BÀI NGHIÊN CỨU

Đánh giá khả năng hướng đích và ức chế tế bào u não *in vitro* của hệ vi bọt mang gen *HSV-TK* và kháng thể kháng VEGFR2 hướng đích

Trần Thị Anh Thơ[1], Nguyễn Phi Toàn[1], Nguyễn Xuân Bắc[1], Đồng Văn Quyền[2], Bùi Khắc Cường[3], Nguyễn Thị Lập[1]*

[1]Trường Đại học Dược Hà Nội

[2] Viện Công nghệ sinh học, Viện hàn lâm khoa học Việt Nam

[3] Học viện Quân y

** Tác giả liên hệ: lapnt@hup.edu.vn*

(Ngày gửi đăng: 25/3/2022 - Ngày duyệt đăng: 25/4/2022)

SUMMARY

Among the non-viral gene vectors, microbubble (MB) arises as a non-viral vector to deliver therapeutic genes with much better efficiency and biosafety. In this study, the brain tumor cell-targeting and inhibition ability in vitro of the HSV-TK gene-loaded VEGFR2-targeted microbubble system (VCMB-pHSV-TK) was evaluated. The results showed that the amount of VCMB-pHSV-TK binding to the edges of U87 glioma cells was the highest compared to CMB-pHSV-TK and MB-pHSV-TK, as controls. Particularly, the cell-targeting efficiency of VCMB-pHSV-TK (99.43 ± 0.32 %) was much higher than those of CMB-pHSV-TK (6.36 ± 1.22 %) and MB-pHSV-TK (3.49 ± 0.35 %), (p < 0,001). These data indicated that VCMB-pHSV-TK have much greater cell-binding ability compared with other untargeted MBs. In addition, the anti-tumor efficiency of HSV-TK/GCV via VCMB-pHSV-TK with FUS was examined in two glioma cell lines (U87 and U251 cells). After gene transfection, glioma cell inhibition ability of VCMB-pHSV-TK increased with a higher GCV concentration. The results also demonstrated that IC50 of U87 cells was lower than that of U251 cells (1.41 and 6.69 µg/ml, respectively).

Từ khóa: *gen trị liệu, HSV-TK, hướng đích, kháng thể kháng VEGFR2, vi bọt.*

Đặt vấn đề

Vi bọt (microbubbles (MB)) là các hạt mang khí, được bao bọc bởi lớp màng mang điện tích, có khả năng liên kết với các phân tử acid nucleic. Cấu trúc của vi bọt cho phép gắn thêm nhiều loại phối tử nhằm chế tạo hệ chuyển gen có tác dụng hướng đích [3]. Hơn nữa, khi phối hợp siêu âm tập trung (focus ultrasound (FUS)) với hệ chuyển gen vi bọt thì làm tăng hiệu quả chuyển gen. Đây là một kỹ thuật mới đầy hứa hẹn để chẩn đoán và điều trị nhiều loại ung thư [3].

Gen *Herpes simplex virus thymidine kinase* (HSV-TK) mã hóa cho thymidin kinase - enzym có tác dụng chuyển hóa tiền chất ganciclovir (GCV) thành chất có hoạt tính ức chế tổng

hợp ADN của tế bào ung thư. Một số nghiên cứu đã chứng minh liệu pháp sử dụng gen *HSV-TK* kết hợp GVC có tác dụng ức chế nhiều loại ung thư trong đó có u não [2], [10]. Thụ thể 2 của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)) là thụ thể của yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF). Khi thụ thể này gắn với cơ chất sẽ kích hoạt con đường truyền tin gây tăng sinh, tăng di chuyển của tế bào và tạo mạch máu. Dòng tế bào tế bào u thần kinh đệm (glioma cell) là dòng tế bào tiền thân chính của u nguyên bào đệm đa dạng (Glioblastoma multiforme - GBM), đây là loại ung thư não ác tính phổ biến nhất. VEGFR2 được biểu hiện nhiều trên màng tế bào nội mô và trên cả tế bào u thần kinh đệm [4], [5].

Do vậy, để tăng hiệu quả chuyển gen và hạn chế tác động đến mô lành, việc liên hợp các kháng thể hoặc phối tử đặc hiệu lên bề mặt vi bọt là một biện pháp đang được quan tâm. Từ kết quả nghiên cứu trước, nhóm nghiên cứu đã tạo được hệ vi bọt đa chức năng mang gen HSV-TK và kháng thể kháng VEGFR2, có thể gắn trên bề mặt của các mạch máu mới và các mô khối u [1]. Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu tiếp theo để đánh giá khả năng hướng đích và ức chế tế bào u não của hệ vi bọt kết hợp với FUS. Nhằm góp phần đánh giá hệ vi bọt trên một cách đầy đủ hơn, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: đánh giá hiệu quả hướng đích và khả năng ức chế tế bào u não *in vitro* của hệ vi bọt mang gen *HSV-TK* và kháng thể kháng VEGFR2 hướng đích.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC); 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phospho ethanolamine -N-[methoxy (poly (ethyleneglycol)) -2000]-Biotin (DSPE-PEG2000-Biotin); 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane (DPTAP); 1,2-distearoyl-sn -glycero-3-phospho ethanolamine-N-[methoxy (poly(ethyleneglycol))-2000] (DSPE-PEG2000) từ Avanti Polar Lipids (Hoa Kỳ). Khí C_3F_8 từ ThermoFisher (Hoa Kỳ); FITC-avidin từ Sigma Aldrich, MO, (Hoa Kỳ); gen điều trị HSV-TK, tích hợp trong plasmid gắn chỉ thị mã hóa tạo HSV-TK (pHSV-TK) (Origene - Mỹ); kháng thể kháng VEGFR2 từ Miltenyi Biotec (Đức). Hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng trong phân tích.

Dòng tế bào ung thư: U251 (U-251 MG human cell line) và U87 (U-87 MG human cell line), được mua từ ngân hàng tế bào ATCC (American Type Culture Collection) của Hoa Kỳ.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo hệ vi bọt mang gen HSV-TK và kháng thể kháng VEGFR2

Tạo vi bọt bằng phương pháp hydrat hóa lớp mỏng dựa theo nghiên cứu trước [1]. Quy trình tạo hệ vi bọt gắn kháng thể kháng VEGFR2 và pHSV-TK (plasmid ADN mang gen HSV-TK) diễn ra tóm tắt các bước chính như sau: Bước 1: tạo vi bọt CMB có các thành phần gồm DPPC, DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-Biotin và DPTAP hòa tan trong cloroform, sau đó cất quay chân không để tạo màng. Màng được hydrat hóa bằng dung dịch đệm glycerol-PBS, rồi sục khí C_3F_8 vào để tạo vi bọt; Bước 2: ủ FITC-avidin với CMB để tạo avidin-CMB (chỉ thị huỳnh quang FITC được gắn trên

Bảng 1. Thành phần chính của các loại vi bọt.

Loại vi bọt	DPPC	DSPE-PEG2000	DSPE-PEG2000-Biotin	DPTAP	Kháng thể kháng VEGFR2	pHSV-TK
MB-pHSV-TK	+	+	+			+
CMB-pHSV-TK	+	+	+	+		+
VCMB-pHSV-TK	+	+	+	+	+	+

Phương pháp đánh giá khả năng hướng đích của hệ vi bọt trên mô hình in vitro

vi bọt thông qua cầu nối avidin-biotin); Bước 3: ủ kháng thể kháng VEGFR2 với avidin-CMB (do kháng thể kháng VEGFR2 liên hợp với avidin), thu được VCMB; Bước 4: ủ pHSV-TK lên VCMB, thu được VCMB-pHSV-TK.

Tạo thêm 2 vi bọt đối chứng: vi bọt trung tính và vi bọt mang điện tích dương (kí hiệu tương ứng: MB-pHSV-TK và CMB-pHSV-TK) theo quy trình trên nhưng thành phần khác nhau (trình bày ở Bảng 1):

Tế bào U87 được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F-12), bổ sung 10 % huyết thanh bào thai bò, penicillin/streptomycin (100 U/ml) ở 37 ^{0}C trong 24 giờ (đĩa 24 giếng). Thêm vào mỗi giếng VCMB-pHSV-TK (3×10^9 vi bọt/mL, đã được gắn với chỉ thị huỳnh quang-FITC) và ủ trong 10 phút, sau đó rửa nhiều lần bằng đệm phosphat (PBS). Đồng thời, tiến hành tương tự như trên để so sánh hiệu quả hướng đích với các 2 loại vi bọt đối chứng (MB-pHSV-TK và CMB-pHSV-TK). Quan sát và đếm số lượng vi bọt gắn với tế bào dưới kính hiển huỳnh quang.

Hiệu quả hướng đích của VCMB-pHSV-TK trên dòng tế bào U87 được đánh giá bởi phương pháp đo dòng chảy tế bào (BD FACSCanto™, BD Biosciences, NJ, Hoa Kỳ) [8]. Các thí nghiệm tiến hành trên bốn nhóm: (1) Chỉ có tế bào; (2) MB-pHSV-TK; (3) CMB-pHSV-TK; và (4) VCMB-pHSV-TK.

Hiệu quả hướng đích của hệ vi bọt được xác định bằng công thức:

$$\text{Hiệu quả hướng đích} = \frac{\text{Số tế bào phát huỳnh quang (được vi bọt bám)}}{\text{Tổng số tế bào đếm được}} \times 100\%$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và tính giá trị trung bình.

Phương pháp đánh giá khả năng ức chế tế bào u não

Một ngày trước khi thí nghiệm, 2 dòng tế bào u não (U251 và U87) được nuôi cấy trong môi trường DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's/Ham's Nutrient Mixture F-12), bổ sung 10 % huyết thanh bào thai bò, penicillin/streptomycin (100 U/ml) ở 37 ^{0}C. VCMB-pHSV-TK được thêm vào các giếng tế bào để thực hiện quá trình chuyển gen với siêu âm tập trung-FUS (tần số: 1 MHz, áp suất âm: 0,7 MPa, số chu kỳ: 10.000, PRF: 5 Hz, thời gian siêu âm: 1 phút). Sau 4 giờ, các tế bào được rửa sạch bằng PBS và thêm DMEM/F12. 24 giờ sau chuyển gen, tế bào được chia thành các giếng ủ trong môi trường có 0 - 10 µg/mL GCV. Sau khi ủ GCV trong 96 giờ, tiến hành đánh giá khả năng gây độc tế bào (hoạt tính ức chế tế bào ung thư) theo phương pháp MTT [9]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, tính giá trị trung bình.

Khả năng ức chế được tính theo công thức:

$$H\% = \left(1 - \frac{OD_{TH}}{OD_{ĐC}}\right) \times 100\%$$

Trong đó: H% là phần trăm ức chế tế bào; OD_{TH} là mật độ quang ở lô thử; $OD_{ĐC}$ là mật độ quang ở lô đối chứng.

IC_{50} là nồng độ GCV mà có thể ức chế 50 % số lượng tế bào. IC_{50} được tính dựa trên đường cong nonlinear regression bằng phần mềm Graphpad Prism 9.

Xử lý số liệu

Số liệu được lưu trữ và xử lý bằng phần mềm SPSS20. Số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn ($\overline{X}\pm$ SD). So sánh trung bình các mẫu bằng T-test Student, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nếu $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả một số đặc điểm vật lý của hệ vi bọt

Sau khi triển khai phương pháp hydrat hóa lớp mỏng để tạo các loại vi bọt, các thông số lý học được xác định và công bố trong bài báo trước [1]. Dưới đây thống kê lại một số đặc điểm chính của các loại vi bọt (Bảng 2).

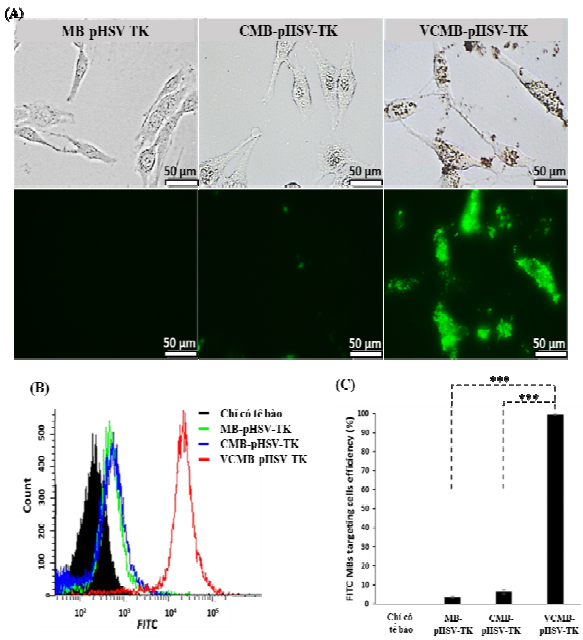
Kết quả đánh giá khả năng hướng đích của hệ vi bọt trên mô hình in vitro

Trước tiên, khả năng hướng đích chủ động được đánh giá trên tế bào u thần kinh đệm U87 của VCMB-pHSV-TK. Dựa trên ái lực tự

Bảng 2. Tổng kết một số đặc điểm của các loại vi bọt [1]

Loại vi bọt	Đường kính (µm) ($\bar{X}$ ± SD)	Nồng độ (10^9/ml) ($\bar{X}$ ± SD)	Thế zeta (mV) ($\bar{X}$ ± SD)
MB-pHSV-TK	0,91 ± 0,02	15,71 ± 1,20	-33,26 ± 0,84
CMB-pHSV-TK	0,96 ± 0,02	30,66 ± 2,72	-5,21 ± 1,33
VCMB-pHSV-TK	1,05 ± 0,01	10,75 ± 1,14	-3,79 ± 1,91

nhiên của VEGF đối với tế bào, VCMB-pHSV-TK được liên hợp nhiều quanh các cạnh của tế bào (thể hiện hình ảnh huỳnh quang màu xanh của FITC được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang), trong khi chỉ có rất ít với mẫu xử lý với CMB-pHSV-TK và hầu như không có với tế bào xử lý với MB-pHSV-TK (Hình 1A).



Hình 1. *Ái lực hướng đích tế bào u thần kinh đệm của các nhóm vi bọt.*

*(A) Hình ảnh hiển vi trường sáng và huỳnh quang của tế bào. (B) Kết quả với phương pháp đo dòng chảy tế bào (C) Kết quả định lượng thể hiện hiệu quả hướng đích với nhóm MB-pHSV-TK, nhóm CMB-pHSV-TK và nhóm VCMB-pHSV-TK, so với nhóm chỉ có tế bào (***: p < 0,001).*

Kết quả đánh giá hiệu quả hướng đích sử dụng phương pháp phân tích tế bào dòng chảy được thể hiện ở Hình 1B và 1C. Hiệu quả hướng đích của VCMB-pHSV-TK (99,43 ± 0,32 %) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với CMB-pHSV-TK (6,36 ± 1,22 %) và MB-pHSV-TK (3,49 ± 0,35 %), (p < 0,001).

Kết quả đánh giá khả năng ức chế in vitro của hệ vi bọt với một số dòng tế bào u não người

Tiếp theo, khả năng ức chế tế bào ung thư được đánh giá trên 2 dòng tế bào u thần kinh đệm người là dòng tế bào U87 và U251.

Dòng tế bào U87 được chuyển gen bởi hệ vi bọt VCMB-pHSV-TK, sau đó đánh giá khả năng ức chế tế bào. Kết quả thu được ở Bảng 3 cho thấy, trong khoảng nồng độ ức chế của GCV từ 0 - 10 µg/ml thu được % tế bào bị ức chế trong khoảng 0 – 87,19 %, IC50 là 1,41 µg/ml.

Bảng 3. Tỷ lệ % tế bào bị ức chế và IC_{50} của VCMB-pHSV-TK trên dòng tế bào U87.

Nồng độ GCV (µg/ml)	% tế bào bị ức chế		IC_{50} (µg/ml)
	$\bar{X}$	*SD*	
0	0	0	1.41
0.5	22.85	5.34	
1	43.53	6.67	
5	79.32	8.15	
10	87.19	16.35	

Trong đó: $\bar{X}$: trung bình; SD: độ lệch chuẩn

Dòng tế bào U251 được chuyển gen bởi hệ vi bọt VCMB-pHSV-TK, sau đó đánh giá khả năng ức chế tế bào. Kết quả thu được ở Bảng 4 cho thấy, trong khoảng nồng độ ức chế của GCV từ 0 đến 10 µg/ml thu được % tế bào bị ức chế trong khoảng 0-57,91 %, IC50 là 6,69 µg/ml.

Bảng 4. Tỷ lệ % tế bào bị ức chế và IC_{50} của VCMB-pHSV-TK trên dòng tế bào U251.

Nồng độ GCV (µg/ml)	% tế bào bị ức chế		IC_{50} (µg/ml)
	$\bar{X}$	*SD*	6,69
0	0	0	
0,5	12,85	3,41	
1	35,91	5,17	
5	40,62	6,52	
10	57,91	8,74	

Trong đó: $\bar{X}$: trung bình; SD: độ lệch chuẩn

Bàn luận

Trong quá trình hình thành và phát triển khối u, thụ thể VEGFR2 xuất hiện nhiều trên bề mặt tế bào ung thư của khối u để tiếp nhận và gắn đặc hiệu với yếu tố tăng trưởng làm hoạt hóa truyền tin theo kiểu dòng thác và kích thích tăng sinh tế bào và hình thành mạch máu bao xung quanh khối u [5]. Mục đích gắn kháng thể kháng VEGFR2 vào vi bọt là "hướng đích" chủ động cho hệ vi bọt đến các tế bào khối u và hệ mạch máu bao xung quanh khối u, giúp các vi bọt tập trung ở các tế bào ung thư và do đó có thể tăng khả năng chuyển gen điều trị, giảm tác dụng phụ cho mô lành.

Nghiên cứu này sử dụng ba loại vi bọt làm vector chuyển gen *HSV-TK* là VCMB, CMB và MB. Với vi bọt VCMB-pHSV-TK (mẫu thử) có gắn kháng thể kháng VEGFR2, nhằm tăng khả năng hướng đích, tiếp cận tế bào ung thư não. Hai loại vi bọt CMB-pHSV-TK và MB-pHSV-TK làm mẫu chứng (không gắn kháng thể kháng VEGFR2) để so sánh và chứng minh ưu điểm về tăng cường khả năng hướng đích chủ động tế bào u não của VCMB-pHSV-TK. CMB là loại vi bọt có thành phần phospholipid mang điện tích dương (giống VCMB) để có thể tăng cường tạo phức hợp với pHSV-TK mang điện tích âm so với MB trung tính.

Dòng tế bào u thần kinh đệm là dòng tế bào tiền thân chính của khối u não. Do vậy, để hướng tới điều trị gen hướng đích u não, nghiên cứu được tiến hành trên 2 dòng tế bào u thần kinh đệm: U251 (U-251 MG human cell line) và U87 (U-87 MG human cell line). Đây là hai dòng tế bào u nguyên bào thần kinh đệm được sử dụng rất nhiều trong các nghiên cứu; đồng thời, U87 và U251 có sự khác biệt về sự biểu hiện các nhóm protein thụ thể kích thích tăng trưởng [4]. Chính vì vậy, tế bào U87 được lựa chọn để đánh giá tác dụng hướng đích của hệ vi bọt do chúng biểu hiện nhiều hơn nhóm thụ thể này. Kết quả thể hiện ở Hình 1 cho thấy hiệu quả hướng đích của VCMB-pHSV-TK (99,43 ± 0,32 %) cao hơn 15.6 lần so với CMB-pHSV-TK và 28.4 lần so với MB-pHSV-TK ($p < 0,001$). Kết quả này chỉ ra rằng VCMB-pHSV-TK có ái lực với tế bào u thần kinh đệm cao hơn nhiều so với các vi bọt không được gắn kháng thể kháng VEGFR2. Do vậy, nghiên cứu đánh giá tác dụng ức chế tế bào ung thư não tiếp theo chỉ sử dụng VCMB-pHSV-TK làm mẫu thử (Bảng 3 và 4).

Mặt khác, nghiên cứu này sử dụng gen điều trị là gen HSV-TK, gen mã hóa cho thymidin kinase xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm γ-phosphat của ATP tới nhân thymidin để tạo ra dTMP đóng vai trò là nguyên liệu trong quá trình sao chép ADN. HSV-TK đã được sử dụng rộng rãi trong liệu pháp gen tự sát (suicide gene) để điều trị ung thư do tính đặc hiệu cơ chất và sự không ảnh hưởng của thymidin kinase nội sinh của người để phosphoryl hóa các chất tương tự guanosin như GCV. Hơn nữa, điều thú vị là khả năng tạo ra hiệu ứng tiêu diệt không chỉ các tế bào biểu hiện *HSV-TK* khi tiếp xúc với GCV mà còn cả các tế bào u lân cận [7]. Cơ sở của liệu pháp gen tự sát là đưa một gen mã hóa một loại enzym chuyển hóa tiền chất vào các tế bào khối u, sau đó tiền chất đưa vào cơ thể được chuyển hóa đặc hiệu thành dạng có hoạt tính bởi sản phẩm biểu hiện gen của gen tự sát, do đó mang lại khả năng tiêu diệt tế bào ung thư. Kết quả từ các Bảng 3 và Bảng 4 cũng cho thấy khi được chuyển gen HSV-TK bởi hệ vi bọt VCMB trên 2 dòng tế bào u thần kinh đệm (U87 và U251) đều thể hiện khả năng ức chế tế bào, hiệu quả ức chế tăng khi tăng nồng độ GCV. Giá trị IC_{50} trên tế bào U87 (1.41 µg/ml) thấp hơn so với tế bào U251 (6,69 µg/ml), chứng tỏ tế bào U87 nhạy cảm hơn tế bào U251 khi chuyển gen bởi hệ vi bọt VCMB-pHSV-TK kết hợp với siêu âm tập trung (FUS). Điều này có thể là kết quả của sự khác biệt trong biểu hiện nhóm protein thụ thể tăng trưởng của hai dòng tế bào này, khiến cho vi bọt tăng khả năng hướng đích và tiếp cận với U87 nhiều hơn (đã được chứng minh ở Hình 1), do đó tăng hiệu quả chuyển gen và tăng tác dụng ức chế tế bào ung thư. Đồng thời, kết quả IC50 trên tế bào U87 (1,41 µg/ml) cũng thấp hơn khoảng 2.5 lần so với một kết quả nghiên cứu trước đó (3,65 µg/ml) cũng sử dụng liệu pháp gen tự sát *HSV-TK* (được chuyển gen bằng plasmid trần) phối hợp với

GCV trên mô hình tế bào U87 *in vitro* [6]. Điều này phần nào khẳng định ưu thế chuyển gen bằng VCMB so với plasmid. Ngoài ra, sự kết hợp giữa siêu âm và vi bọt giúp tăng cường hơn tính thấm qua màng tế bào ngay cả khi sử dụng sóng siêu âm cường độ yếu, dẫn đến tăng cường sự hấp thu thuốc và gen.

Tóm lại, nhằm hướng đích một cách chủ động, tăng cường xâm nhập và giải phóng gen điều trị tại vị trí khối u chứ không phải tế bào mô lành, thiết kế hệ vi bọt vừa mang gen *HSV-TK* vừa gắn với kháng thể kháng VEGFR2 và phối hợp siêu âm tập trung được coi là giải pháp tiềm năng trong điều trị tại đích u não. Hướng đi này hiện trên thế giới chưa có nhiều nghiên cứu và đây là nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam.

Kết luận

Hệ vi bọt mang gen HSV-TK và kháng thể kháng VEGFR2 (VCMB-pHSV-TK) có khả năng hướng đích tế bào u thần kinh đệm (tế bào U87). Hiệu quả hướng đích tế bào U87 của VCMB-pHSV-TK (99,43 ± 0,32 %) cao hơn rõ rệt so với 2 loại vi bọt đối chứng là CMB-pHSV-TK và MB-pHSV-TK ($p < 0,001$). Ngoài ra, hiệu quả ức chế tế bào u não của VCMB-pHSV-TK khi chuyển gen kết với siêu âm tập trung trên hai dòng tế bào u thần kinh đệm (tế bào U87 và U251) thể hiện qua khả năng ức chế tế bào nhiều hơn ở nồng độ GCV cao hơn. Giá trị IC_{50} của GCV trên tế bào U87 thấp hơn trên tế bào U251 (lần lượt là 1,41 so với 6,69 µg/ml).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài Nghị định thư hợp tác quốc tế với Đài Loan, cấp Quốc gia; Mã số: NĐT.65.TW/19; do Bộ Khoa học và Công nghệ làm chủ quản "Nghiên cứu bào chế và đánh giá tác dụng hệ vi bọt đa chức năng trong trị liệu gen hướng đích u não trên mô hình in vitro và in vivo" và sự hỗ trợ chuyên môn của GS. Chih-Kuang Yeh, Đại học Quốc gia Thanh Hoa, Đài Loan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Anh Thơ và cộng sự (2021), "Đánh giá đặc điểm lý, sinh học của hệ vi bọt mang gen HSV-TK và kháng thể kháng VEGFR2 hướng đích", *Nghiên cứu Dược và Thông tin thuốc,* 6(12), tr. 26-34.
2. Ahn Y. H., Yi H., et al. (2012), "STAT3 silencing enhances the efficacy of the HSV.tk suicide gene in gastrointestinal cancer therapy", *Clin Exp Metastasis,* 29(4), pp. 359-69.
3. Ibsen S., Schutt C. E., et al. (2013), "Microbubble-mediated ultrasound therapy: a review of its potential in cancer treatment", *Drug Des Devel Ther,* 7, pp. 375-88.
4. Li H., Lei B., et al. (2017), "Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines", *Turk Neurosurg*, 27(6), pp. 894-903.
5. Lu-Emerson C., Duda D. G., et al. (2015), "Lessons from anti-vascular endothelial growth factor and anti-vascular endothelial growth factor receptor trials in patients with glioblastoma", *J Clin Oncol,* 33(10), pp. 1197-213.
6. Rainov N. G., Fels C., et al. (2001), "Temozolomide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma", *Cancer Gene Ther,* 8(9), pp. 662-8.
7. Robe Pierre Alain, Princen Frédéric, et al. (2000), "Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: Effects of dibutyryl adenosine 3 ,5 -cyclic monophosphate, α-glycyrrhetinic acid, and cytosine arabinoside", *Biochemical Pharmacology,* 60(2), pp. 241-249.
8. Selliah N., Eck S., et al. (2019), "Flow Cytometry Method Validation Protocols", *Curr Protoc Cytom,* 87(1), pp. e53.
9. Van de Loosdrecht A. A., Beelen R. H., et al. (1994), "A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia", *J Immunol Methods,* 174(1-2), pp. 311-20.
10. Xu L., Ge K., et al. (1997), "Suicide gene therapy for glioma using HSV-tk/GCV system", *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,* 19(5), pp. 353-7.