

# NK 细胞来源外泌体抗肿瘤活性初步鉴定

王佳颖, 詹思建, 陈汉祎, 刘秀盈, 冯娅茹, 王炳彰, 陈丽丽, 王建勋

## 【摘要】

**目的** 探究自然杀伤(NK)细胞来源外泌体(NK-Exo)是否具有抗肿瘤活性。

**方法** 培养 NK-92 MI 细胞及间充质干细胞(MSC)并分离得到相应外泌体,通过颗粒数、粒径检测以及蛋白质印迹法对其进行相关鉴定。以 NK-92 MI 细胞来源外泌体作为实验组(NK-Exo 组)、MSC 细胞来源外泌体作为对照组(MSC-Exo 组),采用荧光素酶发光法检测不同剂量的外泌体对靶细胞 Raji-luc 的肿瘤杀伤情况,探究 NK-Exo 的抗肿瘤活性。

**结果** 两种外泌体 NK-Exo、MSC-Exo 粒径均存在峰值,且分布在外泌体粒径范围 30~150 nm 内,呈典型双层膜结构,粒径和形态均符合外泌体的生物学特征,且蛋白标志物 CD63、CD81 和 TSG101 表达阳性,NK-Exo、MSC-Exo 外泌体成功提取分离。荧光素酶发光法检测显示 NK-Exo 相较于 MSC-Exo 具有显著的肿瘤杀伤作用( $P < 0.01$ ),NK-Exo 抗肿瘤效果呈现剂量依赖性且与肿瘤细胞数相关( $P < 0.01$ )。

**结论** NK-92 MI 细胞来源的 NK-Exo 具有抗肿瘤活性,NK-92 MI 细胞能够为 NK-Exo 的抗肿瘤研究提供便捷、可靠的细胞来源。

**【关键词】** NK 细胞来源外泌体; NK-92 MI 细胞; Raji-luc 细胞

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2025, 20(6):629-634

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

文章编号: 1673-713X(2025)06-0629-06

外泌体(exosomes, Exo)是一种包含蛋白质、脂质、RNA(如 miRNA、tRNA)等多种生物分子成分的小型球形膜囊泡,直径通常为 30~150 nm,Exo 广泛存在于机体体液中,主要由细胞分泌并参与细胞间通讯<sup>[1]</sup>。在肿瘤诊疗领域,Exo 具有三重潜在价值:作为疾病诊断标志物、药物递送载体以及免疫调节剂。有研究表明不同来源的 Exo 在肿瘤治疗中呈现双向调控作用:树突状细胞来源 Exo

可发挥抗原呈递功能,间充质干细胞来源 Exo(mesenchymal stem cell-derived Exo, MSC-Exo)则通过抑制 MAPK 信号通路发挥抗肿瘤效应<sup>[2-5]</sup>。自然杀伤(nature killer, NK)细胞作为先天免疫系统的关键效应细胞,以其快速抗肿瘤反应和无需预先致敏的特性成为肿瘤免疫治疗的研究热点,然而肿瘤微环境常导致 NK 细胞功能抑制、存活时间缩短和肿瘤浸润不足<sup>[6-7]</sup>。近年研究发现,NK 细胞来源的 Exo(NK-derived exosomes, NK-Exo)富含溶细胞分子,具有显著的肿瘤归巢能力,并能抵抗缺氧微环境,相较于 NK 细胞疗法中新兴的 CAR-NK 细胞疗法,NK-Exo 更具安全性、持久性、有效性,能避免细胞因子风暴等风险,在增强免疫监视和肿瘤清除方面展现出独特优势<sup>[8-9]</sup>。

基于 Exo 的双重特性(天然靶向性和生物相容性)以及 NK 细胞的固有抗肿瘤功能,NK-Exo 抗肿瘤研究为克服当前肿瘤治疗面临的耐药性、不良反应等问题提供了新思路。目前,用于 NK-Exo 研究的 NK 细胞来源主要包括外周血单核细胞、脐带血细胞、多能干细胞以及 NK 细胞系<sup>[10-13]</sup>。其中,NK-92 MI 细胞作为 IL-2 非依赖型永生细胞系,因其获取便捷、培养成本低等优势,在 NK 细胞研究中的重要价值,但以其为来源制备 NK-Exo 并进行抗肿瘤活性验证的研究仍较为缺乏。本研究创新性地选用 NK-92 MI 细胞作为 NK-Exo 来源细胞,以 MSC-Exo 为对照,通过肿瘤杀伤实验评估 NK-92 MI 细胞来源 NK-Exo 的抗肿瘤活性,以期为 NK-Exo 的抗肿瘤研究提供便捷、可靠的细胞来源选择,并为抗肿瘤研究中兼具自身抗肿瘤能力的药物载体研究提供一定实验依据。

**基金项目:**北京市双一流高层次人才科研启动经费(9011451310032)

**作者单位:**102488 北京中医药大学生命科学院(王佳颖、刘秀盈、王建勋);518118 广东,深圳细胞谷生物医药有限公司(詹思建、陈汉祎、王建勋);528400 中山,广东君厚生物医药有限公司(冯娅茹、王炳彰、陈丽丽、王建勋)

**通信作者:**王建勋, Email: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn

**收稿日期:**2025-02-25

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

NK-92 MI 细胞、MSC 细胞购自美国 ATCC 细胞库；稳定表达 Luciferase 蛋白人 Burkitt's 淋巴瘤细胞、Raji-luc 细胞购自北京维通达生物技术有限公司；X-VIVO 培养基、MSC-SFM 培养基、RPMI1640 培养基、胎牛血清 (FBS)、磷酸盐缓冲液 (PBS) 均购自美国 Gibco 公司；CD81、CD63、TSG101、 $\beta$ -actin 抗体均购自上海 Beyotime 公司；荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京兰博利德科技有限公司；外泌体培养基、RIPA 裂解液、BCA 蛋白质浓度测定试剂盒均购自上海翌圣生物科技股份有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 外泌体来源细胞的培养** NK-92 MI 细胞在 X-VIVO 完全培养基 (添加 10% FBS) 中培养, MSC 细胞在 MSC-SFM 完全培养基 (添加 10% FBS) 中培养。复苏 NK-92 MI 细胞、MSC 细胞并进行计数, 根据细胞数量补充适量培养基, 调整细胞浓度至适宜范围, 将细胞置于无菌培养瓶中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养, 定期观察并补充新鲜培养基。

**1.2.2 外泌体的提取及分离** NK-92 MI 细胞、MSC 细胞培养至对数生长期, 生长密度达 70% 后换液, 使用外泌体培养基继续培养 48 h 后收集上清液置于冰上, 经 4 °C 离心后将上清液转移到 0.45  $\mu$ m 无菌过滤器过滤, 收集滤液转移至超滤管中, 超滤浓缩得到 NK-Exo、MSC-Exo。3 次洗滤得到纯化的 NK-Exo、MSC-Exo, 保存于 -80 °C 低温冰箱中, 待后续使用。

**1.2.3 外泌体的透射电镜形态鉴定** 将铜网放到封口膜上, 取适量 NK-Exo、MSC-Exo 分别滴到铜网上, 10 min 后用滤纸吸去多余液体, 滴加磷钨酸染液并干燥, 后上机观察。

**1.2.4 外泌体的颗粒数与粒径检测** 将分离提取的外泌体送厦门福流生物科技有限公司 (NanoFCM 平台) 进行颗粒数与粒径检测并进行结果分析。

**1.2.5 外泌体的蛋白定量检测** 使用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 提取 NK-Exo、MSC-Exo 蛋白, 将裂解液置于 4 °C 冰上备用, 按照裂解液和外泌体样本 1:1 的体积比加入裂解液, 轻轻吹打混匀, 置于冰上裂解 10 min, 按 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒说明书操作, 得到待测样品, 37 °C 孵

育 30 min 后在酶标仪上检测吸光度。根据得到的各组 BSA 标准品的光密度 (OD) (减去标准品中空白孔的 OD 值即最终的读数), 绘制标准曲线, 依据标准曲线和样品的稀释倍数计算外泌体蛋白浓度。

**1.2.6 外泌体的蛋白质印迹法鉴定** 提取 NK-Exo、MSC-Exo 蛋白后, 混合上样缓冲液并煮沸蛋白, 电泳后电转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭膜 2 h, 与 CD81、CD63、TSG101、 $\beta$ -actin 抗体在 4 °C 下孵育过夜后, 室温下孵育对应二抗 1 h, 进行化学发光检测。

**1.2.7 靶细胞 Raji-luc 的培养** Raji-luc 细胞在 RPMI1640 完全培养基 (添加 10% FBS) 中培养。复苏 Raji-luc 细胞并进行计数, 根据细胞数量补充适量 RPMI1640 完全培养基, 调整细胞浓度至适宜范围, 将 Raji-luc 细胞接种至无菌培养瓶中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养, 定期观察并补充新鲜培养基。

**1.2.8 肿瘤杀伤活性检测** 将不同剂量的 NK-Exo 和 MSC-Exo, 与  $5 \times 10^3$  个靶细胞 Raji-luc 在不透光的 96 孔板中共培养 24 h, 或将不同剂量的 NK-Exo 与不同数量的靶细胞 Raji-luc 在不透光的 96 孔板中共培养 24 h, 完成后每孔加入 100  $\mu$ L 荧光素酶底物, 室温避光反应 3 min, 酶标仪检测其各孔的 OD 值。按照公式: 细胞杀伤效率 =  $1 - (OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白孔}}) / (OD_{\text{靶细胞组}} - OD_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ , 计算外泌体对肿瘤细胞的杀伤效率。

### 1.3 统计学处理

采用 Graph Pad Prism 8 软件进行统计, 符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用双向方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外泌体的蛋白定量检测

根据 NK-Exo、MSC-Exo 蛋白定量检测结果, 以 OD 值为 Y, 蛋白浓度 ( $\mu$ g/mL) 为 X, 得到线性方程:  $Y = 0.0011 X + 0.0975$  ( $r^2 = 0.9956$ )。依据所得标准曲线 (图 1), 将待测样本 OD 值代入方程, 得到 NK-Exo 蛋白浓度为 1580.00  $\mu$ g/mL、MSC-Exo 蛋白浓度为 2096.12  $\mu$ g/mL。

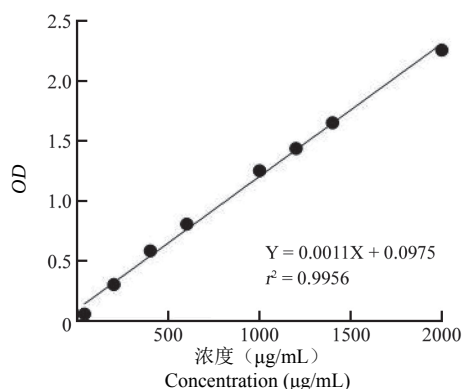


图 1 外泌体 BCA 蛋白定量标准曲线

Figure 1 The standard curve of Exo BCA protein assay

## 2.2 外泌体鉴定结果

2.2.1 外泌体的形态鉴定结果 通过透射电镜对 NK-Exo、MSC-Exo 进行形态特征鉴定, 鉴定结果证实提取的 NK-Exo、MSC-Exo 具有典型的双层膜结构 (图 2), 符合外泌体的生物学特征。

2.2.2 外泌体的颗粒数与粒径检测结果 通过对颗粒数与粒径大小的检测, 对 Exo 进行表征分析。结果显示, 在制备浓度下, NK-Exo 粒径均值为  $(54.00 \pm 2.00)$  nm, MSC-Exo 粒径均值为

$(53.60 \pm 2.10)$  nm, 均分布在 Exo 粒径范围 (30 ~ 150 nm) 内 (图 3)。

2.2.3 外泌体的蛋白质印迹法鉴定结果 使用蛋白质印迹法对 NK-Exo、MSC-Exo 进行蛋白标志物的鉴定, 结果如图 4 所示。NK-Exo、MSC-Exo 蛋白标志物 CD63、CD81 和 TSG101 表达阳性, 染色后均存在与理论参考位置较一致的目的条带。

形态、粒径检测和蛋白标志物表达鉴定结果均显示 NK-Exo、MSC-Exo 符合外泌体特征, 表明 NK-Exo、MSC-Exo 提取分离成功。

## 2.3 荧光素酶发光法检测对靶细胞 Raji-luc 的杀伤效率

以 Raji-luc 为靶细胞, 在不同 Exo 剂量下, NK-Exo 具有显著的肿瘤杀伤效果 ( $P < 0.01$ ), 而 MSC-Exo 均为负杀伤效果 (图 5A)。同时, NK-Exo 抗肿瘤效果显著受到 NK-Exo 剂量、靶细胞 Raji-luc 数目影响 ( $P < 0.01$ )。在靶细胞 Raji-luc 数目为  $1 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$  个时, NK-Exo 抗肿瘤效果呈剂量依赖性, 且与靶细胞 Raji-luc 数目相关 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (图 5B)。

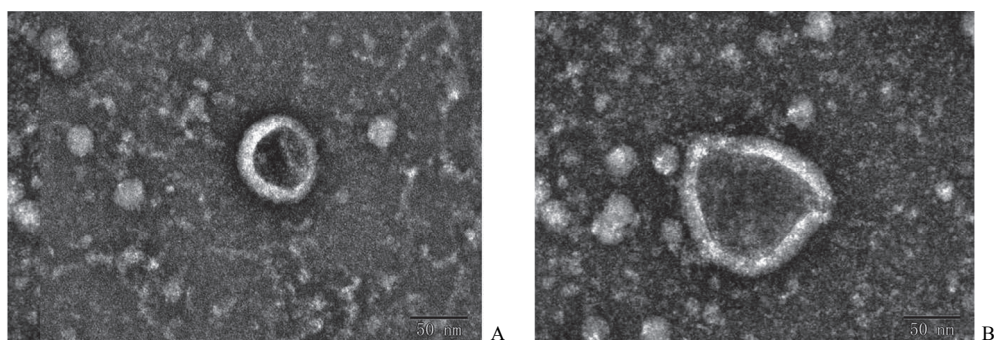


图 2 外泌体的透射电镜形态鉴定结果 (A: NK-Exo; B: MSC-Exo)

Figure 2 The morphology of exosome characterized by TEM (A: NK-Exo; B: MSC-Exo)

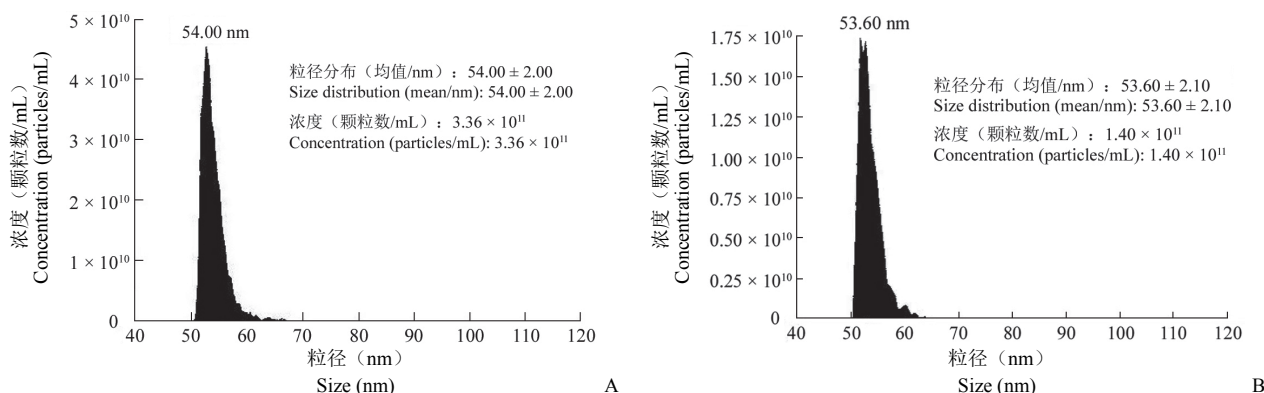


图 3 外泌体颗粒数与粒径检测结果 (A: NK-Exo; B: MSC-Exo)

Figure 3 Detection results of particle number and size distribution for exosome (A: NK-Exo; B: MSC-Exo)

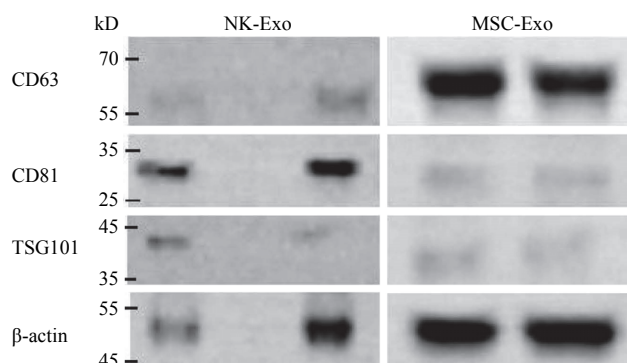
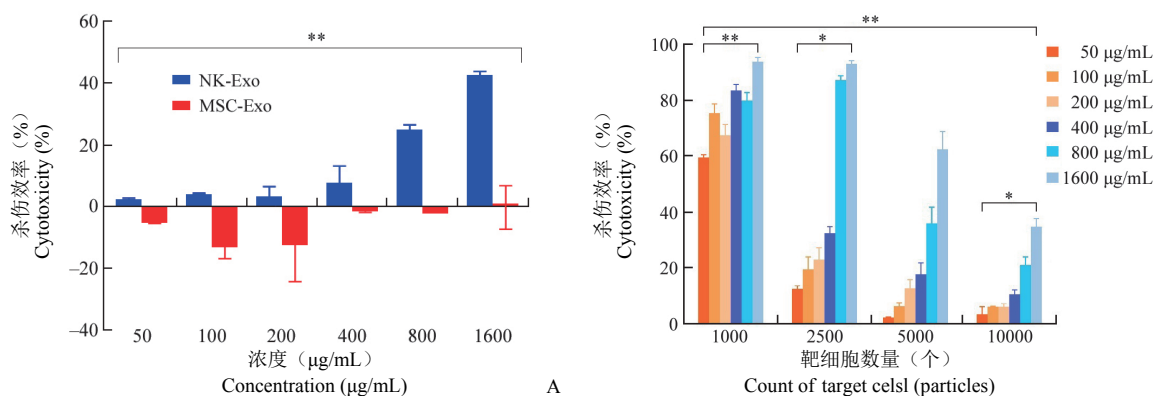


图 4 外泌体蛋白质印迹法鉴定结果

Figure 4 Identification results of western blot for exosome

图 5 外泌体杀伤靶细胞 Raji-luc 的效率 (A: NK-Exo、MSC-Exo 在不同剂量下杀伤靶细胞的效率; B: NK-Exo 在不同剂量下杀伤不同数目靶细胞的效率; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )Figure 5 Cytotoxicity of exosomes to kill target cells Raji-luc (A: The cytotoxicity of two exosomes, NK-Exo and MSC-Exo, on target cells at different concentration; B: The cytotoxicity of NK-Exo on target cells with different numbers at different concentration; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

### 3 讨论

本研究使用 Raji-luc 肿瘤细胞作为靶细胞,在梯度设置靶细胞接种数和 NK-Exo 效应剂量的条件下,发现 NK-Exo 的抗肿瘤活性与 NK-Exo 剂量密切相关,且 NK-Exo 的抗肿瘤活性可能受到靶细胞密度的调节,在特定靶细胞数量范围内存在“窗口期”,NK-Exo 效应剂量与靶细胞接种数的比例是影响抗肿瘤效果的关键参数。其中,NK-Exo 抗肿瘤效果呈剂量依赖性:在不同效应剂量下,限定靶细胞接种数为  $1 \times 10^3$ 、 $2.5 \times 10^3$  或  $1 \times 10^4$  个时,NK-Exo 抗肿瘤效果与剂量相关 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。特别地,当靶细胞数量为  $5 \times 10^3$  个时,虽然观察到 NK-Exo 抗肿瘤效果随剂量增加而增强的趋势,但差异并不具有统计学意义 ( $P > 0.05$ ),提示 NK-Exo 的抗肿瘤活性存在不稳定性;而在不同靶细胞接种数下限定效应剂量,每组效应剂量下肿瘤杀伤效果均具有差异性 ( $P < 0.05$ ),这可能源于 NK-Exo 的异质性或特定靶细胞密度下的饱和

效应。这一结果提示在实际应用中,NK-Exo 的剂量和靶细胞的负荷可能是影响抗肿瘤效果的重要因素,这些发现强调建立个体化的给药方案以精确效应剂量,为 NK-Exo 的基础研究及临床应用提供了一定参考。

近年来,NK-Exo 抗肿瘤相关研究层出不穷,通过基因工程技术间接改造 NK 细胞或直接修饰 NK-Exo,可显著提升其靶向性、细胞毒性和稳定性,并突破生物屏障的限制,对肿瘤免疫微环境进行重编程<sup>[14-16]</sup>。如通过 RGD 肿瘤靶向肽修饰、工程化改造 NK-Exo (R@Neo-MN) 可以实现免疫调控优化,进一步增强 NK-Exo 对特定区域的递送效率,特别是对 CAR-NK 细胞来源 Exo 的开发,显著提高了递送精准性<sup>[17-22]</sup>。在药物递送方面,You 等<sup>[23]</sup>证实装载阿霉素的 NK-Exos (NK-Exos-Dox) 通过上调促凋亡蛋白并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达增强抗肿瘤能力。同时,NK-Exo 不仅继承了亲本 NK 细胞的特性,还富含颗粒酶、肿瘤坏死

因子- $\alpha$  等生物活性介质<sup>[24-26]</sup>, NK-Exo 通过独特的生物学特性为安全性问题和肿瘤微环境阻碍等关键挑战提供了创新解决方案,探索 NK-Exo 与其他抗肿瘤疗法(如免疫检查点抑制剂)的联合应用,开发基于 NK-Exo 的多模式肿瘤治疗策略具有一定前景<sup>[13,27-29]</sup>。未来研究应进一步优化 NK-Exo 抗肿瘤策略,以充分发挥 NK-Exo 在肿瘤免疫治疗中的潜力。

本研究采用 NK-92 MI 细胞作为 NK-Exo 的制备原料,不仅解决了传统 NK 细胞来源受限的问题,更因 NK-92 MI 细胞 IL-2 非依赖性、永生代化特征显著提升了制备的便捷性和可重复性,且 NK-92 MI 细胞能够在  $-80^{\circ}\text{C}$  下稳定保存,有效克服了 NK-Exo 传统制备方式面临的时间成本和制备成本较大的难题<sup>[30]</sup>,也使得研究者能够更加专注于 NK-Exo 在肿瘤免疫治疗中的潜力探究而无需担忧原料培养问题,拓宽了 NK-Exo 来源的选择范围,更为抗肿瘤研究提供了易于大规模制备和“现货”使用的创新模式。因此,本研究为 NK-92 MI 细胞作为 NK-Exo 原料进行抗肿瘤研究提供了实验依据,并在一定程度上为 NK-Exo 抗肿瘤研究提供了一定便捷性。

值得注意的是,由于本研究靶细胞选取的单一性,需要辩证看待该研究结果,未来的研究亟需通过优化并丰富实验条件开展大样本实验验证,着重探索不同肿瘤类型中的剂量-效应关系,阐明靶细胞数量影响活性的分子机制,进一步探索 NK-Exo 在基础研究甚至临床研究中的抗肿瘤效果,推动 NK-Exo 在恶性肿瘤治疗中的实际应用。

## 参考文献

- [1] Fais S. NK cell-released exosomes: Natural nanobullets against tumors[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(1):e22337.
- [2] Darband SG, Mirza-Aghazadeh-Attari M, Kaviani M, et al. Exosomes: natural nanoparticles as bio shuttles for RNAi delivery[J]. *J Control Release*, 2018, 289:158-170.
- [3] Lugini L, Cecchetti S, Huber V, et al. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes[J]. *J Immunol*, 2012, 189(6): 2833-2842.
- [4] Chaput N, Taïeb J, Scharzt N, et al. The potential of exosomes in immunotherapy of cancer[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2005, 35(2):111-115.
- [5] Pitt JM, André F, Amigorena S, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer therapy[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4):1224-1232.
- [6] Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 18(2):85-100.
- [7] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478):eaau6977.
- [8] Chan AML, Cheah JM, Lokanathan Y, et al. Natural killer cell-derived extracellular vesicles as a promising immunotherapeutic strategy for cancer: a systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4):4026.
- [9] Chen J, Zhang G, Wan Y, et al. Immune cell-derived exosomes as promising tools for cancer therapy[J]. *J Control Release*, 2023, 364: 508-528.
- [10] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(4):265-277.
- [11] Klinker MW, Lizzio V, Reed TJ, et al. Human B cell-derived lymphoblastoid cell lines constitutively produce fas ligand and secrete MHCII(+)/FasL(+) killer exosomes[J]. *Front Immunol*, 2014, 5:144.
- [12] Wu F, Xie M, Hun M, et al. Natural killer cell-derived extracellular vesicles: novel players in cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:658698.
- [13] Batista IA, Quintas ST, Melo SA. The interplay of exosomes and NK cells in cancer biology[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(3):473.
- [14] Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, et al. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(19):6287-6297.
- [15] Li C, Qin S, Wen Y, et al. Overcoming the blood-brain barrier: Exosomes as theranostic nanocarriers for precision neuroimaging[J]. *J Control Release*, 2022, 349:902-916.
- [16] Elliott RO, He M. Unlocking the power of exosomes for crossing biological barriers in drug delivery[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(1): 122.
- [17] Tao B, Du R, Zhang X, et al. Engineering CAR-NK cell derived exosome disguised nano-bombs for enhanced HER2 positive breast cancer brain metastasis therapy[J]. *J Control Release*, 2023, 363(9): 692-706.
- [18] Hosseini R, Sarvnaz H, Arabpour M, et al. Cancer exosomes and natural killer cells dysfunction: biological roles, clinical significance and implications for immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1):15.
- [19] Wang W, Liu Y, He Z, et al. Breakthrough of solid tumor treatment: CAR-NK immunotherapy[J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10(1):40.
- [20] Kaban K, Hinterleitner C, Zhou Y, et al. Therapeutic silencing of BCL-2 using NK cell-derived exosomes as a novel therapeutic approach in breast cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(10):2397.
- [21] Cunha Silva L, Branco F, Cunha J, et al. The potential of exosomes as a new therapeutic strategy for glioblastoma[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2024, 203(10):114460.
- [22] Peng D, Cheng L, Tang J, et al. Engineered NK exosomes captured antigens in situ for enhanced tumor immunotherapy[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2025, 17(16):23740-23752.
- [23] You HC, Ho YK, Jong OP, et al. Enhanced anti-tumor effects of natural killer cell-derived exosomes through doxorubicin delivery to hepatocellular carcinoma cells: cytotoxicity and apoptosis study[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5):2234.
- [24] Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(9):1025-1036.
- [25] Kruschinski A, Moosmann A, Poschke I, et al. Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(45):17481-17486.
- [26] Motallebnejad P, Kantardjieff A, Cichocki F, et al. Process engineering of natural killer cell-based immunotherapy[J]. *Trends Biotechnol*, 2023, 41(10):1314-1326.

- [27] Qi Y, Zhao X, Dong Y, et al. Opportunities and challenges of natural killer cell-derived extracellular vesicles[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023, 11:1122585.
- [28] Kim HY, Min HK, Song HW, et al. Delivery of human natural killer cell-derived exosomes for liver cancer therapy: an in vivo study in subcutaneous and orthotopic animal models[J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1):2897-2911.
- [29] Samara A, Anbar M, Shapira S, et al. Using natural killer cell-derived exosomes as a cell-free therapy for leukemia[J]. *Hematol Oncol*, 2022, 41(3):487-498.
- [30] Federici C, Shahaj E, Cecchetti S, et al. Natural-killer-derived extracellular vesicles: immune sensors and interactors[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:262.

## Preliminary identification of the antitumor activity of NK cell-derived exosomes

WANG Jiaying, ZHAN Sijian, CHEN Hanyi, LIU Xiuying, FENG Yaru, WANG Bingzhang, CHEN Lili, WANG Jianxun

### 【Abstract】

**Objective** This study aims to explore the antitumor activity of exosomes derived from NK cells (NK-Exo).

**Methods** NK-92 MI cells and mesenchymal stem cells (MSC) were cultured to produce corresponding exosomes, with NK-92 MI cell-derived exosomes serving as the experimental group (NK-Exo) and MSC cell-derived exosomes as the control group (MSC-Exo). The concentration of exosomes was determined by protein quantification. Western blot and particle number and size analysis were utilized for their separation and identification. The concentration was determined by protein quantification. The tumor-killing efficiency of exosomes (NK-Exo and MSC-Exo) against target cells (Raji-luc) was assessed using the luciferase luminescence method at varying exosome doses and target cell numbers.

**Results** Both NK-Exo and MSC-Exo exhibited peak particle sizes within the 30 – 150 nm range, displaying a typical bilayer membrane structure consistent with the biological characteristics of exosomes. They tested positive for protein markers CD63, CD81, and TSG101, confirming successful isolation and extraction. The luciferase assay revealed that NK-Exo exhibited significantly greater tumor-killing efficiency compared to MSC-Exo ( $P < 0.01$ ). Furthermore, the antitumor effect of NK-Exo was found to be dose-dependent and correlated with the number of tumor cells ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** NK-92 MI cell-derived NK-Exo demonstrate notable antitumor activity, suggesting that NK-92 MI cells can serve as a convenient and reliable source for further studies on the antitumor properties of NK-Exo.

**【Keywords】** NK-derived exosome; NK-92 MI cell; Raji-luc cell

**Author Affiliations:** School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China (WANG Jiaying, LIU Xiuying, WANG Jianxun); Shenzhen Cell Valley Biopharmaceuticals Co., Ltd., Guangdong 518118, China (ZHAN Sijian, CHEN Hanyi, WANG Jianxun); Guangdong Junhou Bio-pharmaceuticals Co., Ltd., Zhongshan 528400, China (FENG Yaru, WANG Bingzhang, CHEN Lili, WANG Jianxun)

**Corresponding Author:** WANG Jianxun, Email: Jianxun.Wang@bucm.edu.cn