

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0218

论著

# 负载泼尼松龙牛奶外泌体治疗杜兴肌肉萎缩症的研究

钟丽<sup>1</sup>, 宋军<sup>1</sup>, 栗瑞斌<sup>1</sup>, 韩刚<sup>2</sup>, 尹海芳<sup>1</sup>

(1.天津医科大学基础医学院细胞生物学系,天津 300070;2.天津医科大学医学技术学院临床生物化学教研室,天津 300203)

**摘要** 目的:探究牛奶外泌体(mEXO)减少泼尼松龙(PSL)治疗杜兴肌肉萎缩症(DMD)的药物不良反应的效果。方法:将超速离心法收集的 mEXO 与 PSL 共孵育得到生物纳米药物(mEXO<sub>PSL</sub>);通过高效液相色谱(HPLC)检测药物装载效率;对 DMD 模型 *mdx* 小鼠给予口服治疗;监测 *mdx* 小鼠体重和体长变化,评估 mEXO 减轻 PSL 引起的生长抑制不良反应的效果,利用苏木素-伊红(HE)染色和 micro-CT 分析骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁间隙(Tb.Sp)等骨密度相关指标,评估 mEXO 减轻 PSL 引起的骨质疏松不良反应的效果;利用 HE 染色和 CD68 免疫组织化学染色检测肌肉病理情况以及炎症浸润情况,评估 mEXO<sub>PSL</sub> 的治疗效果。结果:通过共孵育可实现 54.6% PSL 在 mEXO 的负载;*mdx* 小鼠经治疗后,与 PSL 组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组 *mdx* 小鼠体重( $P<0.01$ )及体长( $P<0.01$ )显著增加;与 PSL 组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组 *mdx* 小鼠的 BV/TV( $P<0.01$ )、Tb.N ( $P<0.01$ )和 Tb.Th ( $P<0.05$ )显著增加,Tb.Sp ( $P<0.05$ )显著减少;与生理盐水组相比,PSL 组和 mEXO<sub>PSL</sub> 组肌肉病理以及炎症浸润均显著改善。结论:mEXO<sub>PSL</sub> 显著减少了 *mdx* 小鼠的生长抑制及骨质疏松药物不良反应,对 PSL 进行了药物改良。

**关键词** 牛奶外泌体;泼尼松龙;杜兴肌肉萎缩症

中图分类号 Q291

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0218-06

## Study on the treatment of Duchenne muscular dystrophy with prednisolone loaded on milk exosomes

ZHONG Li, SONG Jun, LI Ruibin, HAN Gang, YIN Haifang

(1.Department of Cell biology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;2.Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Technology, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**Abstract Objective:** To explore the effect of milk exosomes(mEXO) on reducing the adverse drug reactions of prednisolone (PSL) in the treatment of Duchenne muscular dystrophy(DMD). **Methods:** PSL was co-incubated with mEXO collected by ultracentrifugation to obtain bionanomedicine(mEXO<sub>PSL</sub>). Drug loading efficiency was detected by high-performance liquid chromatography(HPLC). DMD model *mdx* mouse was treated by oral administration. The changes in body weight and length of *mdx* mouse were monitored to evaluate the effect of mEXO on reducing growth inhibition adverse reactions caused by PSL. Bone density related indicators such as bone volume fraction(BV/TV), number of trabeculae(Tb. N), thickness of trabeculae(Tb. Th) and trabecular space(Tb. Sp) were detected by hematoxylin eosin(HE) staining and micro-CT to evaluate the effect of mEXO on reducing osteoporosis adverse reactions caused by PSL. Muscle pathology and inflammatory infiltration were detected by HE staining and CD68 immunohistochemical staining to evaluate the therapeutic effect of mEXO<sub>PSL</sub>. **Results:** 54.6% PSL could be loaded on mEXO by co incubation. After treatment, the *mdx* mice in the mEXO<sub>PSL</sub> group showed a significant increase in body weight( $P<0.01$ ) and length( $P<0.01$ ) compared to the PSL group. Compared with the PSL group, the BV/TV( $P<0.01$ ), Tb.N( $P<0.01$ ) and Tb. Th( $P<0.05$ ) of *mdx* mice in the mEXO<sub>PSL</sub> group significantly increased, while Tb.Sp ( $P<0.05$ ) significantly decreased. Compared with the saline group, both the PSL group and mEXO<sub>PSL</sub> group showed significant improvements in muscle pathology and inflammatory infiltration. **Conclusion:** mEXO<sub>PSL</sub> significantly reduces growth inhibition and osteoporosis adverse drug reactions in *mdx* mice, and improves the drug treatment of PSL in DMD.

**Key words** milk exosomes; prednisolone; DMD

杜兴肌肉萎缩症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种伴 X 染色体隐性遗传的退行性神经肌肉疾病,由编码肌营养不良蛋白(dystrophin)的 DMD 基因突变导致功能性 dystrophin 蛋白缺失所

致,在新生男孩中发病率为 1/3 500,是儿童中最常见的肌肉萎缩疾病<sup>[1-2]</sup>。由于缺乏 dystrophin 蛋白,肌肉收缩引起肌纤维慢性损伤,最终因膈肌、心肌纤维化或坏死而过早死亡。肌纤维受损会引发多种病理变化,包括炎症、纤维化和氧化应激等,糖皮质激素药物[如泼尼松龙(PLS)]因其具有良好的抗炎效果,目前是 DMD 临床治疗中使用最为广泛的药物<sup>[3-5]</sup>。但是它的长期使用与不良事件有关,如骨质流失、

基金项目 天津市研究生科研创新项目(2022SKY218)

作者简介 钟丽(1998-),女,硕士在读,研究方向:药物治疗与靶向递送;通信作者:尹海芳,E-mail:haifangyin@tmu.edu.cn;韩刚,E-mail:hangang@tmu.edu.cn。

生长迟缓、胰岛素抵抗和行为改变等<sup>[6-7]</sup>,因此找到一种减少糖皮质激素在 DMD 治疗中产生不良反应的治疗方法十分必要。

外泌体(exosome)作为一种直径约 30~150 nm 的生物纳米囊泡,具有低免疫原性、高生物相容性、稳定性好以及可修饰等特点<sup>[8]</sup>,可作为药物运输载体,在提高药物疗效以及降低药物不良反应等方面具有独特的优势<sup>[9]</sup>。据文献报道,牛奶外泌体(mEXO)不仅易获得、产量高、可口服给药<sup>[10-11]</sup>,而且具有抗炎以及提高骨密度的作用<sup>[12]</sup>。研究发现,外泌体高表达的 CD81 蛋白结构解析后其配体主要为含有甾体结构的胆固醇<sup>[13]</sup>。因此在本研究中选择使用 mEXO 作为甾体类抗炎药 PLS 的递送载体对 DMD 小鼠进行治疗,探讨 mEXO<sub>PSL</sub> 的治疗作用以及减少 PLS 产生的生长抑制和骨质疏松等药物不良反应的效果。

## 1 材料与方法

1.1 动物与材料 泼尼松龙(中国, MedChemExpress 公司), DMSO(中国, Solarbio 公司), 苏木素和伊红(中国, 天津化学试剂), rabbit-anti-CD68 antibody(美国, Abcam), 电镜铜网(中国, 北京新兴百业公司), Avanti J-26XP 超速离心机(德国, Beckman 公司), 透射电子显微镜(日本, HITACHI 公司), 小动物显微 CT(比利时, Bruker 公司)。

SPF 级 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华公司[合格证号: 110011221110011416; 许可证号: SCXK(京)2021-0011]。mdx 小鼠自行繁殖于天津医科大学动物中心 SPF 级实验室, 实验已通过天津医科大学动物伦理委员会审批(SYXK2019-0004)。

## 1.2 方法

1.2.1 mEXO 的分离和收集 选用生牛乳作为 mEXO 的来源, 将牛奶进行梯度离心(2 000×g 离心 30 min, 10 000×g 离心 30 min)去除细胞碎片, 将上清液通过 0.22 μm 的滤器, 去除杂质; 再将滤液以 100 000×g 离心 70 min, 弃去上清, 用 100 μL 的 DPBS 反复吹打离心管底部, 重悬得到 mEXO。

1.2.2 PSL 在 mEXO 中的装载 将 PSL 粉末用 DMSO 溶解得到 10 μg/mL PSL 溶液, 再将 PSL 溶液与 mEXO 以不同的质量比在 PBS 体系中混合后在 4℃共孵育, 再使用 100 kD 的超滤管进行超滤去除游离的 PSL 及 DMSO, 即得到 mEXO<sub>PSL</sub>。

1.2.3 高效液相(HPLC)检测 mEXO 中 PSL 的负载效率及药物浓度 色谱条件: 色谱柱为 Waters C18; 流动相为乙腈-PH7.0 磷酸二氢钠缓冲溶液; 柱温: 30℃; 流速: 0.8 mL/min; 进样体积: 20 μL; 检测波

长: 305 nm。泼尼松龙标准曲线的绘制: 精密称取 2 mg PSL, 用 0.025 mol/L 盐酸溶液配置成 200 μg/mL 的 PSL 溶液, 用 0.025 mol/L 盐酸溶液配成质量浓度分别为 5、10、20、40、80 μg/mL 的 PSL 标准溶液, 按照上述条件进行上样, 记录色谱图, 统计 PSL 色谱峰面积, 并以 PSL 浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线并获得回归方程。样品处理: 取 400 μL 外泌体样品, 分别加入 5 μL 质量分数为 6% Triton-X100 和 5 μL 质量浓度为 10 μg/mL 的蛋白酶 K, 混匀, 65℃水浴 40 min, 转到上样瓶中, 按照上述条件进行上样, 记录色谱图, 统计 PSL 色谱峰面积, 计算样品浓度, 得到 PSL 负载量。负载效率(%)=(PSL 负载量/PSL 投入量)×100%。

1.2.4 醋酸铀染色及透射电镜观察 mEXO<sub>PSL</sub> 的形态及大小 在 mEXO 中分别加入 1% DMSO 和 2% DMSO, 在 4℃共孵育 2 h。将 mEXO 与 DMSO 孵育后的样品以及未处理过的 mEXO 和 mEXO<sub>PSL</sub> 重悬液分别加入到等体积的、质量分数为 4%的多聚甲醛溶液中静置 25 min; 将铜网放在固定液上, 室温固定 25 min; 用滤纸吸去多余的固定液, 向铜网中滴加 100 μL 1%戊二醛溶液, 室温孵育 5 min; 吸去戊二醛溶液, 加入 100 μL 去离子水洗涤铜网, 每次洗涤 2 min, 洗涤 8 次; 向铜网滴加 100 μL 草酸铀溶液染色 5 min; 吸去多余草酸铀, 向铜网上滴加 100 μL 甲基纤维素-乙酸双氧铀溶液, 放置冰上染色 7 min; 吸去铜网上多余的甲基纤维素-乙酸双氧铀溶液, 并将铜网置于滤纸上风干, 透射电镜观察。

1.2.5 mdx 小鼠的饲养和给药 购买小鼠置于天津医科大学动物饲养中心 SPF 级饲养。将 3 周龄的 mdx 小鼠随机分成 3 组: 生理盐水组(saline)、单独泼尼松龙治疗组(PSL)和负载泼尼松龙的牛奶外泌体治疗组(mEXO<sub>PSL</sub>), 每组 4 只。各组给药剂量为 PLS 10 mg/kg, mEXO 50 mg/kg, 通过灌胃的方式进行给药。每周给药 3 次, 一共给药 8 周, 记录小鼠的体重和体长变化。将体重计归零, 将小鼠放入称量烧杯中记录体重值。反复测量体重 3 次, 取平均值作为小鼠的体重。将小鼠放置在水平台面上, 使用软尺从小鼠头部顶点测量到尾部末端, 记录体长值。反复测量体长 3 次, 取平均值作为小鼠的体长。8 周后对小鼠的肌肉和骨骼收样。

1.2.6 小鼠肌肉组织 CD68 免疫组化染色 使用自动石蜡切片机将不同治疗组小鼠肌肉组织块切成厚度约 7 μm 石蜡片, 并黏附于新的载玻片上进行免疫组化染色。56℃烘箱 20 min, 二甲苯浸泡 2 次,

单次时间 20 min,无水乙醇浸泡 2 次,单次时间 10 min。梯度脱水(95%、80%、70%和 50%无水乙醇依次各浸泡 5 min),自来水洗、双蒸水洗、PBS 洗 3 次,每次 5 min。3%过氧化氢甲醇浸泡 10min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。柠檬酸钠溶液煮沸 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。5%BSA 孵育 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。CD68 一抗(1:100 BSA 稀释)孵育过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min。DAKO 二抗孵育 1 h,DAB 染色 1 min。水洗,苏木素染色 2~3 min。水洗 5 min,盐酸酒精分化 2 s,水洗,逆梯度脱水(50%、70%、80%和 95%无水乙醇依次各浸泡 3 s)。风干、透明、中性树胶封片,于正置显微镜下观察拍照。

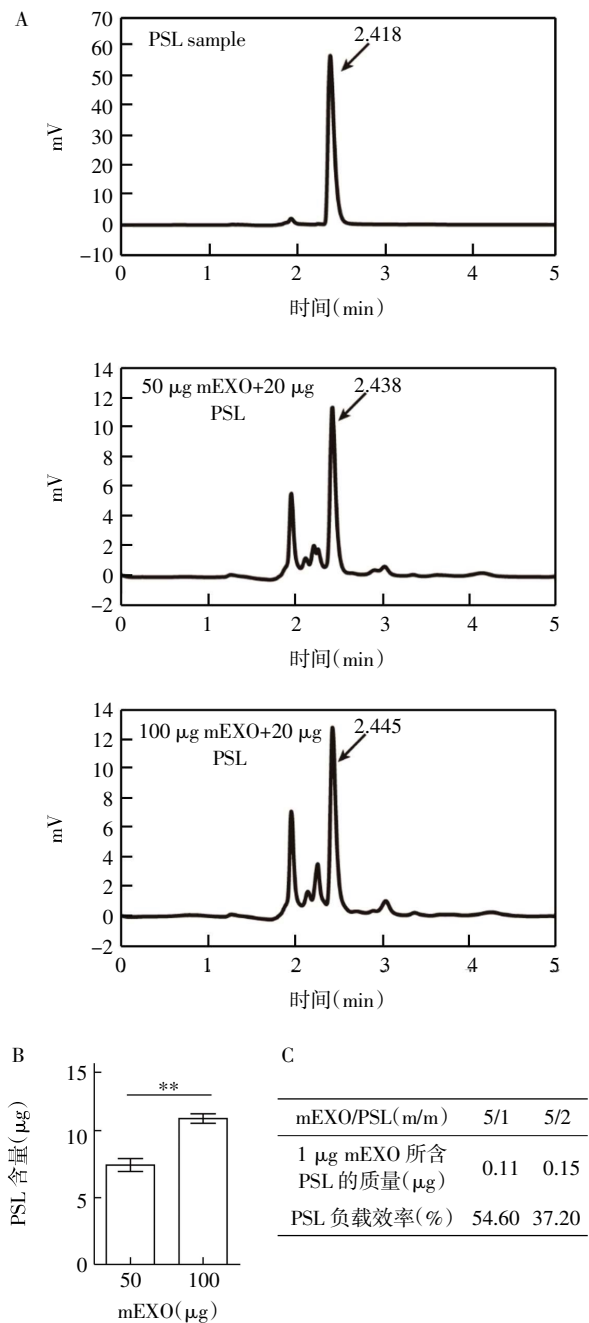
1.2.7 小鼠骨组织及肌肉 HE 染色 使用自动石蜡切片机将不同治疗组小鼠骨组织或肌肉块切成厚度约 7  $\mu\text{m}$  的石蜡片,并黏附于新的载玻片上,将载玻片置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 1.5 h,二甲苯进行脱蜡 45 min,按体积分数从高到低进行酒精梯度水化,每个梯度浸泡 5 min;使用苏木红染液对切片进行染色 13 min,用蒸馏水中进行反蓝;再用伊红染液对组织细胞质进行染色 30 s,使用蒸馏水去未结合的伊红染液;按体积分数从低到高依次进行酒精梯度脱水,二甲苯浸泡 13 min 继续脱水,使其透明;中性树胶封片,风干后置于正置显微镜下观察拍照。

1.2.8 骨小梁微结构分析 将左侧股骨从组织固定液中取出放入 50 mL 离心管中,加入 30 mL 1 $\times$  PBS 旋转清洗,20 min/次,共清洗 3 次。将骨头摆正置于 SkyScan 1276 仪器的拍摄槽中,通过微型计算机断层扫描测量小梁骨的骨密度以及微结构分析。在 55 kV 和 100  $\mu\text{A}$  下采集横向图像,股骨拍摄分辨率为 6.55  $\mu\text{m}$  旋转步长 0.5 $^{\circ}$ 。利用 SkyScan CT-Analyzer 软件分析重建的三维图像。从生长板末端向下数 100 层,对骨体积分数(骨体积/总体积,BV/TV)、骨小梁数目(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)和骨小梁间隙(Tb.Sp)4 个指标进行分析。

1.3 统计学处理 使用 Photoshop、Adobe illustrator 软件作图,使用 SPSS16.0 进行统计分析,符合正态分布的计量数据用  $\bar{x}\pm s$  差表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

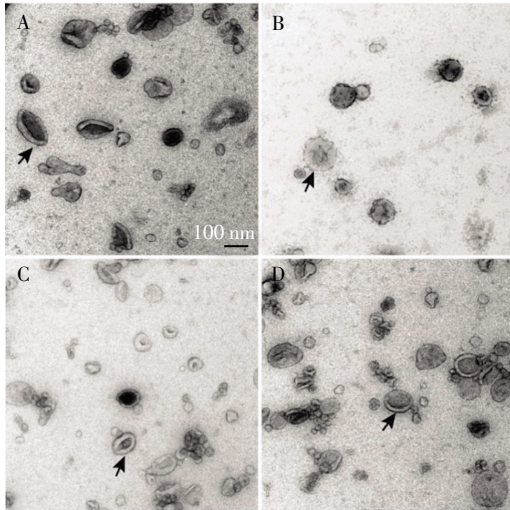
2.1 mEXO 可有效装载 PSL PSL 色谱峰图结果显示:PSL 的保留时间约为 2.4 min(图 1A)。PSL 装载效率计算结果显示:当 mEXO 与 PSL 的质量比为 5:1 时,药物装载效率约为 54.6%,当 mEXO 与 PSL 的质量比为 5:2 时,药物装载效率约为 37.2%(图 1B、1C)。最佳装载条件为 mEXO 与 PSL 质量比为 5:1。



注:PSL:泼尼松龙;mEXO:牛奶外泌体;A:PSL 色谱峰图;B:PSL 在 mEXO 中的负载量;C:PSL 负载效率;\*\*  $P<0.01$

图 1 HPLC 检测泼尼松龙装载效率  
Fig.1 HPLC to detect the loading efficiency of prednisolone

2.2 mEXO<sub>PSL</sub> 负载条件优化及表征 加入不同浓度 DMSO 的 mEXO 透射电镜结果显示:当 DMSO 的浓度为 1% 时,mEXO 的结构轮廓依旧完整清晰,当 DMSO 的浓度为 2% 时,mEXO 的结构轮廓变得模糊(图 2A、2B)。利用透射电镜观察 mEXO<sub>PSL</sub> 的形态结构,结果显示:mEXO<sub>PSL</sub> 呈典型的碗状双层膜结构,结构完整,大小均一,与 mEXO 形态无明显区别(图 2C、2D)。

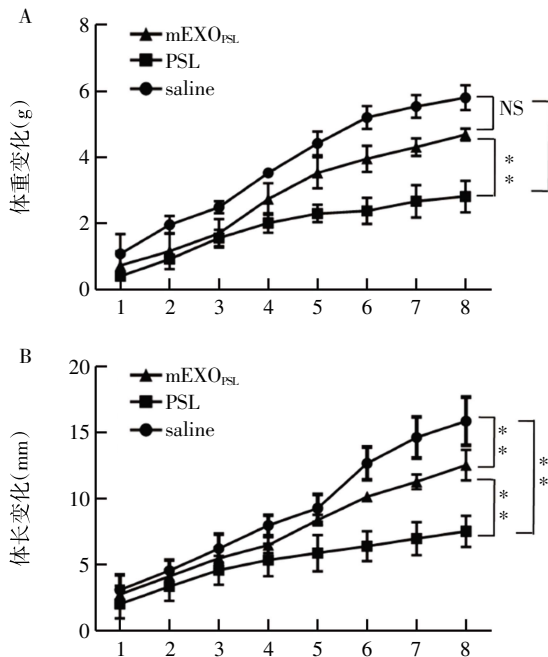


注:DMSO:二甲基亚砷;A:用1%二甲基亚砷处理过的 mEXO; B:用2%二甲基亚砷处理过的 mEXO;C:mEXO;D:负载泼尼松龙的 mEXO;图中箭头所指为单个外泌体

图 2 mEXO<sub>PSL</sub> 表征

Fig.2 Characterization of mEXO<sub>PSL</sub>.

2.3 mEXO<sub>PSL</sub> 可减轻对 *mdx* 小鼠生长发育的影响  
给药期间小鼠的体重和体长变化检测结果显示:与 PSL 组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组 *mdx* 小鼠的体重和体长均显著增加(图 3A、3B)。



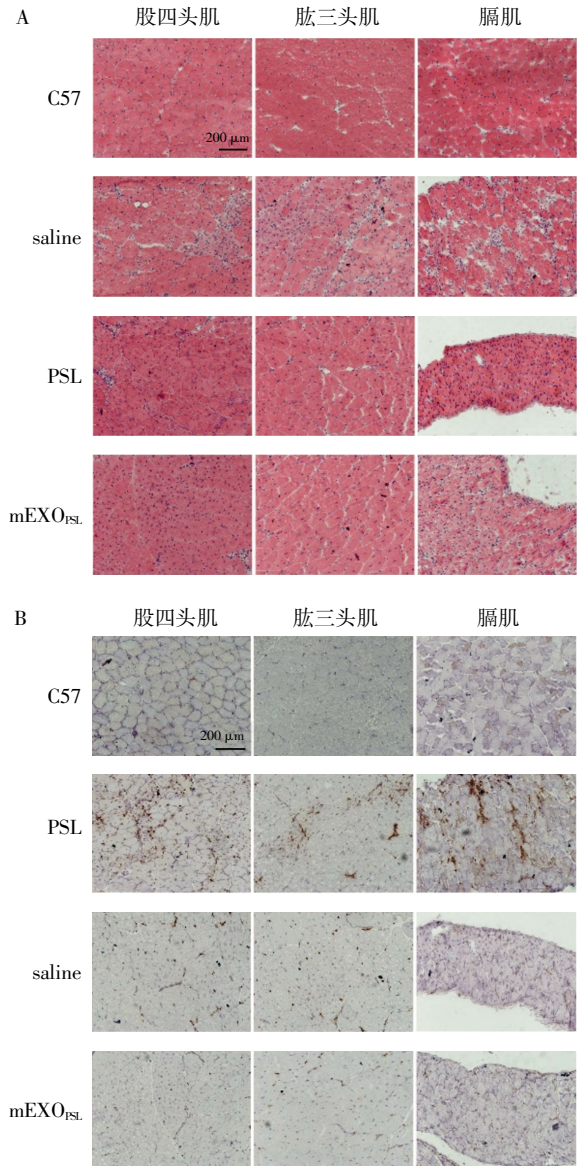
注:A:治疗中各处理组 *mdx* 小鼠的体重变化;B:治疗中各处理组 *mdx* 小鼠的体长变化; \*\*P<0.01

图 3 各治疗组 *mdx* 小鼠体重和身长变化

Fig.3 Changes in body weight and length of *mdx* mice in each treatment group

2.4 mEXO<sub>PSL</sub> 可改善 *mdx* 小鼠肌肉组织病理及炎症浸润情况  
肌肉组织 HE 染色结果显示:与生理

盐水组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 治疗组肌肉病变情况显著改善,与 PSL 组相比无显著差异(图 4A)。肌肉组织 CD68 免疫组织化学染色结果显示:与生理盐水组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组肌肉组织中炎症细胞的浸润显著减少,与 PSL 组相比无显著差异(图 4B)。

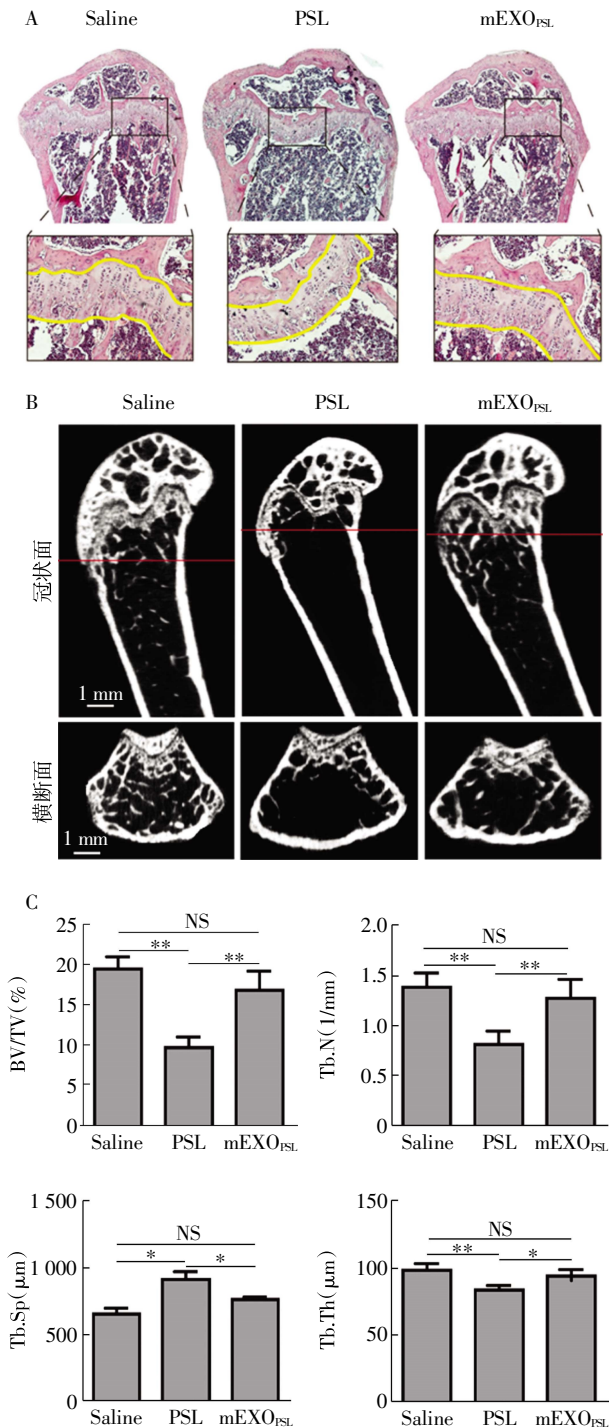


注:A:HE 染色评估治疗后不同处理组腓肠肌、肱三头肌和膈肌病理情况;B:CD68 抗体免疫组织化学染色评估治疗后不同处理组腓肠肌、肱三头肌和膈肌炎症浸润情况

图 4 mEXO<sub>PSL</sub> 的治疗效果

Fig.4 The therapeutic effect of mEXO<sub>PSL</sub> on *mdx* mice

2.5 mEXO<sub>PSL</sub> 可减轻骨质疏松不良反应  
骨组织切片 HE 染色结果显示:与 PSL 组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组股骨骨小梁数目增加,与生理盐水组无明显差异(图 5A)。microCT 结果显示:与 PSL 组相比,mEXO<sub>PSL</sub> 组 BV/TV、Tb.N 和 Tb.Th 增加,Tb.Sp 减少,与生理盐水组无明显差异(图 5B、5C)。



注:A: 治疗后各处理组 *mdx* 小鼠股骨石蜡切片 HE 染色;B: 治疗后各处理组 *mdx* 小鼠股骨 micro-CT 检测;C: micro-CT 检测骨密度参数分析;BV/TV: 骨体积分数;Tb.N: 骨小梁数目;Tb.Sp: 骨小梁间隙;Tb.Th: 骨小梁厚度; \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

图5 各治疗组 *mdx* 小鼠骨质检测

Fig.5 Bone detection of *mdx* mice in each treatment group

### 3 讨论

DMD 是一种遗传性疾病,发病年龄小,患儿 2~5 岁就开始出现全身骨骼肌进行性无力、萎缩等症状<sup>[14]</sup>,通常在十几岁时失去行走能力,并且需要通气

支持,最终死于心脏和(或)呼吸衰竭,早期诊断及干预对患者预后非常重要<sup>[15]</sup>。该疾病目前尚不能治愈,糖皮质激素是目前被证实可以改善 DMD 患儿肌力和延缓 DMD 疾病进展的药物,然而糖皮质激素的长期使用会带来明显的药物不良反应,最常见的是导致 DMD 患儿出现生长抑制(身材矮小)以及由于骨小梁缺失而引起的骨质疏松症,这些不良反应限制了糖皮质激素在 DMD 患者中的长期使用<sup>[16-17]</sup>。因此,减少糖皮质激素在 DMD 患儿治疗过程中产生的这些药物不良是十分有必要的。外泌体作为一种细胞间通讯的生物纳米粒子,其携带许多生物活性成分,可直接用于疾病的治疗或作为药物递送载体<sup>[18-19]</sup>。据报道,mEXO 中含有影响骨代谢的生物活性成分,可通过抑制破骨细胞的作用来提高骨密度,对骨质疏松具有一定的治疗效果<sup>[20]</sup>。此外,mEXO 还可作为一种理想的口服药物递送载体,包裹在 mEXO 中的物质可以以生物活性形式口服进入血液,可提供一种更方便以及对患者友好的治疗方式。

有研究报道,与生长激素和胰岛素样生长因子-1 联合使用可以减少糖皮质激素治疗 *mdx* 小鼠时发生的生长迟缓药物不良反应,但不能减少骨质的流失<sup>[9]</sup>。在本研究中,以 mEXO 作为 PSL 的递送载体经口服在 DMD 疾病模型 *mdx* 小鼠上进行系统治疗,mEXO<sub>PSL</sub> 并未影响 PSL 对 *mdx* 小鼠的抗炎治疗效果,不但显著减少了生长抑制药物不良反应,而且显著改善了骨质疏松的症状。但本研究的不足之处是缺乏对成骨细胞与破骨细胞数量及活化状态等指标的检测,未阐明骨质疏松的改善是否与成骨细胞与破骨细胞之间的相互作用有关。

本研究首先检测了 mEXO 对 PSL 的装载效率,可实现 50% 以上的载药率,证明本研究中载药方法的可行性。接着又考虑到溶解药物 DMSO 是否会影响 mEXO 的形态结构从而影响药物的治疗效果,观察了不同浓度 DMSO 对 mEXO 形态结构的影响,结果证明 DMSO 的浓度控制在 1% 以下不影响 mEXO 的形态结构。而本研究中进行 PSL 与 mEXO 共孵育时,溶液中 DMSO 的浓度远低于 1%,而且后续过超滤管还能去除游离的 DMSO,所以 DMSO 对 mEXO 的载药并无影响。接下来进行了 *mdx* 小鼠的给药治疗实验,主要观察了小鼠体重和体长的变化、小鼠肌肉病理情况以及小鼠骨密度指标,证明了 mEXO<sub>PSL</sub> 治疗的有效性。

综上所述,本研究通过体内外实验,证实了

mEXO<sub>PSL</sub>对mdx小鼠有良好的治疗效果且显著减少了mdx小鼠在PSL治疗过程中出现的生长抑制和骨质疏松药物不良反应,为DMD患者治疗以及改善生活质量提供了新思路和新策略。在后续研究中,为了更加贴近DMD患者的疾病进展情况,将在肌肉损伤程度更严重的DMD模型-dko小鼠中进行深入研究。

#### 参考文献:

- [1] SHEIKH O, YOKOTA T. Developing DMD therapeutics: a review of the effectiveness of small molecules, stop-codon readthrough, dystrophin gene replacement, and exon-skipping therapies[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2021, 30(2): 167-176.
- [2] BEZ BATTI ANGULSKI A, HOSNY N, COHEN H, et al. Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies[J]. Front Physiol, 2023, 14: 1183101.
- [3] LIU G, LIPARI P, MOLLIN A, et al. Comparison of pharmaceutical properties and biological activity of prednisolone, deflazacort, and vamorolone in DMD disease models[J]. Hum Mol Genet, 2023, 33(3): 211-223.
- [4] 宋军, 林曹瑞, 贾璐璐, 等. B族维生素对肌肉萎缩小鼠PMO运输效率的影响[J]. 天津医科大学学报, 2021, 27(5): 482-486.
- [5] MIYATAKE S, SHIMIZU-MOTOHASHI Y, TAKEDA S, et al. Anti-inflammatory drugs for Duchenne muscular dystrophy: focus on skeletal muscle-releasing factors[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 2745-2758.
- [6] WOOD C L, VAN'T HOF R, DILLON S, et al. Combined growth hormone and insulin-like growth factor-1 rescues growth retardation in glucocorticoid-treated mdx mice but does not prevent osteopenia[J]. J Endocrinol, 2022, 253(2): 63-74.
- [7] HAM D J, GARDNER A, KENNEDY T L, et al. Glycine administration attenuates progression of dystrophic pathology in prednisolone-treated dystrophin/utrophin null mice[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 12982.
- [8] LIANG Y, DUAN L, LU J, et al. Engineering exosomes for targeted drug delivery[J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3183-3195.
- [9] ZHAO X, WU D, MA X, et al. Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110237.
- [10] WU L, WANG L, LIU X, et al. Milk-derived exosomes exhibit versatile effects for improved oral drug delivery[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(4): 2029-2042.
- [11] IZUMI H, KOSAKA N, SHIMIZU T, et al. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions[J]. J Dairy Sci, 2012, 95(9): 4831-4841.
- [12] RASHIDI M, BIJARI S, KHAZAEI A H, et al. The role of milk-derived exosomes in the treatment of diseases[J]. Front Genet, 2022, 13: 1009338.
- [13] ZIMMERMAN B, KELLY B, MCMILLAN B J, et al. Crystal structure of a full-length human tetraspanin reveals a cholesterol-binding pocket[J]. Cell, 2016, 167(4): 1041-1051.
- [14] KORINTHENBERG R. A new era in the management of Duchenne muscular dystrophy[J]. Dev Med Child Neurol, 2019, 61(3): 292-297.
- [15] FALZARANO M S, SCOTTON C, PASSARELLI C, et al. Duchenne muscular dystrophy: from diagnosis to therapy[J]. Molecules, 2015, 20(10): 18168-18184.
- [16] MATTHEWS E, BRASSINGTON R, KUNTZER T, et al. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy[J]. Cochrane Db Syst Rev, 2016, (5): 876-889.
- [17] GLOSS D, MOXLEY R T, ASHWAL S, et al. practice guideline update summary: corticosteroid treatment of duchenne muscular dystrophy: report of the guideline development subcommittee of the American academy of neurology [J]. Neurology, 2016, 87(2): 238-249.
- [18] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478): aau6977.
- [19] YUN B, MABURUTSE B E, KANG M, et al. Dietary bovine milk-derived exosomes improve bone health in an osteoporosis-induced mouse model[J]. J Dairy Science, 2020, 103(9): 7752-7760.
- [20] SAMUEL M, CHISANGA D, LIEM M, et al. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth[J]. Sci Rep, 2017, 7: 5933.

(2023-12-04 收稿)