

外泌体对鱼藤酮诱导的SHSY5Y细胞损伤模型的保护作用及机制研究

杜佳巍¹, 朱丹萍¹, 罗思奇¹, 周玉菊¹, 唐婧^{2*}, 崔艳^{1*}

(¹沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; ²清华大学附属北京清华长庚医院药学部, 清华大学临床医学院, 北京 102218)

摘要: 本文旨在探讨外泌体对鱼藤酮诱导的帕金森细胞损伤模型的保护作用及机制。以新鲜生牛乳为原料, 采用超高速离心法制备外泌体并用动态光散射仪、透射电镜和蛋白质免疫印迹法进行表征, 分别观测其粒径大小、形态和标志蛋白CD63和CD9。本研究构建了鱼藤酮诱导的SHSY5Y细胞帕金森损伤模型, 通过细胞形态及活力变化确定最佳造模浓度。采用MTT法测定对照组、模型组和外泌体给药组细胞活力, 倒置显微镜观测细胞形态变化。采用JC-1染色观察线粒体膜电位的变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率。外泌体表征的结果表明, 制备的外泌体粒径大小主要分布在40~100 nm范围内, 含有其标志性蛋白CD63及CD9。鱼藤酮诱导的SHSY5Y细胞帕金森损伤模型结果表明, 0.20~2.00 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮可诱导SHSY5Y细胞损伤, 1.00 $\mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮处理24 h后的细胞形态和细胞存活率变化明显且适度。外泌体给药组细胞活力为80.34%, 明显高于模型组的59.77% ($P < 0.01$), 且外泌体给药组能明显改善细胞形态。JC-1染色结果表明, 外泌体给药组能显著缓解线粒体膜电位下降 ($P < 0.01$); 外泌体给药组凋亡率为15.01%, 与模型组的32.60%相比, 明显抑制了细胞凋亡 ($P < 0.01$)。因此, 结果表明, 外泌体对鱼藤酮诱导的帕金森细胞损伤具有明显的保护作用, 这种保护可能是通过抑制细胞凋亡来进行的。

关键词: 外泌体; 帕金森病; 保护作用; 抗凋亡

Protective effect and mechanism of exosomes on a rotenone-induced SHSY5Y cell injury model

DU Jiayi¹, ZHU Danping¹, LUO Siqu¹, ZHOU Yuju¹, TANG Jing^{2*}, CUI Yan^{1*}

(¹School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; ²Pharmacy of Beijing Tsinghua Changgung Hospital, School of Clinical Medicine, Tsinghua University, Beijing 102218, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the protective effect and mechanism of exosome on rotenone-induced SHSY5Y cell injury model. Exosomes were prepared from fresh raw bovine milk by ultra-high speed centrifugation. Then particle sizes were characterized by dynamic light scattering, the morphology of exosomes were determined by transmission electron microscope, and marker proteins CD63 and CD9 were observed by Western Blot, respectively. A rotenone-induced Parkinson's disease model in SHSY5Y cells was constructed, and the optimal modeling concentration was determined by changes in cell morphology and viability. The cell viability of the control group, model group and exosome-treated group was measured by

收稿日期: 2022-01-27

基金项目: 辽宁省教育厅2021年度科学研究经费项目(LJKZ0939); 沈阳药科大学2021年度大学生创新创业训练计划项目(X202110163015); 沈阳药科大学中青年教师事业发展支持计划(ZQN2021012)

第一作者: E-mail: d124578369w@163.com

*通信作者: 唐婧, E-mail: tjia00149@btch.edu.cn; 崔艳, E-mail: cuiyan_13@126.com

MTT method, and the cell morphological changes were observed by inverted microscope. Changes in mitochondrial membrane potential were observed by using JC-1 staining, and the rate of apoptosis was measured by flow cytometry. The results of exosome characterization showed that the particle sizes of the prepared exosomes were mainly distributed in the range of 40~100 nm, containing their hallmark proteins CD63 and CD9. The results of rotenone-induced Parkinson's disease model in SHSY5Y cells showed that 0.20~2.00 $\mu\text{mol/L}$ rotenone could induce damage in SHSY5Y cells, and the cell morphology and cell survival rate changed significantly and moderately after treatment with 1.00 $\mu\text{mol/L}$ rotenone for 24 h. The viability of exosomes treated cells was 80.34%, which was significantly higher than that of the model group (59.77%, $P<0.01$), and the exosomes treated group could significantly improve the cell morphology. The results of JC-1 staining showed that exosome administration could significantly alleviate the decrease of mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), and exosome administration significantly inhibited apoptosis by 15.01%, compared with 32.60% in the model group ($P<0.01$). The results of this study suggested that exosomes had significant protective effect against rotenone-induced cell injury, which might be achieved out by inhibiting apoptosis.

Key Words: exosomes; Parkinson's disease; protective effect; anti-apoptosis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是继阿尔兹海默症之后的第二大神经退行性疾病,其临床症状主要有静止性震颤、肌强直、运动迟缓、姿势不稳等^[1],其病理机制主要有特征蛋白错误折叠聚集沉淀、基因突变、氧化应激损伤、线粒体功能障碍、自噬等^[2-5]。目前,临床上用来治疗PD的药物包括拟多巴胺类药和中枢胆碱受体阻断药^[6],但这些治疗药物都只能暂时缓解症状,而不能阻止其退化的过程,其主要原因是由于血脑屏障限制了药物的输送效率。

外泌体(exosome, Exo)是由多种细胞分泌的直径为30~150 nm的内源性微囊泡,广泛存在于生物体液(如血浆、乳汁、尿液等)中,通过携带的蛋白质、脂类、RNA等参与细胞间的信息交流和物质交换^[7-9]。外泌体可以作为细胞通讯的信使,参与神经退行性疾病的发生及损伤修复过程,并发挥重要作用。

目前,外泌体在药物递送系统或疾病诊断两大方面应用较广^[4,10-13]。外泌体作为内源性纳米载体,不仅可以穿越血脑屏障,而且具有良好的生物相容性、低的免疫原性、潜在的靶向性等优势^[14,15]。许多研究已证实,药物经外泌体包载后其生物活性及治疗效果明显改善^[15-17],但外泌体本身是否具有生物活性或治疗效果报道较少。本文探讨了外泌体对鱼藤酮诱导的帕金森细胞损

伤模型的保护作用及可能机制,发现其本身也具有生物活性。这对于外泌体的进一步开发利用具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM培养基购自Hyclone公司。胎牛血清购自Gibco公司。胰蛋白酶、鱼藤酮、Hoechst 33342、碘化丙啶(PI)购自Sigma公司。青链霉素混合液、MTT、BCA蛋白浓度检测试剂盒、ROS检测试剂盒、AnnexinV-FITC购自索莱宝科技有限公司。JC-1、CD63/CD9抗体、山羊抗兔抗体购自碧云天生物技术有限公司。二甲基亚砜购自康科德科技有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验仪器

本研究所用主要仪器有:D超净工作台(亚太科隆仪器有限公司)、CO₂饱和湿度培养箱(Thermo Scientific)、倒置显微镜(Nikon Ts2)、透射电子显微镜(HT7700)、细胞培养皿(Costar)、流式细胞仪(LabQuantaSC Flow Cytometer)、倒置荧光显微镜(Nikon ECLIPSE Ts2R-FL)、超高速离心机(Beckman Coulter XPN700)、低速离心机(TDL-5000B,飞鸽牌)、酶标仪(BIO-RADm680)、动态光散射仪(Zetasizer Nano ZS ZEN3600)、化学发光成像仪(ChemiScope3300)。

1.3 细胞株

大鼠骨髓神经母细胞瘤细胞株细胞系为本实验室保存。

1.4 细胞培养

大鼠骨髓神经母细胞瘤细胞株SHSY5Y培养于DMEM培养基中, 内含10%胎牛血清及1%青链霉素混合液, 于37℃、5% CO₂饱和湿度条件下培养, 细胞贴壁为70%~80%时用于实验。

1.5 外泌体的分离制备

取未经任何处理的新鲜生牛乳500 mL, 采用差速离心法依次进行梯度离心^[18-20]: 4℃条件下12 000×g离心30 min除去上层油脂及下层沉淀; 取中间层在36 000×g条件下离心30 min除去沉淀; 80 000×g离心60 min除去大分子杂质蛋白; 0.22 μm滤膜滤过之后, 在4℃条件下100 000×g超高速离心180 min, 小心弃去上清。用PBS缓冲液洗涤沉淀并重悬补足体积, 再次在4℃条件下100 000×g离心70 min。弃去上清后, 沉淀即为外泌体。用100 μL PBS重悬沉淀, 分装, 冻存于-80℃。经超速离心法提取外泌体后采用BCA试剂盒测定其蛋白质浓度。

1.6 动态光散射仪(DLS)测定粒径大小

取10 μL PBS重悬的外泌体溶液用纯水稀释100倍后放入特定的检测皿中, 置于动态光散射仪中进行分析, 根据所得数据结果绘制粒径分布图。

1.7 外泌体形态测定

采用透射电镜观测外泌体的形态。PBS重悬提取的外泌体溶液稀释100倍后, 取10 μL滴于孔径2 nm的载样铜网上, 室温静置2 min, 用滤纸从滤网侧边吸干液体, 透射电镜放大100 000倍下观察、拍照。

1.8 蛋白质免疫印迹法测定标志蛋白

BCA测定外泌体蛋白浓度后, 取40~50 μg外泌体总蛋白前处理后做表面特征性蛋白CD9、CD63检测。采用12% SDS-PAGE分离胶和4%浓缩胶, 80~90 V电泳一段时间至跑出浓缩胶区域, 然后调为110~120 V电泳至溴酚蓝处于胶底位置结束。90 V恒压1.5 h转膜后, 在5%脱脂牛奶中摇床封闭1~2 h。封闭结束后, 用TBST洗涤牛奶封闭过的条带约5 min, 后将条带放入抗体孵育盒里,

CD63、CD9抗体分别用一抗稀释液稀释1 000倍后, 于4℃摇床孵育过夜。孵育完成用TBST清洗3次, 每次15 min; 清洗一抗后, 加入稀释2 500倍的山羊抗兔二抗, 室温孵育2 h。TBST洗涤后, 加入显影液, 进行显影分析。

1.9 MTT法检测鱼藤酮的细胞毒性

将浓度为 8×10^3 /mL的细胞悬液每孔100 μL接种于96孔培养板, 于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后, 加入含鱼藤酮(Rotenone, Rot)终浓度为0.20 μmol/L、0.50 μmol/L、1.00 μmol/L、2.00 μmol/L的基本培养基100 μL, 空白组仅加入基本培养基; 加药后24 h, 每孔加入0.5 mg/mL的MTT染液染色4 h后, 每孔加入150 μL DMSO溶液, 经微孔板振荡器振荡10 min后, 用酶标仪在570 nm处测其吸光值(*D*), 绘制细胞生长曲线。生长率= $D_{\text{处理组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.10 MTT法检测外泌体对Rot损伤毒性的保护作用

将浓度为 8×10^3 /mL的细胞悬液每孔100 μL接种于96孔培养板。于37℃、5% CO₂条件下培养24 h后, 空白组仅加入基本培养基, 模型组和外泌体给药组先加入含1.00 μmol/L Rot的基本培养基预处理3 h, 外泌体给药组加入含1.00 μmol/L Rot和0.30 mg/mL外泌体的基本培养基进行实验, 继续培养21 h后操作方法同1.9。

1.11 细胞形态观测

细胞以 1×10^5 /mL接种于六孔培养板预培养24 h, 分组及处理同1.10。在光学倒置显微镜明场下观察并拍照。

1.12 线粒体膜电位检测

线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)降低是细胞凋亡的早期标志。采用JC-1线粒体膜电位荧光探针观测线粒体膜电位的变化。将细胞接种在6孔板细胞培养皿中, 37℃、5% CO₂培养24 h后, 处理同1.5。加入DMEM培养基配制的5 mmol/L JC-1染液, 37℃孵育30 min, PBS清洗3次, 荧光显微镜下观察线粒体膜电位的变化并拍照记录。

1.13 流式检测凋亡

将浓度为 10×10^4 /mL的细胞悬液接种于六孔板预培养24 h; 空白组加入基本培养基, 模型组加入

含1.00 $\mu\text{mol/L}$ Rot的基本培养基,外泌体给药组先加入Rot预处理3 h后再加入Rot+外泌体,继续培养21 h。300 $\times g$ 离心10 min收集各组细胞,PBS洗1次。同样离心处理后加入1 mL $1\times$ 结合缓冲液重悬后再次离心。用PBS调整每个样品细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,混合均匀后每组分别加入5 μL Annexin V-FITC,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光15 min;上机检测前分别再加5 μL PI,混匀后4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光作用5 min;再补充PBS 200 μL ,用流式细胞仪检测。

1.14 数据统计

所有实验结果以 $\text{Mean}\pm\text{S.E.M.}$ 表示,数据进行 t 检验和方差分析。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体粒径、形态及标志蛋白表征

目前,限制外泌体发展的原因之一是其难以实现大量制备,本实验初步采用间充质干细胞制备外泌体^[21],但其产率较低,具有很大的局限性。因此,需要寻找更加安全经济的制备来源。新鲜生牛乳不仅安全性高、经济成本较低,而且能够实现较为大量的制备,其产率约为干细胞来源产率的30倍。外泌体的制备方法也有许多,如超高速离心法、超滤法、免疫亲和色谱法、聚合物沉淀法等^[22,23]。其中,超高速离心法是目前制备外泌体的金标准,纯度较高。因此,本实验采用新鲜生牛乳通过超高速离心制备外泌体并进行表

征。动态光散射仪(DLS)测定结果发现,外泌体的粒径范围主要分布在40~100 nm(图1)。透射电镜观察外泌体的形态,形态如图2所示。经Western blot测定外泌体表面特征性蛋白CD63和CD9,其中CD9相对分子质量为25 000,CD63为23 000,但CD63可能含量较少,与CD9条带相比,其颜色较浅(图3)。

2.2 鱼藤酮对SHSY5Y细胞的毒性

鱼藤酮是一种线粒体复合酶I的抑制剂。研究表明,长期接触Rot与PD发病密切相关,常被用来建立PD的体内外模型,用于研究PD的病理机制^[24,25]。本实验以正常培养的细胞为空白对照,以不同浓度Rot处理SHSY5Y细胞后,MTT法检测结果如图所示(图4),浓度为0.20 $\mu\text{mol/L}$ 、0.50 $\mu\text{mol/L}$ 、1.00 $\mu\text{mol/L}$ 、2.00 $\mu\text{mol/L}$ 的Rot处理24 h后,细胞生长率分别为79.00%、74.20%、60.50%和49.50%,Rot对SHSY5Y的毒性呈浓度依赖性。根据细胞活力及形态观察结果,最终选用1.00 $\mu\text{mol/L}$ 为最佳造模浓度。

2.3 MTT法测定鱼藤酮对SHSY5Y细胞的毒性和外泌体的保护作用

采用1.00 $\mu\text{mol/L}$ 的Rot诱导24 h后细胞损伤过度,外泌体治疗作用不显著。预实验测试过外泌体本身对细胞无显著作用,所以未加入外泌体对照组。实验结果表明,Rot预处理3 h后再加入外泌体继续作用21 h,与Rot组单独处理相比,细胞生长率从59.77%上升到80.34%,说明外泌体可以显

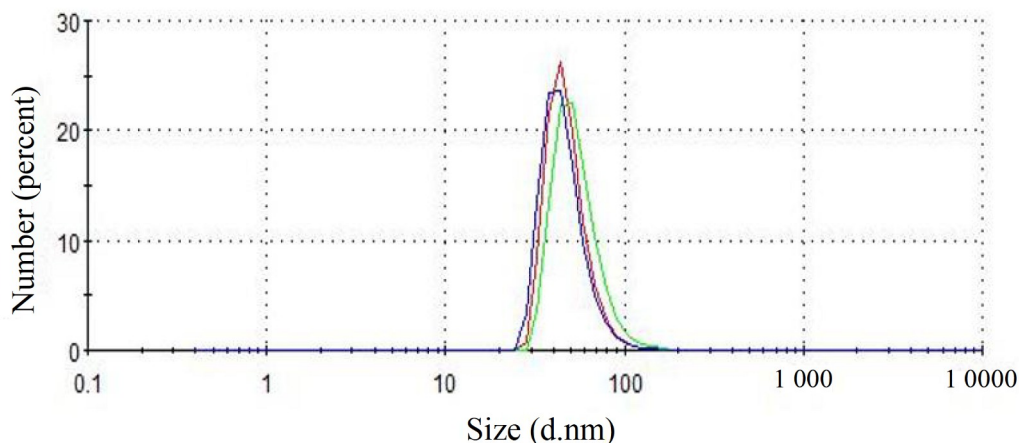


图1 用DLS测定外泌体的大小

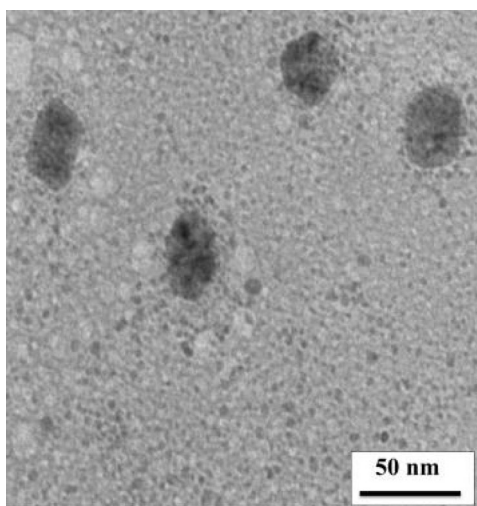


图2 外泌体的形态学

著抑制Rot引起的细胞生长率的降低(图5)。

2.4 外泌体对SHSY5Y细胞形态学的保护作用

采用倒置显微镜观测外泌体给药后对细胞形态的改善(图6), 以正常生长的细胞为空白对照。结果发现, 对照组的细胞贴壁生长良好, 细胞呈梭形, 突起较长, 细胞充分铺展; 而1.00 $\mu\text{mol/L}$

CD9 25 kDa

CD63 23 kDa

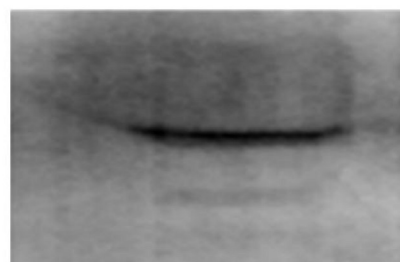
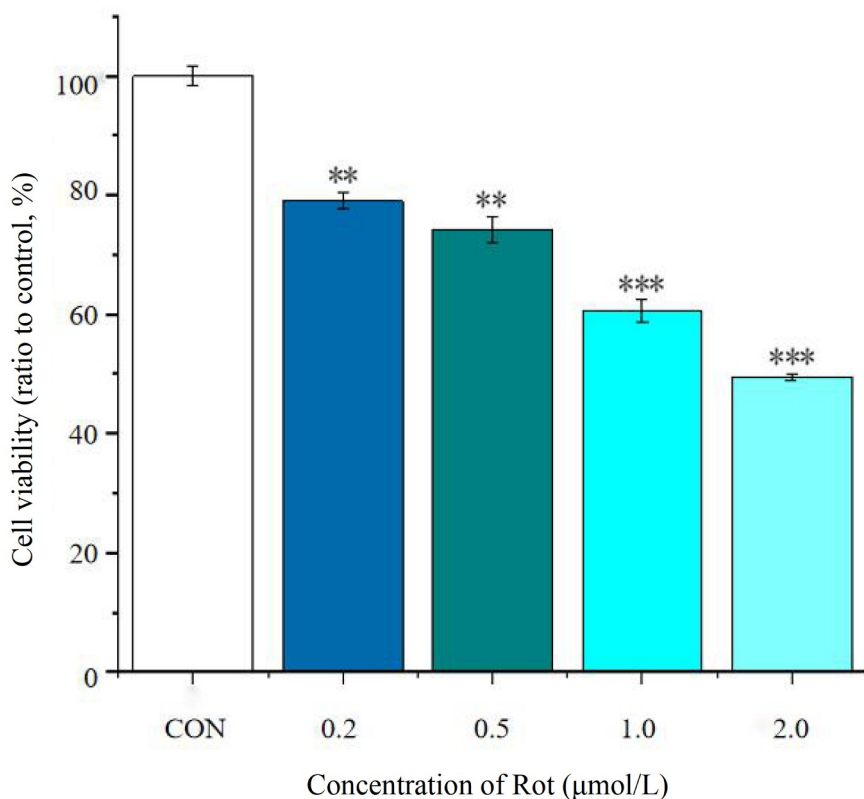


图3 Western blot检测外泌体标记蛋白

Rot处理后细胞明显突起、变小, 胞体回缩, 呈小球状, 部分细胞丧失贴壁性而悬浮于培养液中; 而外泌体给药组对Rot诱导的细胞形态的改变有明显的抑制和保护作用, 漂浮细胞数量显著减少且胞体变大, 细胞贴壁, 细胞逐渐恢复呈梭形, 突起较长, 形态得到明显改善。

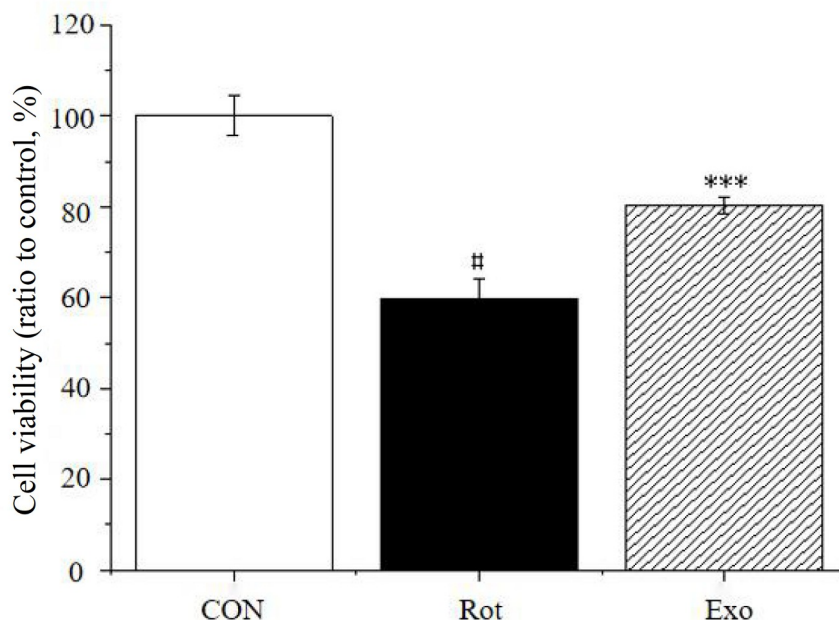
2.5 外泌体对鱼藤酮引起的胞内MMP变化的影响

线粒体膜电位(mitochondria membranepotential, MMP)降低是细胞凋亡的早期标志, MMP水平显著下降, 标志细胞进入了不可逆的凋亡过



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

图4 MTT染色法观察Rot对SHSY5Y细胞生长的抑制作用



$P<0.05$, 与对照组比较; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$, 与Rot诱导模型组比较

图5 MTT染色观察外泌体对细胞毒性的抑制作用

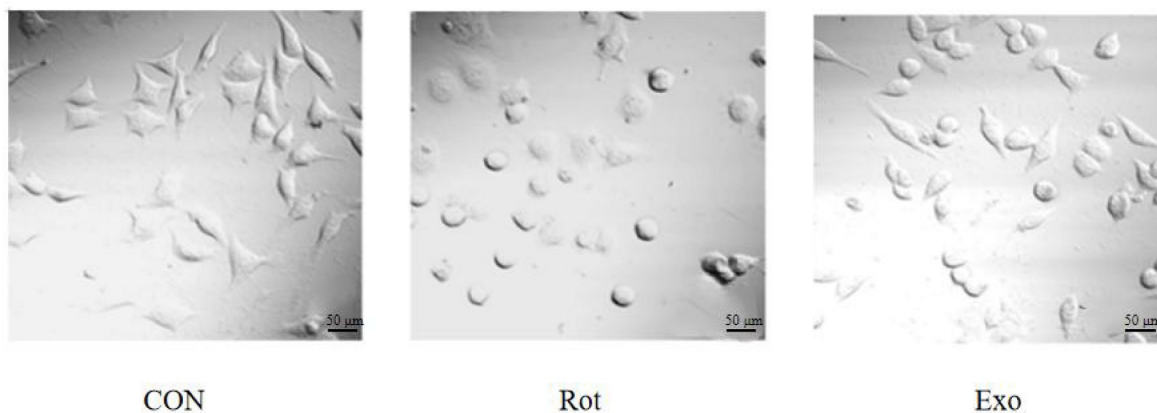


图6 外泌体对由Rot损伤的细胞形态的影响

程。JC-1是用于观测活细胞线粒体膜电位变化的一种染料,可透过细胞膜进入活细胞的线粒体。在线粒体膜电位较高时,JC-1主要聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1为单体,产生绿色荧光。通常根据JC-1探针红色荧光到绿色荧光的转变可以反映线粒体膜电位的下降,一般通过计算红绿荧光的比值变化作为检测细胞凋亡的一个指标^[26]。因此,可根据红绿荧光比值的变化间接反映MMP水平的高低,也可反映线粒体膜受损程度,即细胞受损

程度。本实验计算了红绿荧光比值结果(图7),对照组细胞中红绿色荧光比值为0.98;而模型组细胞逐渐变为圆球状,绿色荧光显著增强,红绿荧光比值下降,即线粒体膜电位下降;而当加入外泌体后,红绿荧光强度比值回升,表明MMP升高(图8)。综上,结果表明, Rot可损伤线粒体,导致MMP下降,而外泌体给药组能够显著缓解Rot引起的MMP降低,具有一定的保护作用。

2.6 外泌体对鱼藤酮诱导细胞凋亡的影响

为进一步明确外泌体对鱼藤酮诱导的帕金森

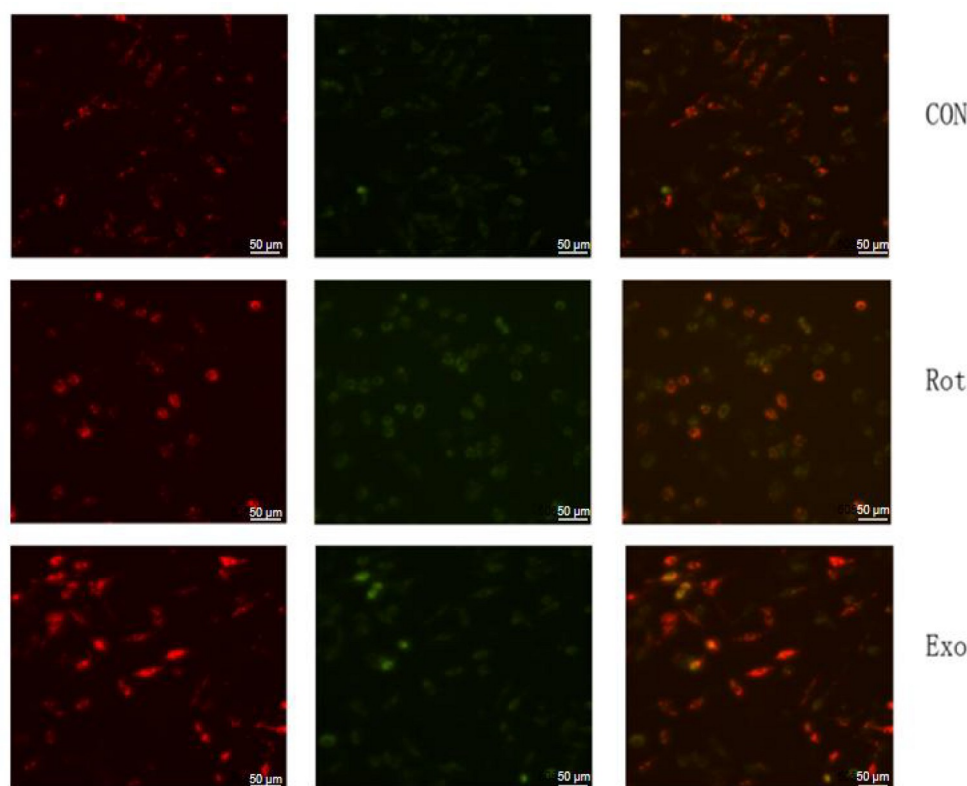
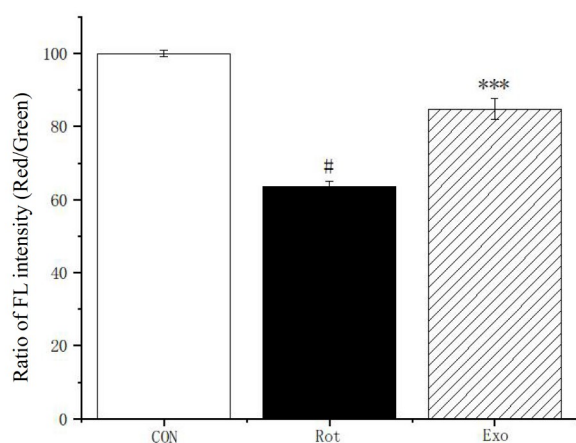


图7 荧光显微镜观察外泌体对Rot诱导的MMP抑制作用降低



$P<0.05$, 与对照组比较; *** $P<0.001$, 与Rot诱导模型组比较

图8 JC-1染色统计图

细胞损伤模型保护作用的可能机制, 采用Annexin V/PI双染法并以流式细胞术进行分析。结果显示(图9), 对照组正常细胞比例为99.30%, 这部分细胞细胞膜完整, 未发生PS外翻, 自然凋亡细胞比例占0.64%; 而经Rot处理后总凋亡细胞比例上升至32.60%, 早期凋亡细胞比例为12.70%, 晚期凋

亡细胞比例为19.90%; 外泌体给药组中, 总凋亡细胞数量下降到15.01%(早期凋亡2.01%+晚期凋亡13.00%)。由此结果可知, 与对照组相比, Rot处理细胞24 h之后, 可引起细胞发生凋亡, 且晚期凋亡比例更高; 而外泌体给药组对细胞的早期凋亡和晚期凋亡均有抑制作用, 显著抑制了Rot诱导的细胞凋亡, 使细胞凋亡率降低。

3 讨论

随着现代社会老龄化趋势发展日益显著, 全球帕金森患病率明显上升。据估计, 未来20年, 帕金森患病人数会比现在增加一倍^[27]。因此, 对PD疾病的防治研究需要探寻新的解决途径。外泌体是可穿越血脑屏障的内源性囊泡, 且参与了神经退行性疾病的调控过程。研究表明, 干细胞来源的外泌体具有良好的生物活性^[28], 但细胞来源外泌体产率较低。因此, 本实验探究了牛奶来源外泌体对鱼藤酮诱导的细胞损伤模型的保护作用。结果表明, 牛奶外泌体也具有良好

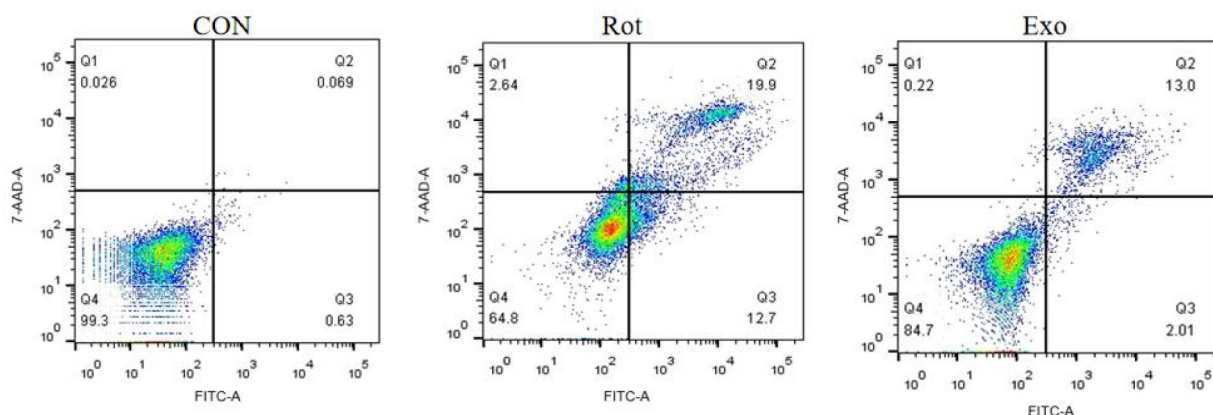


图9 流式细胞术检测外泌体对Rot诱导的细胞凋亡的抑制作用

生物活性,不仅可以显著改善细胞的形态及活力、抑制线粒体膜电位降低,还可以抑制细胞早期凋亡和晚期凋亡,且其产率相对较高。外泌体发挥的保护作用可能与其作为一种新型的细胞间交流方式,在中枢神经系统参与形成神经元-胶质信号网络,并在中枢神经系统疾病的发病及损伤修复中发挥重要的调控作用。

本研究揭示了牛奶来源外泌体对神经细胞损伤具有保护活性和可能的作用机制,表明其自身具有防治帕金森病的潜质,但是牛奶来源外泌体在动物和人体内是否具有相同的神经保护作用还需进一步开展相关研究。外泌体作为一种优良的内源性纳米载体,药物经其包载后生物活性和治疗效果显著提高,可能也与外泌体自身具有生物活性有关。但是,外泌体形成的过程中,如何对进入的物质进行筛选,以及影响外泌体分泌的因素有哪些,具体的机制是什么还需要进一步研究。外泌体如何作用于靶细胞,通过何种方式对靶细胞进行调控,具体的机制如何也有待探索。外泌体自身活性对包载药物药效提高的贡献和机制如何尚不清楚。总之,外泌体是目前生物医学领域研究的重点和热点,但对其研究深度不够,需要生物医学工作者们投入更多的人力、物力从其自身特性与应用两方面同时进行探索,以期早日应用到临床诊断与疾病治疗。

参考文献

[1] Nguyen M, Wong YC, Ysselstein D, et al. Synaptic, mitochondrial, and lysosomal dysfunction in Parkinson's

disease. *Trends Neurosci*, 2019, 42(2): 140-149

- [2] Azmy MS, Menze ET, El-Naga RN, et al. Neuroprotective effects of filgrastim in rotenone-induced Parkinson's disease in rats: insights into its anti-inflammatory, neurotrophic, and antiapoptotic effects. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6572-6588
- [3] Kanthasamy A, Jin H, Charli A, et al. Environmental neurotoxicant-induced dopaminergic neurodegeneration: a potential link to impaired neuroinflammatory mechanisms. *Pharmacol Ther*, 2019, 197: 61-82
- [4] Lu J, Xu Y, Quan Z, et al. Dysregulated microRNAs in neural system: implication in pathogenesis and biomarker development in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2017, 365: 70-82
- [5] Vargas JY, Grudina C, Zurzolo C. The prion-like spreading of α -synuclein: from *in vitro* to *in vivo* models of Parkinson's disease. *Ageing Res Rev*, 2019, 50: 89-101
- [6] Kuo YC, Rajesh R. Current development of nanocarrier delivery systems for Parkinson's disease pharmacotherapy. *J Taiwan Institute Chem Engineers*, 2018, 87: 15-25
- [7] Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 328-334
- [8] Chen BY, Sung CWH, Chen C, et al. Advances in exosomes technology. *Clinica Chim Acta*, 2019, 493: 14-19
- [9] Das CK, Jena BC, Banerjee I, et al. Exosome as a novel shuttle for delivery of therapeutics across biological barriers. *Mol Pharm*, 2019, 16(1): 24-40
- [10] Yu H, Sun T, An J, et al. Potential roles of exosomes in Parkinson's disease: from pathogenesis, diagnosis, and treatment to prognosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 00086

- [11] Buratta S, Chiaradia E, Tognoloni A, et al. Effect of curcumin on protein damage induced by rotenone in dopaminergic PC12 cells. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2761-2774
- [12] Donoso-Quezada J, Guajardo-Flores D, González-Valdéz J. Exosomes as nanocarriers for the delivery of bioactive compounds from black bean extract with antiproliferative activity in cancer cell lines. *Mater Today-Proc*, 2019, 13: 362-369
- [13] Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release*, 2015, 207: 18-30
- [14] Qu M, Lin Q, Huang L, et al. Dopamine-loaded blood exosomes targeted to brain for better treatment of Parkinson's disease. *J Control Release*, 2018, 287: 156-166
- [15] Pascucci L, Coccè V, Bonomi A, et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit *in vitro* tumor growth: a new approach for drug delivery. *J Control Release*, 2014, 192: 262-270
- [16] Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in danio rerio. *Pharm Res*, 2015, 32(6): 2003-2014
- [17] Kalani A, Kamat PK, Chaturvedi P, et al. Curcumin-primed exosomes mitigate endothelial cell dysfunction during hyperhomocysteinemia. *Life Sci*, 2014, 107(1-2): 1-7
- [18] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*, 2016, 371(1): 48-61
- [19] Vaswani K, Mitchell MD, Holland OJ, et al. A method for the isolation of exosomes from human and bovine milk. *J Nutr Metab*, 2019, 2019: 1-6
- [20] Luo S, Sun X, Huang M, et al. Enhanced neuroprotective effects of epicatechin gallate encapsulated by bovine milk-derived exosomes against Parkinson's disease through antiapoptosis and antimitophagy. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(17): 5134-5143
- [21] Oh SH, Kim HN, Park HJ, et al. Mesenchymal stem cells inhibit transmission of α -synuclein by modulating clathrin-mediated endocytosis in a parkinsonian model. *Cell Rep*, 2016, 14(4): 835-849
- [22] Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 2019, 8(7): 727
- [23] Pocsfalvi G, Stanly C, Fiume I, et al. Chromatography and its hyphenation to mass spectrometry for extracellular vesicle analysis. *J Chromatography A*, 2016, 1439: 26-41
- [24] Lin D, Liang Y, Zheng D, et al. Novel biomolecular information in rotenone-induced cellular model of Parkinson's disease. *Gene*, 2018, 647: 244-260
- [25] 刘国安, 吴亚楠, 董欢, 等. 原花青素对鱼藤酮诱导PC12细胞损伤的保护作用及机制研究. 西北师范大学学报, 2018, 54(3): 57-64
- [26] Han L, Wang YL, Sun YC, et al. *tert*-Butylhydroperoxide induces apoptosis in RAW264.7 macrophages via a mitochondria-mediated signaling pathway. *Toxicol Res*, 2018, 7(5): 970-976
- [27] Johnson ME, Stecher B, Labrie V, et al. Triggers, facilitators, and aggravators: redefining Parkinson's disease pathogenesis. *Trends Neurosci*, 2019, 42(1): 4-13
- [28] 张宁, 张荣佳, 孙学军, 等. 外泌体在中枢神经系统疾病中的研究进展. 第二军医大学学报, 2016, 37(12): 1524-1527