IL2-Trx). Kết quả kiểm tra các phân đoạn protein tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Ni bằng SDS-PAGE (Hình 1A) cho thấy sản phẩm protein IL2-Trx tương đối sạch, có kích thước khoảng 32,7 kDa, phù hợp với tính toán trên lý thuyết. Tiếp theo, chúng tôi tiến hành cắt protein lai IL2-Trx bằng enterokinase (điều kiện cắt được nêu trong phần phương pháp). Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 1B) cho thấy, với thời gian cắt là 16 h thì protein lai đã bị cắt thành 2 phần là IL-2 tái tổ hợp và thioredoxin.

Tuy nhiên, trong sản phẩm cắt vẫn còn băng protein IL2-Trx. Để phản ứng cắt diễn ra hoàn toàn, chúng tôi cần nghiên cứu tối ưu các điều kiện cho phản ứng cắt enterokinase. Dịch cắt protein tiếp tục được cho qua cột Hiprep Chelating 26/10 (Amersham Pharmacia Biotech.) để loại bỏ

muối và thu lại IL-2 tinh sạch. Đặc điểm của cột Hiprep Chelating là có chứa các hạt gel làm bằng sepharose với kích thước lỗ khác nhau cho phép các protein nhỏ đi qua. Do vậy, các phân tử muối và thioredoxin có kích thước lớn hơn sẽ chảy ra trước còn các phân tử IL-2 tái tổ hợp có kích thước nhỏ sẽ đi qua lỗ hạt gel và chảy ra sau. Đường chạy 6B cho thấy xuất hiện một băng protein có kích thước xấp xỉ 14,6 kDa phù hợp với kích thước chuẩn của IL-2. Như vậy, chúng tôi đã tinh sạch thành công IL-2 tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli*.



Hình 1. Điện di SDS-PAGE sản phẩm tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực (A) và cắt protein lai IL2-Trx bằng Enterokinase (B). M: Thang protein chuẩn (Fermentas); 1A: IL2-Trx tinh sạch bằng cột ái lực Ni ; 1B-4B: Cắt IL2-Trx bằng Enterokinase; 6B: IL2 tái tổ hợp tinh sạch.

Xác định hoạt tính sinh học của các mẫu IL-2 tái tổ hợp

Sau khi sàng lọc từ 15 mẫu IL-2 tái tổ hợp được tổng hợp trong tế bào *E. coli* và tinh chế bằng sắc kí ái lực, chúng tôi đã lựa chọn ra 3 mẫu có hoạt tính tốt nhất để tiến hành thí nghiệm tiếp nhằm định tính và định lượng hoạt tính sinh học của chúng. Với việc sử dụng tế bào CTLL2 phụ thuộc IL-2 trong phép thử sinh học do chúng tôi thiết lập, 03 mẫu IL-2 được kiểm tra và so sánh với sản phẩm IL-2 của Trung Quốc và Hoa Kỳ. Các dữ liệu được trình bày và minh họa ở bảng 1 và hình 2.

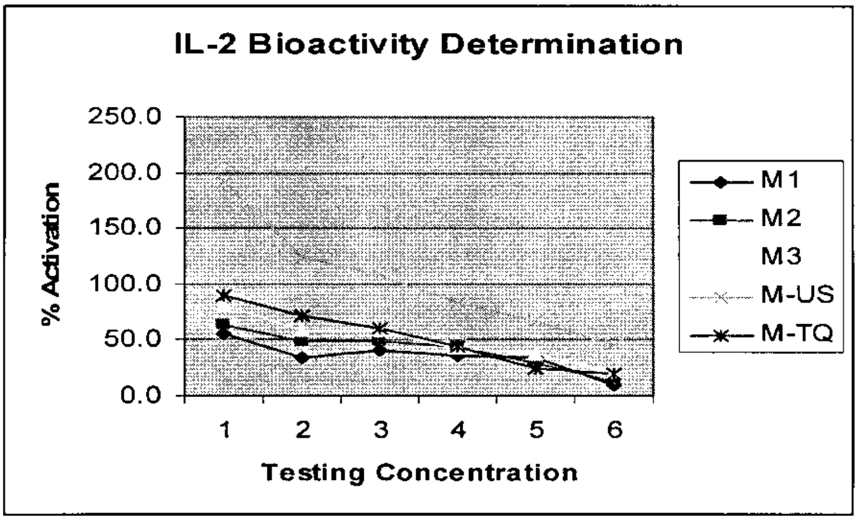
Kết quả thí nghiệm cho thấy, cả 5 mẫu thử đều có khả năng hoạt hóa và duy trì sự sống cho tế bào CTLL2. Mẫu thí nghiệm từ Hoa Kỳ cho thấy hoạt tính cao nhất và khả năng hoạt hóa lên tới 191% (gấp 1,91 lần) so với đối chứng âm (không được bổ sung IL-2 vào môi trường nuôi cấy). Ba mẫu M1, M2 và M3 do chúng tôi tổng hợp có hoạt tính tốt, khả năng hoạt hóa tế bào CTLL2 đạt tương ứng 55,9, 64,4 và 81,6%. Khả năng hoạt hóa này cho thấy các mẫu nghiên cứu đã duy trì và tăng sinh đối với tế bào CTLL2 phụ thuộc IL-2. Hoạt tính của 3 mẫu nghiên cứu là thấp hơn so với mẫu của Hoa Kỳ và gần tương đương với thương phẩm IL-2 của Trung Quốc. Trong số 03 mẫu IL-2 này, mẫu số 3 có hoạt tính tốt nhất. Mẫu số 1 có hoạt tính thấp nhất. Mẫu số 2 có hoạt tính tương đối tốt nhưng thấp hơn 1,6 lần so với mẫu số 3.

Với kết quả thu được ở trên, chúng tôi đã tiến hành quy đổi và xác định đơn vị hoạt tính cho các mẫu thí nghiệm theo quy chuẩn quốc tế. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

So sánh kết quả trên, chúng tôi nhận thấy đơn vị hoạt tính Unit của các mẫu IL-2 là tương đối tốt. Mẫu của Hoa Kỳ đạt tới 2×10^7 Units/mg và là mẫu có hoạt tính tốt nhất. Mẫu số 1 (M1) của chúng tôi có hoạt tính thấp nhất trong số các mẫu nghiên cứu đạt $5{,}2 \times 10^5$ Units/mg. Mẫu số 3 (M3) do chúng tôi sản xuất đạt hoạt tính cao nhất $2{,}7 \times 10^6$ Units/mg, gần tương đương với thương phẩm IL-2 đang được bán trên thị trường Trung Quốc là $2{,}9 \times 10^6$ Units/mg.

Bảng 1. Dữ liệu kiểm tra hoạt tính của các mẫu IL-2 tái tổ hợp.

Tên mẫu	% Hoạt hóa tế bào CTLL2					Giá trị ED_{50} (μg/ml)
	2 μg/ml	1 μg/ml	0,5 μg/ml	0,25 μg/ml	0,125 μg/ml	
M1	55,9	35,1	41.2	35.6	34,0	1,913
M2	64,4	49,7	49,2	44,4	29,8	0,590
M3	81,6	59,1	58,3	42,7	36,9	0,373
M-TQ	90,7	72,5	60,9	43,4	24,2	0,352
M-US	191,2	124,5	107,6	83,8	66,9	0,052



Hình 2. Xác định và so sánh hoạt tính của các mẫu IL-2 thử nghiệm.

Bảng 2. Đơn vị hoạt tính của các mẫu IL-2 thử nghiệm.

STT	Tên mẫu	Giá trị ED_{50} (μg/ml)	Giá trị quy đổi (Units/mg)
1	**M1**	1,913	$5,2 \times 10^5$
2	**M2**	0,590	$1,7 \times 10^6$
3	**M3**	0,352	$2,7 \times 10^6$
4	**M-TQ**	0,373	$2,9 \times 10^6$
5	**M-US**	0,052	2×10^7

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tinh sạch và xác định hoạt tính sinh học của chế phẩm IL-2 tái tổ hợp nhận được từ tế bào *E. coli* bằng phép thử sinh học trên tế bào nuôi cấy *in vitro* CTLL2. Kết quả thu được sau quá trình sàng lọc cho thấy các mẫu M1, M2 và M3 đều có hoạt tính sinh học rất tốt, trong đó mẫu số 3 M3 của chúng tôi có hoạt tính tốt nhất đạt $2,7 \times 10^6$ Units/mg. Với kết quả thử nghiệm *in vitro* như trên và với số đơn vị hoạt tính đạt được, mẫu số 3 có thể được xem là đạt tiêu chuẩn để sử dụng trong các bước thử nghiệm *in vivo* và lâm sàng tiếp theo. Kết quả này mở ra khả năng tự sản xuất IL-2 trong nước để phục vụ cho các ứng dụng trong y học sau này.

Lời cảm ơn: *Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS. J.M. Pezzuto, Đại học Hawaii, Hoa Kỳ đã giúp đỡ chúng tôi thực hiện công trình nghiên cứu này. Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của từ đề tài KC-04.33 "Nghiên cứu tạo Interleukin-2 tái tổ hợp dùng trong điều trị ung thư".*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đặng Trần Hoàng, Vũ Minh Đức, Phùng Thu Nguyệt, Trương Nam Hải (2005) Biểu hiện gen interleukin-2 của người rh-IL2MM bị đột biến tại các điểm glycosyl hóa và gốc cysteine 125 trong *Escherichia coli. Tạp chí Công nghệ sinh học* 3(2): 149-154.

Fukushima K, Yamashita K (2001) Interleukin-2 carbonhydrate recognition modulates CTLL-2 cell proliferation. *J Biol Chem* 276(10): 7351-7356.

Gill S, Ferm MM, Ou W, Smith KA (1978) T cell growth factor: Parameters of production and quantitative microassay for activity. *J Immunol* 120: 2027-2032.

http://www.ebioscience.com

McDermott DF, Atkins MB (2004) Application of IL-2 and other cytokines in renal cancer. *Expert Opin Bio Ther* 4(4): 455-468.

Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN (1991) Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol* 11(10): 4895-4902.

Nelson BH, Willerford DM (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70: 1-81.

Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Hatakeyama M, Kashima N, Fuse A, Hamuro J, Nishi-Takaoka C, Yamada G (1986) Molecular analysis of the interleukin-2 system. *Immunol Rev* 92: 121-133.

Vũ Minh Đức, Nguyễn Tiến Minh, Đặng Trần Hoàng, Trần Thị Hường, Nguyễn Hồng Thanh, Phùng Thu Nguyệt, Đinh Duy Kháng, Trương Nam Hải (2005) Gây hồi biến thay thế serine25 thành leucine và biểu hiện protein dung hợp Thioredoxin-rhInterleukin-2 (Trx-rhIL2MN) trong *P. pastoris. Tạp chí Công nghệ Sinh học* 3(4): 445-452.

DETERMINATION OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-2'S ACTIVITY BY EMPLOYING OF THE CELL LINE CTLL2

Do Thi Thao, Do Thi Phuong, Vu Minh Duc, Dang Tran Hoang, Truong Nam Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Produced by T lympho cells of the immunological system, interleukin-2 (IL-2), a cytokine is being used widely in medicine. One of the most popular applications of IL-2 is for cancer treatment. Based on modern gene technique, several recombinant IL-2 products with good quality under different trademarks are manufactured. In order to investigate the bioactivity of IL-2 samples, we selected the CTLL2 cell line purchased from ATCC (American Type Culture Collection) in US. CTLL2 are the cells that completely depend on IL-2 to survive. Based on the ability to maintain and stimulate the CTLL2's growth of studied IL-2 samples, the bioactivity was determined. By applying the bioassay set up with the basement of the above character of CTLL2 cells, we chose 3 samples which showed the most active in our bioassay system for further bioactivity determination after preliminary screening 15 samples. In result, the sample named as M3 possesses the highest activity (2.7×10^6 Units/mg). This activity is equal with that of IL-2 product from China (2.9×10^6 Units/mg) but lower than that of IL-2 product from US (2×10^7 Units/mg).

***Keywords:** CTLL2, cytokine, Interleukin-2, macrophage, melanoma*

* *Author for correspondence:* Tel/Fax: *84-4-7562790;* E-mail: *tnhai@hn.vnn.vn*