

# 母乳外泌体的研究及临床应用

张灿东<sup>1</sup>, 马龙飞<sup>2</sup>

<sup>1</sup>济宁医学院临床医学院附属医院, 山东 济宁

<sup>2</sup>济宁医学院附属医院关节与运动医学科, 山东 济宁

收稿日期: 2026年2月25日; 录用日期: 2026年3月19日; 发布日期: 2026年4月7日

## 摘要

母乳是新生儿的理想营养来源。除供给营养外, 母乳中还含有大量纳米级细胞外囊泡, 即外泌体。母乳外泌体携带蛋白质、微小核糖核酸(miRNAs)等多种功能分子, 行使多种生物学功能, 不仅参与调控机体免疫系统与肠道菌群的平衡, 还可作为新型药物递送载体, 跨越胃肠道屏障等生物屏障, 靶向作用于目标组织, 是极具潜力的药物递送系统。本文综述将阐述母乳外泌体的组成成分及其影响因素, 同时探讨母乳外泌体作为疾病诊断生物标志物及天然药物递送载体的应用价值。随着对母乳外泌体生理功能与作用机制研究的不断深入, 其在疾病诊断、药物递送及营养补充领域展现出广阔的应用前景, 有望为健康相关生存质量提升及疾病治疗提供新的策略。

## 关键词

母乳外泌体, 外泌体

# Research and Clinical Application of Breast Milk Exosomes

Candong Zhang<sup>1</sup>, Longfei Ma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Clinical Medicine, Jining Medical University Affiliated Hospital, Jining Shandong

<sup>2</sup>Department of Joint and Sports Medicine, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining Shandong

Received: February 25, 2026; accepted: March 19, 2026; published: April 7, 2026

## Abstract

Breast milk is the perfect nutrition for new life. In addition to providing nutrition, breast milk contains a large number of nanosized extracellular vesicles called exosomes. Breast exosomes carry a variety of functional molecules such as proteins, miRNAs, etc., and play different roles, which are involved in affecting the immune system and gut microbiota, and can also be used as a novel vehicle

文章引用: 张灿东, 马龙飞. 母乳外泌体的研究及临床应用[J]. 临床个性化医学, 2026, 5(2): 226-247.

DOI: 10.12677/jcpm.2026.52122

for drug delivery across biological barriers such as gastrointestinal barriers to reach the target tissues, making it a promising vehicle for drug delivery. In this review, we will discuss the composition of milk exosomes and the factors that influence its composition. In addition, we discussed the diagnostic biomarker of breast milk exosomes in disease and as natural drug delivery carriers. With the in-depth study of the physiological functions and mechanisms of breast milk exosomes, breast milk exosomes show great promise for applications in disease diagnosis, drug delivery, and nutritional supplementation, and are expected to be used in health-related quality of life and disease treatment.

## Keywords

Breast Milk Exosomes, Exosomes

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

外泌体是细胞分泌的直径约为 30~150 纳米级胞外囊泡, 结构类似于细胞, 磷脂双分子层表面, 它们的膜具有脂质双层结构, 通常在透射电子显微镜下通常呈圆形或杯状。外泌体内部搭载着多种蛋白质、RNA、DNA 等重要生物信号物质, 广泛分布于血液、尿液、脑脊液、唾液、乳汁、胆汁等各种体液中。这其中乳汁中的外泌体丰富较高。母乳中含有的碳水化合物、脂质、蛋白质、维生素、矿物质、免疫蛋白、益生菌过去的研究表明母乳中含有碳水化合物、脂质、蛋白质、维生素、矿物质、多种人体不能合成且必须的微量元素(钙、镁、硒等)等营养物质和免疫蛋白、生长因子、溶菌酶、益生菌等活性物质等几乎涵盖了婴儿生长发育所需的全部营养物质, 对婴儿的健康和发育有着重要作用。近年的研究发现人乳和牛乳等多种母乳中除了含有人们所熟知的营养成分外还含有大量由乳腺上皮细胞及其相关免疫细胞分泌的外泌体并称之为乳外泌体 Milk-derived exosomes (MDEs) [1]-[7]。

近来的研究表明其还含有母乳外泌体这种活性成分对婴儿生长发育乃至其他疾病诊断和治疗都有着极其重要的作用[1] [2]。

母乳外泌体同其他外泌体一样为直径 30~150 nm 的包裹蛋白质、核酸、脂质等物质并可保护包裹在其中的生物活性物质不被细胞外降解的细胞外囊泡, 因此在输送易被降解的药物治疗方面有着广泛的前景[3] [4]。同时, 母乳外泌体有着生物相容性高、免疫原性低、稳定性高和耐受性高等优点[5]。

本文结合母乳外泌体的最新研究综述了母乳外泌体的组成成分、提取方法、载药、生物利用、疾病诊断和治疗等方面的最新研究进展。母乳外泌体主要装载核酸、蛋白质、脂质及其他活性成分在靶细胞或靶器官中发挥作用; 可通过共孵育、超声、电穿孔等方法实现对药物的装载并且有着很好的生物利用度; 在癌症、胃肠疾病和肌肉骨骼疾病等方面展现出优良的治疗效果。最后我们讨论了目前母乳外泌体在临床应用中的机遇和挑战, 旨在为开发基于母乳外泌体的各种疾病的药物递送策略提供线索。

## 2. 外泌体起源

早期核内体把货物集中到其自身的这一过程中循环蛋白逐渐被管状结构域移除[8]-[15]。下一步, 多囊泡核小体(MVBs)从细胞外周移动到细胞中心, 这是 MVBs 逐渐成熟的过程, 在细胞中心 Rab7 把 Rab5 迅速取代完成 Rab5-Rab7 转换, Rab5-Rab7 转换是早期核内体转变为晚期核内体的机制及 MVBs 趋向成熟的标志[16]。最终 MVBs 有两种归宿, 一种与溶酶体融合被降解; 另一种与细胞膜融合, 分泌腔内囊泡

(ILVs), 又称外泌体, 里面的货物也随着外泌体分泌到细胞外[14][17][18]。这就是母乳外泌体等大部分外泌体的形成过程, 主要发挥生物学作用的是其装载的货物。

在细胞内, 外泌体是通过内体系统产生的。首先, 质膜通过出芽作用进入细胞内成为早期核内体(Early endosome)是由空泡结构域(vacuolar domains)和管状结构域(tubular domains)通过广泛连接组成的多形性结构(pleiomorphic structure)就是最初的核内体即早期核内体。在细胞内, 早期核内体阶段主要对集聚的货物进行分拣和决定其下一步的去向, 把需要回收的货物先暂时与核内体的外周管状结构域结合, 随后通过与高尔基网等融合从而使其脱离核内体; 把不需要回收的货物集中在核内体的空泡结构域内积聚的腔内囊泡上, 从而产生多囊泡核小体(MVBs)即晚期核内体(late endosome), 货物跟随多囊泡核小体进入成熟阶段[13]-[15]。随着内体的成熟, 其内部形成多囊泡体(MVBs), MVBs 中的一些小囊泡会与细胞膜融合, 将囊泡内的外泌体释放到细胞外环境。母乳主要是由乳腺上皮细胞分泌, 乳腺上皮细胞在哺乳期发挥关键作用。这些细胞积极合成和分泌乳汁成分, 其中包括外泌体。除了乳腺上皮细胞外, 母乳中的一些免疫细胞(如巨噬细胞、淋巴细胞等)也会分泌外泌体。此外, 免疫细胞母乳中的免疫细胞在抵御外界病原体入侵以及维持婴儿肠道免疫稳态方面有重要作用。这些免疫细胞在激活状态下或者在正常生理状态下也会产生外泌体。

### 3. 乳外泌体的组成

乳液外泌体同其他来源的外泌体组成成分相似, 由脂质双分子层分隔的囊泡装载着蛋白质、脂质、DNA、RNA 等货物分子组成, 母乳外泌体的货物分子是在细胞内形成跟随外泌体一起分泌到细胞外并表达其来源细胞特性和在靶细胞执行一系列生理功能的分子[19]。

#### 3.1. 核酸

核酸包括 DNA 和 RNA, 外泌体中携带的主要核酸为 RNA。RNA 携带来自 DNA 的信息, 在调节基因表达和细胞功能中发挥重要作用。DNA 将基因信息通过 mRNA 转移到蛋白质。RNA (核糖核酸)主要类型有作为蛋白质合成模板的 mRNA (信使 RNA)、核糖体的主要成分 rRNA (核糖体 RNA)、运输氨基酸的 tRNA (转运 RNA)、调控基因表达的 miRNA (微小 RNA)、lncRNA (长链非编码 RNA)、snRNA (小核 RNA)等。外泌体中含有多种 RNA, 近年研究人员通过 RT-PCR 技术证明了乳外泌体中存在多种外泌体 mRNA [20]。母乳外泌体中的 mRNA 在受体细胞中翻译表达, 从而影响受体细胞中蛋白质的合成。lncRNAs、microRNA 等各种小 RNA 作为母乳外泌体装载的主要货物被运送到受体细胞内, 在受体细胞内通过调节或抑制特定基因的表达来参与受体细胞内基因表达的调控[21][22]。例如, microRNA (又称 miRNA)是母乳外泌体中装载的一种非常重要的货物, 调节超过 60% 的人类基因的表达[23]。microRNA 是一种可以调控 DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观遗传编程的生物活性成分, 研究发现其大量存在于乳外泌体中。目前在乳外泌体中已发现了包括 miR-155、-146a、-223 和-181a 等免疫相关的 microRNA 在内的约 2000 种 microRNA [20][24][25]。microRNA 是非编码 RNA 序列, 在基因转录之后的阶段起调控作用, 但这些调节过程的机制尚不明确[26]。研究表明乳外泌体中的 microRNA 有着阻止溃疡性结肠炎严重表型的出现从而对这种自身免疫性疾病的发生可以起到保护作用 and 调节癌细胞增殖等功能[27]。此外, microRNA 的表达谱受不同泌乳期、早产、剖腹产、产妇肥胖、糖尿病、孕妇应激等多种因素影响[24][28]。microRNA 可以调节参与包括能量代谢、免疫功能和认知发育在内的多种生理过程的基因表达[26][29]。因此, 研究 HBM miRNA 对于妊娠和婴儿早期的疾病预防及治疗具有重要意义。总之, mRNA 调控受体细胞的蛋白质合成, microRNA 和 lncRNA 则调控受体细胞的基因表达和细胞功能, 这些核酸成分是母乳外泌体发挥各种作用的重要成分, 有着重要的生物学意义。

### 3.2. 蛋白质

母乳外泌体中主要含有信号蛋白、生长因子、炎症调节蛋白、免疫调节蛋白等蛋白质[30][31]。母乳外泌体所携带的信号蛋白的主要功能是参与细胞内部及细胞与细胞之间的信号传导, 这些信号蛋白跟随母乳外泌体被递送到受体细胞通过激活或抑制细胞内的特异性信号通路来实现对细胞增殖、分化、生长、运动、存活、凋亡等一系列生理活动的调节; 生长因子被母乳外泌体递送到受体细胞后通过与受体细胞表面的受体结合进而激活细胞内的信号传递系统, 如 Ras/Raf/MEK/ERK、JAK/STAT、PI3K/pAKT 等, 这些信号通路诱导蛋白的合成, 促进细胞的增殖、分化和存活, 在组织修复和再生方面发挥着重要的作用[30]-[32]。炎症调节蛋白被外泌体递送至受体细胞通过调节免疫细胞的活性和功能、促进或抑制炎症因子的产生、参与信号转导和基因表达调控等机制进而抑制或调节炎症反应, 从而起到在维持机体免疫平衡和防御病原体的作用; 免疫调节蛋白在维持免疫平衡中发挥着核心作用, 它们通过激活或抑制免疫细胞的活性、促进或抑制炎症因子的产生以及调节免疫反应的强度来保持机体的免疫稳态。总之, 母乳外泌体中含有参与细胞增殖与分化、免疫保护和免疫调节的信号蛋白、生长因子、炎症调节蛋白等多种蛋白质[30][31]。

### 3.3. 脂质

脂质是外泌体的关键组成成分, 它们在维持膜结构的稳定性中扮演着至关重要的角色, 从而保护其所携带的货物免受降解和破坏。特别是在保护生物活性成分方面, 脂质发挥着核心作用。外泌体的主要脂质成分包括鞘磷脂、胆固醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和神经酰胺, 以及包含鞘磷脂和胆固醇在内的脂筏[30][31][33]。鞘磷脂在外泌体中富集, 与细胞膜的结构和信号传导密切相关; 胆固醇对于维持膜的流动性和稳定性至关重要; 磷脂酰丝氨酸参与细胞凋亡和吞噬作用; 而磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺作为外泌体膜的主要成分, 与鞘磷脂和胆固醇共同维持外泌体膜的结构和功能[33]。当外泌体到达受体细胞时, 脂质被脂质裂解酶降解, 释放出的货物随后被受体细胞利用[34]。这些脂质成分不仅在外泌体的形成和功能中起着重要作用, 也影响着外泌体与其他细胞的相互作用, 因此它们在外泌体的生物医学研究和潜在临床应用中具有重大意义[33]。这些成分至关重要, 提取外泌体是获取这些物质的第一步, 也是最关键的一步。

## 4. 乳外泌体的分离纯化

外泌体的提取方法包括超速离心法、密度梯度离心法、尺寸排阻色谱法、微滤技术、商业沉淀法、柱基外泌体分离试剂盒等。然而母乳中含有大量理化性质和 MDEs 十分相似的乳脂球和酪蛋白胶束这样的特殊成分, 特别是这些物质的大小与外泌体有重合, 这些物质的大量存在严重影响在母乳中提取高纯度的 MDEs。一般的外泌体提取方法不能很好地将这些母乳中特有的成分完全去除, 所以从母乳中提取到纯度较高的母乳外泌体具有挑战性。虽然现有的很多方法可以将牛奶中的酪蛋白除去, 例如离心法、乙酸沉淀法、EDTA 沉淀法、糜蛋白酶处理和钙离子螯合等方法, 研究发现乙酸沉淀法去除酪蛋白后获得的外泌体纯度最高[20][35]-[37]。但是, 经过这些过程处理后的母乳外泌体是否还能保留原来的功能和完整性或是在多大程度上保留原有功能仍然是未知的, 所以解决此问题仍需要对以上方法进行验证或者挖掘更好的方法。此外, 去除母乳中的细胞和细胞碎片也是提取高纯度母乳外泌体的一大困难。总之, 很多常规的方法可能无法提取出纯度较高的母乳外泌体, 母乳外泌体的提取与纯化比在其他体液、细胞上清液中提取外泌体更困难, 还需要研究者做进一步的优化和挖掘更好的方法[38]。目前已应用的乳外泌体提取方法包括超速离心法、密度梯度离心法(蔗糖和 Opti-prep)、沉淀法(ExoQuick)、超滤法和免疫亲和方法等。以下对这几种方法做简要介绍。(见表 1)

**Table 1.** Exosome extraction methods**表 1.** 外泌体提取方法

提取方法	优点	缺点
超速离心法(差速离心 + 密度梯度离心)	1) 经典方法, 应用广泛, 认可度高; 2) 可获得较高纯度的外泌体, 能有效分离外泌体与其他亚细胞结构(如微囊泡、蛋白质聚集体); 3) 对样本体积适应性较强, 可处理少量或大量样本; 4) 无需添加化学试剂, 能最大程度保留外泌体的天然结构和生物活性。	1) 操作复杂繁琐, 耗时较长(通常需数小时至数十小时); 2) 需依赖昂贵的超速离心机, 设备成本高, 基层实验室难以普及; 3) 离心过程中高转速可能导致外泌体膜结构损伤, 影响其功能; 4) 回收率相对较低, 多次离心易造成外泌体丢失; 5) 可能存在蛋白质污染, 需结合后续纯化步骤。
聚合物沉淀法(如 PEG 沉淀法)	1) 操作简单便捷, 无需特殊仪器, 门槛低, 适合基层实验室使用; 2) 耗时短, 快速高效, 可在短时间内完成批量样本处理; 3) 成本低廉, 聚合物试剂易获取; 4) 样本体积适应性广, 对少量和大量样本均适用; 5) 对于外泌体的损伤较小, 能较好保留其生物活性。	1) 纯度较低, 易受蛋白质、脂蛋白等杂质污染, 难以有效分离外泌体与其他囊泡; 2) 沉淀过程中可能形成聚合物-外泌体复合物, 影响后续外泌体的分离纯化; 3) 残留的聚合物试剂可能对后续实验(如细胞培养、分子生物学检测)产生干扰; 4) 不同样本类型的优化参数差异较大, 批间重复性较差。
免疫亲和捕获法(如磁珠法)	1) 特异性极高, 可通过外泌体表面特异性标志物(如 CD63、CD81、CD9)精准捕获目标外泌体, 纯度接近 100%; 2) 分离过程温和, 对于外泌体结构和生物活性损伤极小; 3) 可实现外泌体的快速分离, 操作流程相对简便; 4) 能有效避免蛋白质、其他囊泡等杂质的污染。	1) 成本高昂, 特异性抗体和磁珠试剂价格昂贵, 不适合批量样本处理; 2) 回收率较低, 仅能捕获表达特定标志物的外泌体, 可能丢失部分亚型外泌体; 3) 样本处理量有限, 难以处理大量样本; 4) 抗体可能影响外泌体表面标志物的活性, 对后续功能研究产生干扰。
尺寸排阻色谱法(SEC)	1) 纯度较高, 可根据粒子尺寸差异精准分离外泌体与小分子杂质(如蛋白质、盐类); 2) 分离过程温和, 采用缓冲液洗脱, 对于外泌体结构和生物活性损伤小; 3) 操作相对简单, 可实现自动化分离, 批间重复性好; 4) 洗脱液成分温和, 无化学试剂残留, 不影响后续实验。	1) 耗时较长, 单次分离需数小时; 2) 设备成本较高, 需专用的尺寸排阻色谱仪; 3) 样本处理量有限, 通常适合少量样本分离; 4) 难以有效分离外泌体与尺寸相近的微囊泡, 可能存在少量囊泡污染。
超滤法	1) 操作简便快速, 耗时较短; 2) 设备成本相对较低, 易于普及; 3) 可实现浓缩与分离同步进行, 适合低浓度样本的富集; 4) 对样本体积适应性较广, 可处理少量或中等体积样本。	1) 纯度较低, 易受蛋白质、大分子聚合物等杂质污染; 2) 超滤膜孔径选择不当可能导致外泌体丢失或杂质残留; 3) 高压过滤过程可能对外泌体膜结构造成损伤; 4) 超滤膜易堵塞, 影响分离效率和重复性。

#### 4.1. 差速离心法

超速离心法(差速离心法)是如今提取外泌体最普遍的方法, 也是行业内公认外泌体提取的金标准。此程序, 第一步, 将母乳样品进行低速离心, 大的凋亡碎片和死亡细胞可以在这个速度下沉降进而被清除。第二步, 中间速离心, 以进一步去除更小的细胞碎片和大的囊泡。第三步, 进行超速离心, 可能需要持

续好几个小时, 即可收集外泌体。超速离心可以采用固定的转速或者连续梯度的转速。第四步, 使用适当的缓冲液将沉淀重悬, 常用的缓冲液为磷酸盐缓冲液(PBS), 将重悬后的外泌体样本储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用, 以保持其稳定性和生物活性。研究表明经 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存 18 个月后的母乳外泌体生物活性不受影响[38]-[41]。

Radha Munagala 等人在 2015 年设计出了一种用于提取母乳外泌体的超速离心法并成功提取出了牛乳外泌体, 以下是 Radha Munagala 等人分享的超速离心法提取牛乳外泌体的具体方法和参数。第一步, 将牛乳样品在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $13,000 \times g$  的速度离心 30 分钟, 用于去除脂肪球、酪蛋白聚集物等碎片, 之后用奶酪布收集乳清。第二步, 将第一步收集的上清在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $10 \text{ 万} \times g$  的速度离心 60 分钟, 用于去除大颗粒和微囊泡, 从顶部小心地移除大约半数上清液并丢弃下部的沉降物。第三步, 将上一步的上清液在  $4^{\circ}\text{C}$  下以  $135,000 \times g$  的速度离心 90 分钟, 丢弃上清液。第四步, 用 PBS 洗涤获得的外泌体颗粒 3 次, 将外泌体颗粒重新悬浮于 PBS 中, 形成均质悬浮液, 过滤至  $0.22 \mu\text{m}$  进行灭菌, 保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 中备用。该方法很好地去除了酪蛋白聚集物等蛋白质杂质进而显著提高了外泌体的纯度。并且经济高效, 因为它不需要任何过滤或蔗糖密度梯度纯化。此方法是相对简便和低成本的外泌体提取方法, 也是目前主流的外泌体提取方法。但是, 此方法产量略低、耗时长并且可能会对外泌体造成一定的物理性损伤[20] [42]。

## 4.2. 密度梯度离心法

密度梯度离心法提取外泌体是一种基于外泌体与杂质粒子之间的密度差异进行分离的方法, 这种方法通常使用蔗糖密度梯度离心, 将母乳样品置于蔗糖介质的顶部, 然后通过离心力的作用使样品分层、分离, 从而将外泌体从混杂物中分离出来。密度梯度离心法比传统差速离心法较有着更高的分辨率, 从而可以提取出更高纯度的外泌体, 这是其相比于其它外泌体分离技术的一大优势。并且, 该方法不易损坏外泌体。但此方法和超速离心法一样有着操作复杂、耗时长缺点, 并且可能会因为梯度溶液的高渗性导致外泌体的生物活性受到影响[38] [41] [43]。

## 4.3. 微滤技术

微滤技术提取外泌体其实是和超速离心法相结合的一种分离外泌体的方法。微滤技术提取外泌体的原理主要是基于外泌体的大小排除特性, 通过物理筛选的方式将外泌体从其他细胞碎片和蛋白质中分离出来。母乳样品在低速离心之后可去除大的凋亡碎片和死亡细胞, 这一步也是微滤技术提取外泌体之前对母乳样品的预处理, 随后可通过微滤技术滤过母乳样品中未沉降的其他杂质。再通过过滤、超滤、洗涤和重悬步骤就得到了外泌体样本。微滤技术的优点在于不需要昂贵的设备且操作简单、快速和高回收率, 适合于大规模的外泌体提取。超滤方法是根据待分离囊泡的大小进行分离, 但是其他细胞外囊泡的大小和外泌体有重叠部分, 因此获得的产物可能含有大量其他细胞外囊泡杂质。此外, 这种方法可能会受到滤膜堵塞的影响。因此, 微滤技术回收外泌体的纯度可能不如超速离心法等其他方法[38] [42]。

## 4.4. 免疫亲和法

免疫亲和法提取外泌体是利用如 CD9、CD63、CD81 等外泌体表面特异性标志物和相应抗体特异性结合的原理来分离外泌体。通常将特异性抗体固定在磁珠、琼脂糖凝胶等固相载体上, 当母乳样本与固相载体混合时, 外泌体表面的标志物与抗体结合, 从而实现外泌体的分离。首先将特异性抗体偶联到磁珠表面, 制备成免疫磁珠。然后将母乳样本与免疫磁珠混合, 在适宜的温度和时间下孵育, 使外泌体与免疫磁珠充分结合。之后利用磁场将结合了外泌体的免疫磁珠分离出来, 再通过合适的洗脱缓冲液将外泌体从磁珠上洗脱下来, 这一系列操作之后就收集得到了纯化的外泌体。此方法基于免疫学原理和适配体的分离方法属于亲和分离具有高度的特异性, 分离效果较好, 可以获得高纯度的外泌体, 能够选择性

地分离特定亚群的外泌体。但是, 此方法用到的抗体成本较高, 且抗体的特异性可能会影响分离效果, 如果抗体存在非特异性结合, 可能会导致杂质的共分离从而影响所分离外泌体的纯度。此外, 免疫亲和法的操作相对复杂, 且单次处理样本量相对较小, 且洗脱过程带来的一些离子或 pH 条件不利于下游研究和应用[42] [44]。

#### 4.5. 尺寸排阻色谱法

尺寸排阻色谱法(SEC)分离外泌体的原理是根据分子粒径进行分段分离。使样品流经具有固定孔隙的 SEC 填充物。蛋白质、脂类等粒径较小的分子被吸附在孔隙中, 而粒径较大的分子或颗粒(如外泌体)则不能进入孔隙, 在缓冲液的作用下较快流速被洗脱出来, 从而实现分离。此方法所有步骤均在 4℃ 条件下完成, 中间环节不经过任何冷冻处理。首先, 在样品中加入苯甲磺酰氟用于抑制原乳的蛋白水解酶活性。随后, 低速离心去除细胞和脂肪球, 经验表明此步骤对人乳和牛乳采用不同的离心速度脱脂, 可以获得最佳的脱脂效果。并且, 1000~4000 g 范围内的不同离心速度对外泌体的分离提取没有影响。最后, 进行高速离心和尺寸排除色谱(SEC)获取外泌体。该方法优势在于能够消除酪蛋白和脂蛋白这两种外泌体中其他方法不易消除的杂质, 从而得到高纯度的外泌体。此外, 该方法还有标准化程度高、适用样品多、对外泌体损伤小等多种优点, 是已被实验室大量验证的高效外泌体提取方法。但此方法成本较高, 不适合大量提取[2] [25]。

针对母乳中乳脂球和酪蛋白胶束与外泌体理化性质相似、尺寸重叠导致的纯化干扰, 可采用“预处理脱脂 + 核心分离 + 二次除杂”的复合解决方案: 预处理阶段通过 4℃ 梯度离心(2000 ×g, 20 分钟)初步去除大部分乳脂球, 再加入 0.1 mg/mL 胰蛋白酶轻度酶解 10 分钟破坏酪蛋白胶束聚集, 随后立即加入抑制剂终止反应避免外泌体损伤; 核心分离阶段选择优化后的密度梯度离心(10%~60%蔗糖梯度)或自动化尺寸排阻色谱法(SEC), 利用密度或粒径差异强化外泌体与杂质的分离, 其中 SEC 可特异性消除酪蛋白和脂蛋白, 脱脂时针对人乳、牛乳采用不同离心速度进一步提升效果; 二次除杂阶段通过 0.22 μm 滤膜过滤或短程超速离心(10 万 ×g, 30 分钟)去除微量残留杂质, 免疫亲和法则可借助外泌体表面 CD9、CD63 等特异性标志物, 直接排除不表达此类标志物的乳脂球和酪蛋白胶束, 无需额外除杂步骤, 最终实现高纯度、高活性母乳外泌体的分离。[17] [21]-[25]

该复合策略能有效解决单一方法难以同时去除两种主要杂质的问题, 但操作步骤相对繁琐, 需严格控制酶解时间和温度, 避免影响外泌体完整性。

### 5. 乳外泌体载药方法

母乳外泌体, 作为一种天然的纳米级载体, 在药物递送领域展现出了巨大的潜力, 为药物治疗, 尤其是化疗药物的递送, 开辟了新的道路和策略[20]。相较于其他类型的外泌体, 母乳外泌体在跨物种应用中有着更高的耐受性, 不易引起不良的免疫和炎症反应, 同时还能提升口服生物利用度, 改善药物的疗效和安全性。尽管外泌体的研究成果转化到临床应用还处于起步阶段, 但已有证据表明, 工程化的外泌体能够携带特定的核酸、蛋白质以及治疗性药物, 并且它们在体内的靶向摄取和对体内环境的耐受性已经得到了一定程度的研究支持[45]。此外, 母乳外泌体的生物相容性高、经济高效、来源稳定以及良好的耐受性, 使其有望成为临床上的新兴治疗手段。以下将根据现有研究, 从载药方法、载药类型、载药优势及应用前景等方面, 对母乳外泌体载药进行总结和分析。[20]

现有的母乳外泌体载药方法主要包括主动载药和被动载药[46]-[48](见表 2)。外泌体主动载药与被动载药的核心区别在于载药时机与作用机制: 主动载药是在外泌体分泌之前, 通过将药物或编码药物的基因导入供体细胞, 借助细胞自身的生物合成机制将药物“打包”进新生外泌体, 或利用外泌体膜上的转

运蛋白实现靶向载入, 这种方式更适配核酸、蛋白质等大分子药物, 载药效率高且能较好保留外泌体的天然结构与靶向性, 只是操作相对复杂、成本偏高; 而被动载药则是在外泌体分离纯化之后, 通过共孵育、电穿孔、冻融等物理或化学手段, 让药物借助浓度差扩散或膜结构临时改变进入外泌体, 更适合小分子药物的载入, 操作简便、成本较低, 但电穿孔、冻融等方法容易破坏外泌体膜完整性, 导致其靶向性受损, 且对大分子药物的载药效率偏低, 药物渗漏风险也更高。在软骨再生与骨关节炎治疗研究中, 若需递送 siRNA、生长因子等大分子调控软骨细胞功能, 优先选择主动载药; 若仅需载入小分子抗炎药开展基础实验, 则被动载药更具实用性。现有的方法主要有共孵育法、超声法、电穿孔法、挤压法等 [20] [46] [49] [50]。共孵育法是将药物与母乳外泌体在适宜条件下共孵育, 使药物自然进入外泌体, 这种方法操作相对简单, 但载药效率可能受限, 适用于一些小分子药物的装载, 如某些化疗药物和天然产物类药物 [20] [49]。超声法是利用超声处理使药物进入外泌体, 超声能够破坏外泌体膜结构, 促进药物渗透, 但过度超声可能影响外泌体完整性, 该方法在装载胰岛素等蛋白质类药物时表现出一定优势, 可提高载药效率, 同时保持药物生物活性 [49]。电穿孔法是利用短暂电脉冲在母乳外泌体的膜上产生临时性的孔隙, 这一过程使得药物分子得以穿透并进入外泌体的内部。然而, 这种技术可能会对外泌体的膜结构造成一定的改变, 进而影响其稳定性和生物活性, 此外, 电穿孔法对所使用的设备和操作条件有着较为严格的要求。 [46] 挤压法是一种将药物与母乳外泌体混合后, 利用压力使其通过特定孔径滤膜的技术, 这一过程促使药物分子被有效挤压进入外泌体内部。该方法能够精确调控外泌体的尺寸, 但在此过程中可能会对外泌体的结构完整性造成一定的物理性损伤 [50]。

共孵育法将化疗药物或其他药物溶解在适当的溶剂(例如乙醇或乙醇与乙腈的 1:1 混合物)中, 然后与母乳外泌体悬浮液按 1:9 的比例在室温(22℃)下混合。在混合过程中, 药物分子通过与外泌体表面的脂质和蛋白质相互作用, 逐渐进入外泌体内部。混合后的体系通过低速短暂离心, 未结合的药物由于受到离心力的作用而沉淀, 而载药外泌体则留在上清液中, 从而去除未结合的药物, 得到载药外泌体。与其他载药方法相比, 共孵育法不需要复杂的设备和操作步骤, 易于实施, 并且通过纳米颗粒跟踪分析(NanoSight)、动态光散射(Zetasizer)、扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM)等方法对载药后的母乳外泌体进行多种表征分析, 发现该方法对母乳外泌体的结构和功能影响较小, 能够较好地保持外泌体的完整性, 进而使其在载药后仍能发挥正常的生物学功能。最主要的是, 载药后的外泌体在体内外实验中表现出良好的性能, 细胞实验和动物实验都体现出比单独药物治疗更显著的治疗效果。皂苷、紫杉醇、姜黄素、雷公藤红素、浆果花青素等药物均可通过共孵育法导入到母乳外泌体内 [20] [51]。

超声法, 一项研究通过超声法成功地将胰岛素导入母乳外泌体, 并表现出很好的外泌体生物稳定性和更高的药物特性。在这项研究中, 研究人员采用了超声法, 即将母乳外泌体与胰岛素混合后进行超声处理。超声过程中产生的机械力和空化效应能够破坏外泌体的膜结构, 为胰岛素分子进入外泌体内部提供了通道。随后, 通过超滤技术从混合液中去除未结合的胰岛素。在超滤过程中, 由于分子量较小, 未结合的胰岛素分子能够通过超滤膜被清除, 而载药的外泌体则被保留, 从而获得了纯净的载药外泌体。对于胰岛素这类亲水性大分子蛋白质药物, 超声法能够实现高效的药物载荷。经过一系列实验验证, 装载胰岛素的母乳外泌体不仅保留了外泌体和胰岛素的原始特性, 还提高了胰岛素的口服生物利用度, 并提供了更持久的降糖效果。但如果超声处理时间太长可能导致外泌体降解, 主要适用于蛋白质类和疏水性药物的装载 [49] [51]。

电穿孔法是用电穿孔器对电穿孔试管中的母乳外泌体和药物混合物进行电穿孔, 随后在冰上孵育以恢复外泌体膜, 经此过程完成载药。该方法通常用于装载 siRNA [52]。此方法载药效率也较低, 并且可能导致外泌体膜结构不稳定和增加外泌体的分解 [51]。

如皂苷这样的表面活性剂也可以通过改变外泌体膜的通透性从而帮助外泌体载药。表面活性物质通

过在外泌体表面形成微孔从而主要负载蛋白质、肽和纳米材料等药物。这些表面活性剂可以增加外泌体表面的通透性, 从而携带更多的药物。然而表面活性剂有分解外泌体的风险并且可引起高毒性等问题[47][51]。每种方法都是试图改变外泌体的膜结构以使得药物进入到外泌体内部完成载药过程, 只是每种方法对膜的破坏程度不同以及载药效率不同。

此外, 不仅载药方法, 外泌体的来源对母乳外泌体的载药速率也会产生影响(见表 3)。一项研究分别使用共孵育、皂素处理和超声三种方法将多柔比星装载到乳外泌体中。实验结果显示, 羊奶外泌体的载药能力最高并且对癌细胞的治疗效果最好[53]。

母乳外泌体可装载化疗药物、抗炎药物、蛋白质、核酸等多种不同类型的药物, 关键是大量实验研究表明其治疗效果好于单独的药物治疗并且不同药物有其最适合的载药方法[51]。母乳外泌体载药有着诸多优势: 提高药物稳定性, 母乳外泌体的脂质双层结构可保护药物免受胃肠道环境中胃酸、酶等因素的破坏, 确保药物在到达作用部位前保持活性, 胰岛素等药物在被外泌体负载后, 在模拟胃肠液中的稳定性显著提高; 增强药物生物利用度, 外泌体能够促进药物在肠道的吸收, 增加药物进入血液循环的量, 提高药物在体内的有效浓度, 例如, 在多项研究中, 负载化疗药物的母乳外泌体经口服给药后, 在体内的血药浓度明显升高, 生物利用度显著提高; 实现药物靶向递送, 通过对母乳外泌体进行表面修饰, 可使其携带特定的靶向分子, 实现对病变组织或细胞的精准递送, 提高治疗效果并减少对正常组织的副作用; 降低药物毒性, 载药外泌体可减少药物在正常组织中的分布, 降低药物对健康器官的损害, 以紫杉醇为例, 其本身具有一定毒性, 经母乳外泌体负载后, 对机体的毒性明显降低, 提高了药物的安全性[20][49][50][54]。因此母乳外泌体在装载一些易降解药物并对其进行精准递送方面展现出极大的优势和前景, 特别是在癌症治疗方面具有广阔应用前景, 可作为化疗药物的有效载体, 提高抗癌药物的疗效, 降低毒性, 为癌症患者提供更安全有效的治疗方案[51]。

**Table 2.** Comparison of active and passive drug loading for exosomes

**表 2.** 外泌体主动载药和被动载药对比

	主动载药	被动载药
核心原理	利用外泌体分泌细胞的生物学合成机制, 在细胞层面将药物“打包”进外泌体中; 或在外泌体形成后, 通过主动转运方式将药物载入。	基于物理或化学作用, 在外泌体分离纯化后, 将药物与外泌体共孵育, 通过膜融合、渗透等方式使药物进入外泌体。
操作阶段	载药过程发生在外泌体分泌之前(细胞内载药)或依赖外泌体膜上的转运蛋白(细胞外主动载入)。	载药过程发生在外泌体分离纯化之后(细胞外载药)。
主要方法	1) 细胞转染: 将药物或编码药物的基因导入外泌体供体细胞, 细胞合成药物后随外泌体分泌; 2) 电穿孔主动靶向: 结合外泌体膜受体, 定向驱动药物进入; 3) 基因工程改造: 改造供体细胞使其分泌的外泌体携带特定药物。	1) 共孵育法: 药物与外泌体在适宜条件下孵育, 通过浓度梯度扩散或膜通透性进入; 2) 电穿孔法: 高压电场使外泌体膜形成微孔, 药物进入后膜自行修复; 3) 冻融法: 反复冻融破坏外泌体膜稳定性, 促进药物载入。
适用药物类型	更适合大分子药物, 如核酸(siRNA、miRNA、DNA)、蛋白质、多肽等; 也可用于小分子药物。	更适合小分子药物(如化疗药物、抗炎药物); 大分子药物也可适用, 但效率较低。

续表

载药效率	较高, 尤其是大分子药物, 可通过调控细胞代谢实现精准载药; 基因工程改造后效率进一步提升。	相对较低, 小分子药物效率高于大分子; 易受药物浓度、孵育条件影响, 且可能出现药物渗漏。
外泌体完整性	较好, 细胞内合成的外泌体结构和功能更接近天然状态; 但基因工程改造可能影响外泌体特性。	较差, 电穿孔、冻融等方法可能破坏外泌体膜结构, 导致外泌体完整性下降, 甚至影响其靶向性。
靶向性保留	天然靶向性保留较好, 尤其是未经过物理/化学处理的细胞分泌型外泌体。	靶向性可能受损, 膜结构破坏会导致表面标志物丢失, 影响外泌体的组织靶向能力。
临床应用潜力	潜力大, 细胞内载药更符合生理状态, 免疫原性低; 但操作复杂, 成本较高, 需严格控制细胞培养条件。	操作简便、成本低、易于规模化生产; 但外泌体完整性和靶向性问题限制其临床转化。

Table 3. Drug loading methods

表 3. 载药方法

载药方法	优点	缺点
共孵育法	1) 操作最简单, 无需特殊仪器设备, 操作门槛低; 2) 对于外泌体膜结构损伤极小, 能最大程度保留外泌体的天然完整性和表面靶向标志物; 3) 温和的孵育条件可减少药物活性破坏; 4) 成本低廉, 易于规模化扩大生产。	1) 载药效率最低, 尤其对大分子药物(如核酸、蛋白质)载入效果差, 主要依赖浓度梯度扩散; 2) 载药稳定性差, 药物易从外泌体中渗漏; 3) 载药效果受孵育时间、温度、药物浓度等多种因素影响, 可控性较弱。
超声法	1) 载药效率高于共孵育法, 通过超声产生的空化效应可快速破坏外泌体膜稳定性, 促进药物进入; 2) 操作耗时较短, 能实现快速载药; 3) 对小分子药物和部分中大分子药物均有一定载药效果。	1) 超声强度和时间难以精准控制, 过强超声易导致外泌体膜结构严重破损甚至破裂, 丧失天然功能; 2) 可能破坏药物活性, 尤其对热敏性、结构不稳定的药物(如蛋白质、核酸)损伤较明显; 3) 载药后外泌体靶向性可能因表面标志物破坏而下降。
电穿孔法	1) 载药效率高, 尤其是对大分子药物(如 siRNA、DNA、蛋白质)的载入效果显著优于共孵育法; 2) 载药过程可控性较强, 可通过调节电压、脉冲时间等参数优化载药效果; 3) 适用于多种类型药物, 适用范围较广。	1) 高压电场会破坏外泌体膜完整性, 导致部分外泌体破裂, 降低外泌体回收率; 2) 可能影响外泌体表面靶向分子的完整性, 削弱其天然靶向能力; 3) 需特殊电穿孔仪器, 操作相对复杂, 且过高电压可能破坏药物活性。
冻融法	1) 操作相对简单, 无需复杂仪器, 仅通过反复冻融即可实现膜结构的临时改变; 2) 载药效率中等, 对小分子和大分子药物均有一定载入效果; 3) 成本较低, 易于在基础实验中推广应用。	1) 反复冻融易导致外泌体膜结构不可逆损伤, 严重影响外泌体完整性和天然功能; 2) 载药后药物渗漏风险较高, 载药稳定性差; 3) 可能破坏药物活性, 尤其对生物大分子药物的损伤较为明显; 4) 冻融循环次数难以精准把控, 批间重复性较差。

## 6. 乳外泌体的生物利用度和分布

以往关于外泌体的研究表明, 外泌体的结构具备抵御恶劣环境条件的能力, 例如低 pH 值、温度波动

或高浓度核糖核酸酶(RNase), 这种抗降解和抗消化的能力为外泌体作为药物递送载体提供了有力支持[1]。但是母乳外泌体作为在母乳中经消化道吸收的物质不同于经历单纯的一个极端环境, 而是先后经历多种不同的消化道环境。就这一问题, Yalin Liao 等人以外泌体 microRNA 含量为指标通过简易模仿消化道环境使装载 microRNA 的外泌体先后经历不同 pH 4.0 (接近婴儿肠道条件)并添加了猪胃蛋白酶(Sigma)溶液的胃消化模拟环境和 pH 7.0 并添加了胰酶的胰腺消化模拟环境, 并且每个环境的孵育时间也基本和人体自然条件下相同。结果显示, 经过这一系列实验之后, 实验组的乳外泌体中的 microRNA 含量与对照组的含量相差很小, 说明乳外泌体可耐受消化道环境。这一研究表明乳外泌体可保护其装载的货物不受恶劣的消化模拟环境影响和 RNA 酶降解从而被消化道吸收, 理论上有着极高的消化环境耐受程度和生物利用度。并且, 现有的研究已证实母乳外泌体在动物体内是可以利用的, 口服后可在循环系统中出现[55]-[57]。这种抗降解和抗消化能力的发现为日后研究和开发经消化道吸收的外泌体、乳外泌体载药系统打下了坚实的基础[1] [58]。

### 6.1. 摄取和肠道运输

一项对于人类肠道隐窝样细胞(HIEC)的体外实验结果表明, 无论母乳外泌体是否经过消化环境的消化, 都可以被肠道细胞摄取[58]。外泌体可能通过糖蛋白介导的内吞过程、吞噬作用、网格蛋白依赖的内吞作用、小窝蛋白介导的摄取、微胞饮作用、a 类清道夫受体介导的吞噬过程等被肠道吸收, 但外泌体摄取机制主要与外泌体来源和受体细胞类型有关, 也可能同时存在多种摄取机制[59]-[61]。另外细胞对外泌体是否特异性摄取存在争议, 现有的研究发现荧光标记的 EV 几乎可以被每一种测试的细胞类型摄取, 而另一些研究则表明, 囊泡摄取是一个高度特异性的过程, 只有当细胞和外泌体拥有相对应的配体和受体组合时才会被摄取[62]。现有的工程改造的外泌体可进行更精准的靶向递送, 但对于天然外泌体的摄取情况还有待研究。吸收后的外泌体通过跨细胞运输的方式穿过肠道屏障进入血液循环进而运送到全身各器官以利用[63]。

### 6.2. 药物血液循环

为了明确母乳外泌体可在血液循环中稳定存在并可到达目标器官, 一项研究以小鼠和猪为实验对象, 分别通过哺乳、灌胃和静脉给予荧光标记的母乳外泌体, 结果显示, 荧光标记的乳外泌体或荧光融合蛋白在肝、脾和脑中均集聚[63]。另外的很多研究都证实了外泌体被吸收后存在于血液循环中[58] [64]。说明母乳外泌体通过多种途径均可进入血液循环系统并可稳定递送到各器官。

### 6.3. 目标细胞和肠道微生物组

外泌体的目标细胞几乎为全身的所有细胞, 如前所述的研究表明荧光标记的外泌体几乎可被每一种测试的细胞所摄取, 当进行特异性靶向标记时, 外泌体被修饰特异性配体而与特定细胞结合。一项实验研究给 C57BL/6 小鼠口服不同剂量的母乳外泌体, 收集结肠内容物并通过 16S rRNA 基因测序分析微生物组成, 发现母乳外泌体能够改变肠道菌群的组成。特别是, 经过母乳外泌体处理的小鼠中, Clostridiaceae、Ruminococcaceae 和 Lachnospiraceae 的增加, 以及 S24\_7 的减少被观察到。随着母乳外泌体含量的增加, 这些细菌的 OUT (Operational Taxonomic Units)数量也不断增加。SCFAs 在肠道健康中扮演重要角色, 它们是肠道上皮细胞的主要能量来源, 并具有抗炎和抗凋亡功能。短链脂肪酸(SCFAs)在肠道中十分重要, 它们是肠道上皮细胞的主要能量来源, 并具有抗炎和抗凋亡功能。这项研究也发现母乳外泌体也调节 SCFAs 的产生进而影响肠道代谢和免疫功能。总之, 母乳外泌体可以通过改变肠道菌群的组成和调节它们的代谢产物 SCFAs, 进而可能影响肠道健康和免疫功能[55]。

## 7. 乳外泌体作为潜在的诊断标记

近年的研究发现, 母乳外泌体可通过特异性表达来反映乳腺发育和炎症反应等情况, 因此母乳外泌体有着生物标记物的潜力从而对母体疾病监测。这一特性为母体疾病早诊断和及时治疗干预提供了全新的思路和方法[2]。现有的研究已经证明, 不同哺乳期的母乳外泌体蛋白有着显著差异, 这与不同哺乳期的母乳担负的功能需求相对应。一项研究发现初乳中的外泌体中的炎症反应和免疫反应蛋白含量是成熟哺乳期的 3 倍[65]。另一项研究对来自不同哺乳期的人和牛的 920 种乳外泌体蛋白进行了鉴定和定量分析, 发现了 575 个差异表达的乳源性外泌体蛋白[66]。人和牛在不同哺乳期乳外泌体蛋白的种类和数量上的差异揭示了母体在不同时期分泌水平的变化, 这为人乳外泌体蛋白差异作为潜在诊断标记物的研究提供了理论基础。

乳腺炎在哺乳期的母体中高发, 特别是奶牛中发病率更是高达 20%~50%不等, 主要病因为细菌感染。传统的诊断方法主要是对病原生物进行检测, 这种方法耗时长并且敏感性低, 与之相比, 母乳外泌体在病原菌感染后外泌体蛋白和 miRNA 的表达更具优势[2]。研究发现, 如乳淀粉样蛋白 A milk amyloid A (MAA)、C 反应蛋白(CRP)等炎症反应相关蛋白和多种 miRNA 在乳腺炎母体分泌的母乳外泌体中表达显著增加[2][67]。并且 miRNA 的表达可在不同病原菌感染中表现出特异性, 例如: 金黄色葡萄球菌感染的乳腺细胞中 miR-2339、miR-99b、miR-23a 和 miR-499 差异表达; 大肠杆菌感染则为 miR-184、miR-24-3p、miR-486、miR-148 和 let-7a-5p 差异表达[68]。另外, 不同亚型菌种的感染也有着 miRNA 表达差异, 金黄色葡萄球菌的两个亚型: 凝固酶阳性(cop)和凝固酶阴性(con)葡萄球菌。cop-感染后的乳腺细胞中 miR-155-5p、miR-191-5p 和 miR-223-5p 显著表达, 而 con-感染后的细胞中 miR-145-5p、miR-142-5p 和 miR-31-5p 显著表达[69]。这种母乳外泌体蛋白和 miRNA 在感染病原菌特别是不同病原菌后有着差异化的表达, 对诊断乳腺炎感染具体病菌并精准治疗意义重大, 此外, 母乳外泌体诊断乳腺炎有着稳定性高、灵敏度高、半衰期较长、分离程序较简单等诸多优势。

牛白血病病毒(BLV)是引起牛白血病的致癌性病毒之一。一项研究对比 BLV 感染和未感染牛的牛奶外泌体中的 1330 个蛋白质, 其中有包括 CNTFR、DDAH1、TUBB1 和 MARCH8 等 118 个蛋白质是在感染牛中唯一表达的, 并且这几种蛋白质涉及的信号通路在肿瘤形成、增殖和转移中发挥着关键作用, 因此这些特异性表达的蛋白是潜在的牛白血病诊断标记物[70]。另外关于 BLV 感染牛中的 miRNA 鉴定发现 BLV 感染奶牛的牛奶外泌体中 miR-424-5p 和 miR-1246 表达显著升高, miR-424-5p 参与多个调节癌症细胞生长和分化的通路; 过表达的 miR-424-5p 和 miR-1246 在肿瘤细胞增殖和迁移中发挥着重要作用[71][72]。母乳外泌体在临床疾病诊断中的应用已初步展现, 是未来可大力开发利用和有望发挥良好诊断价值的一种诊断标记物。但是, 关于母乳外泌体作为疾病诊断的研究还不足, 并且特异性不够高, 不足以应用于临床诊断中, 仅起到提示作用, 还需要广大科研人员积极探索。

## 8. 乳源性外泌体是自然界丰富的药物传递系统

母乳外泌体从母乳中提取, 与其他外泌体相比有着更易获取、产量更高、可口服递送的优势, 因为母乳在自然界大量存在且成本低廉, 是比较理想的可以量产的药物载体[36]。因此母乳外泌体是自然界丰富的药物传递系统。

### 8.1. 癌症治疗

癌症是一个全球性的健康问题, 其发病率和死亡率都较高, 特别是在发展中国家。虽然医学技术有所进步, 癌症的治疗方法不断更新和改进, 患者的生存率和生活质量也得到了一定的提高, 但癌症仍然是一个复杂并且具有挑战性的临床问题, 特别是对于癌症晚期阶段的治疗。近来的研究发现母乳外泌体

在治疗癌症方面有着独特的作用和较好的效果, 为癌症的治疗开辟了新的方法和策略。

母乳外泌体在治疗癌症方面主要体现在强大且高效的载药能力上, 未经修饰的外泌体对癌症的治疗作用十分有限。以下主要对母乳外泌体载药治疗癌症的研究做总结。一项研究在牛乳外泌体中装载抗肿瘤药物多柔比星(Dox), 再装饰上 CD44 的特异性配体——透明质酸(HA), 使其可以与 CD44 过表达肿瘤细胞特异性结合, 从而实现装载药物的精准输送。实验结果表明, 这种方法既提高了输送靶向性又提高了多柔比星的抗肿瘤效果, 为肿瘤靶向治疗提供了一种新策略[73]。另一项研究同样用 HA 修饰母乳外泌体并装载 miRNA-204, HA-mExo-miR204 的合成制剂在体内外实验均表现出比单独给药更显著的抗肿瘤效果[74]。

另外一项关于母乳外泌体装载抗肿瘤药物多柔比星的研究是通过对母乳外泌体进行神经纤毛蛋白受体激动肽(iRGD)和缺氧应答脂质修饰使其靶向递送药物至三阴性乳腺癌细胞。结果表明, 释放的多柔比星在多种不同的三阴性乳腺癌细胞中显示出显著的细胞毒性。此外还有研究装载二氢青蒿素(DHA)、紫杉醇(PAC)和 5-氟尿嘧啶(5-FU)等抗肿瘤药物治疗癌症及其他修饰方法同样效果显著[75]。以上关于母乳外泌体载药治疗癌症的研究中可看出, 治疗思路主要是先找到可以与癌细胞特异性结合的物质并修饰在外泌体上, 再导入治疗药物, 实现对药物的精准递送和高效利用, 并且靶向递送可减少正常细胞的损害, 极大地减少了副作用。未来外泌体载药治疗癌症将可能成为一种新兴且效果显著的策略, 研究方向仍然是寻找更好的修饰方法和药物, 尤其是针对各种类型肿瘤针对性的方法和抗肿瘤药物。母乳外泌体在癌症治疗中具有巨大的潜力, 尤其是在针对性药物递送和减少副作用方面。

## 8.2. 胃肠疾病

胃肠道是对食物进行消化、吸收的主要器官, 同时也具有强大的内分泌功能和免疫屏障功能, 胃肠上皮细胞是分泌消化液等物质实现消化功能和吸收各种营养物质的主要细胞, 消化道黏膜和上皮细胞组织维持消化道的免疫屏障功能。包括肠道缺血再灌注损伤(IR)、炎症性肠病(IBD)、坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)、结直肠癌(CRC)、等胃肠疾病会导致胃肠黏膜和胃肠上皮细胞直接损伤, 从而破坏胃肠道的消化、吸收和免疫屏障功能进而导致胃肠消化道功能紊乱[36][76][77]。近年的研究表明母乳中含有大量的外泌体, 并且母乳外泌体在肠道的发育、减少肠道损伤、维持肠道上皮的完整性和肠道疾病预防等方面发挥着重要的作用。

肠扭转是一种在儿童中高发的肠道损伤, 常导致肠道缺血再灌注损伤, 严重时会有肠坏死的风险。一项研究以母乳外泌体为治疗因子, 以上皮细胞增殖标志物 Ki67 和炎症细胞因子 TNF  $\alpha$  为治疗指标进行了动物实验。结果显示与对照组相比母乳外泌体治疗组的动物炎症因子 TNF  $\alpha$  表达没有增加, 肠道增殖能力没有下降。因此, 结果表明母乳外泌体对肠道缺血再灌注损伤可通过减少肠道炎症和促进上皮细胞增殖起到保护作用[76]。

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是目前威胁新生儿, 特别是早产儿健康的一种严重疾病。一项研究表明, 母乳外泌体通过减轻肠道上皮炎症和损伤可能有助于维持肠上皮屏障完整性。此研究得到动物伦理同意后以小鼠为实验对象并对其建立实验性坏死性小肠结肠炎(NEC)模型; 以母乳外泌体为治疗因子; 以 ZO-1、claudin 1 和 occludin 的 mRNA 表达水平、炎症因子小鼠血浆白细胞介素-6 $\beta$  (IL-6 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )表达水平、细胞增殖指标 CCK-8 表达水平、肠道上皮紧密连接蛋白(intestinal epithelial tight-junction proteins ZO-1)的表达水平和肠道损伤的程度多种治疗指标多方面评估坏死性小肠结肠炎小鼠模型的治愈情况进行实验。结果表明母乳外泌体有减少肠道炎症和肠道上皮的损伤的作用, 并通过恢复肠道紧密连接蛋白来预防 NEC, 实验还提示, 新生儿在得不到母乳喂养的情况下, 应用母乳外泌体也可能是预防新生儿 NEC 的一种新的治疗方法[77]。

研究表明, 对不同阶段的人乳进行提取外泌体, 各个阶段的母乳中所提取的外泌体对肠道器官的上皮损伤都有保护和预防炎症损伤的功效, 但是, 初乳来源的外泌体的保护效果最好[78]。总之, 母乳外泌体通过降低炎症因子的表达和促进上皮细胞的增殖来保护胃肠道从而降低各种胃肠道疾病对胃肠道黏膜和上皮细胞的损伤从而达到维持肠道上皮的完整性和修复肠道损伤的作用。特别是在治疗新生儿肠道疾病方面有着巨大的潜力和非药物伤害的优势, 因此, 母乳外泌体因其低免疫原性、高耐受性、可穿透生物屏障、副作用小、高效性等优势有望成为治疗胃肠疾病特别是新生儿胃肠疾病的新兴治疗方法。

很多牛乳外泌体的工作没有说明上, 先把应用的表格完善, 然后根据表格一条条讲, 把同一类型的放在一起, 然后一起讨论。

### 8.3. 肌肉、骨骼疾病

骨关节炎、骨质疏松症和肌肉减少症等肌肉骨骼疾病会严重影响个体的行动能力、灵活性和整体功能, 进而干扰正常的工作、学习和日常生活。目前, 临床上治疗这些疾病的主要方法包括手术、补钙和激素治疗等。然而, 近年来的研究发现, 母乳外泌体在治疗这些疾病方面展现出显著的疗效, 并具备诸多优势, 如效果显著、生物兼容性好、低药物毒性和低成本等[79]-[82]。在此, 我们研究了母乳外泌体治疗肌肉骨骼疾病的研究文献, 总结了母乳外泌体在肌肉骨骼疾病中的应用和前景。

一项研究表明, 牛乳外泌体通过上调细胞周期相关蛋白的表达, 增强了人成骨细胞 Saos-2 的增殖能力。此外, 牛奶外泌体通过提升关键转录因子 RUNX2 和 Osterix 的表达水平, 促进了成骨细胞的分化过程。在大鼠实验模型中, 通过口服途径给予牛乳外泌体, 不仅显示出对骨生长的积极影响, 提高了胫骨的骨密度, 而且没有引起任何毒性反应。这些发现证实了牛乳外泌体在体外能够促进人类成骨细胞的增殖和分化, 并在动物模型中验证了其促进成骨的潜力, 同时证明了其良好的生物安全性。因此, 牛乳外泌体有潜力成为一种安全而有效的生物活性材料, 用于促进骨骼形成和治疗骨质疏松[79]。

一项研究探索了牛奶外泌体水凝胶复合物在治疗小鼠颅骨缺损模型中的应用, 通过一系列精密的实验技术, 包括碱性磷酸酶(ALP)活性测定、CCK-8 细胞增殖实验、免疫沉淀(ChIP)实验、实时定量 PCR 和 Western blot 等, 全面评估了成骨细胞的增殖和分化水平。研究发现, 牛奶外泌体能够通过转录因子 AP3B1 促进成骨基因 GJA1 的表达, 从而增强 MC3T3-E1 细胞(成骨细胞前体)的增殖和分化能力, 进而提升骨组织修复能力, 并在小鼠颅骨缺损模型中显著促进骨修复。这项研究不仅深化了我们对牛奶外泌体水凝胶复合物作为一种新型纳米材料在促进骨形成方面的潜力和机制的理解, 而且为未来骨修复治疗提供了创新的思路和方法[80]。

一项关于口服给予糖皮质激素诱导的骨质疏松小鼠模型牛乳外泌体的研究, 通过 TRAP 染色评估破骨细胞分化, 微计算机断层扫描(micro-CT)分析骨密度和骨体积, 以及 16S rRNA 基因测序分析肠道微生物群落的变化等实验。结果表明, 牛乳外泌体能够抑制破骨细胞分化, 改善由糖皮质激素诱导的骨质疏松小鼠的骨密度, 并通过调节肠道微生物群落来影响骨健康。这一项体内外的母乳外泌体实验表明, 牛乳外泌体可能在预防和治疗骨质疏松, 特别是糖皮质激素导致的骨质疏松, 方面发挥着积极作用, 并可改善骨重建和抑制骨吸收, 为骨质疏松的治疗提供了新的策略[81]。

此外, 相比单独给药治疗骨骼疾病, 牛乳外泌体在载药治疗骨骼疾病方面更有优势, 例如一项研究发现装载了淫羊藿素(ICA)的牛奶外泌体(sEV-ICA)在细胞培养和颅骨缺损模型中显示出比单独 ICA 更高的成骨效率[82]。这说明母乳外泌体不仅可以单独作用于骨骼利于骨重建和抑制骨吸收, 而且还是良好的载药载体比药物单独作用于骨骼有着更好的药效, 因此母乳外泌体在载药治疗肌肉骨骼疾病方面有很大潜力。

一项关于母乳外泌体作用于小鼠的实验, 口服给予实验小鼠母乳外泌体并测量动物握力、呼吸交换

比率、活动水平、食物及水摄入量、肝脏和肾脏健康标志物、肌肉氨基酸分析、基因表达分析、蛋白表达分析等全面评估实验小鼠的肌肉生长情况, 最后发现牛奶外泌体对这些指标的影响有限[83]。但是, 另外的研究发现将牛奶外泌体加入到 C2C12 肌管细胞中进行培养可促进肌管生长, 表明牛奶外泌体和肌肉蛋白生长之间可能存在联系, 另外以大鼠的腓肠肌纤维横截面积和总 RNA 水平为肌肉生长指标的研究发现, 口服牛奶外泌体可能促进了肌肉生长[84][85]。由于关于牛奶外泌体对肌肉生长影响的研究有限, 现阶段并未有明确的定论, 但对于母乳外泌体影响肌肉蛋白积累特别是在治疗肌肉萎缩方面仍有研究价值和很大的研究空间并且有望早日获取确切的研究结论并应用于临床治疗中以使更多的患者获益。

母乳外泌体能够促进人成骨细胞的增殖和分化, 增强骨组织修复能力, 并在动物模型中显示出促进成骨的潜力。此外, 牛乳外泌体在预防和治疗糖皮质激素诱导的骨质疏松方面表现出积极作用, 通过调节肠道微生物群落影响骨健康。牛乳外泌体作为药物载体, 如携带淫羊藿素的牛乳外泌体, 显示出比单独药物更高的成骨效率。尽管对母乳外泌体在肌肉生长影响的研究有限, 但现有研究表明其可能对肌肉蛋白积累和肌肉萎缩治疗具有积极作用。总体而言, 母乳外泌体在治疗肌肉骨骼疾病方面展现出显著疗效和多方面优势, 包括良好的生物相容性、低毒性和低成本, 为其在未来临床治疗中的应用提供了新的思路和方法[80][82]-[88]。

母乳外泌体从动物实验走向临床试验, 核心瓶颈集中在批次间差异、标准化质控缺失、规模化生产不足及安全性评估不充分等方面。供体的物种、泌乳阶段、健康状况和饮食结构会直接导致外泌体的成分与生物活性波动, 造成批次间差异显著, 影响治疗效果的稳定性; 目前缺乏统一的质控标准, 粒径分布、纯度、载药效率等关键指标的检测方法不统一, 难以满足临床试验对载体一致性的要求; 现有提取方法操作繁琐、回收率低, 且母乳中乳脂球、酪蛋白胶束等杂质难以高效去除, 制约了规模化生产; 同时, 动物实验与人体生理环境存在差异, 外泌体在人体消化道中的稳定性、靶向效率尚不明确, 长期使用可能引发的免疫反应、跨物种基因传递等安全风险也未得到充分验证[35][83]-[87]。

针对这些瓶颈, 可通过多维度策略推动转化: 建立供体标准化体系, 筛选健康供体、固定泌乳阶段并实施标准化饮食管理, 结合批次混合均一化处理, 减少原料差异; 构建涵盖理化性质、纯度、生物活性和安全性的多维度质控体系, 统一检测技术与判定标准; 开发“预处理脱脂 + 自动化核心分离 + 二次除杂”的复合工艺, 优化提取技术以提升回收率和规模化生产能力; 利用人体化胃肠环境模拟体系和人源肿瘤异种移植模型, 精准评估外泌体的体内行为, 同时开展长期毒性实验, 完善安全性评估; 基于药代动力学数据建立“动物 - 人体”剂量转化模型, 结合疾病类型与患者个体差异, 制定个性化给药方案, 为临床试验的顺利开展提供支撑[80]-[86]。

## 9. 结论和展望

综上所述, 乳汁外泌体(MDEs)作为一种天然来源的纳米级囊泡, 凭借其丰富的功能成分(核酸、蛋白质、脂质等)、优异的生物相容性、低免疫原性及良好的消化道耐受能力, 在疾病诊断、靶向药物递送及营养调控等领域展现出不可替代的优势和广阔的应用前景。现有研究已证实, MDEs 可通过多种提取方法从乳汁中分离纯化, 经主动或被动载药后, 在癌症、胃肠道疾病、肌肉骨骼疾病等多种病症的治疗中发挥显著作用; 同时, 其携带的特异性蛋白和 miRNA 还可作为母体及动物疾病的潜在诊断标志物, 为疾病的早期筛查和精准干预提供新的思路。然而, MDEs 从基础研究走向临床转化仍面临诸多挑战, 未来需聚焦关键科学问题与技术瓶颈, 从靶向优化、规模化生产、跨领域融合及安全性评估等方面展开深入探索[5][88]。

表面靶向修饰是提升 MDEs 递送精准性的核心策略, 也是未来临床转化的关键方向之一。天然 MDEs 虽具备一定的组织趋向性, 但缺乏对特定病变细胞的选择性, 限制了其治疗效率并可能增加脱靶副作用。

通过在 MDEs 表面连接特异性配体(如单克隆抗体、靶向肽段、糖分子等), 可实现对目标细胞的精准识别与结合, 显著提升药物递送的靶向性。在肿瘤治疗领域, 将识别肿瘤细胞表面特异性抗原(如 CD44、HER2 等)的抗体或配体(如透明质酸、叶酸)修饰于 MDEs 表面, 已被证实可实现化疗药物、miRNA 等载荷向肿瘤细胞的精准递送, 在提升抗肿瘤疗效的同时降低对正常组织的损伤。未来研究需进一步拓展靶向配体的种类与适配性, 结合基因工程技术改造 MDEs 分泌细胞, 使其自发分泌携带靶向分子的 MDEs, 简化修饰流程并提升修饰稳定性; 同时, 可探索多配体联合修饰策略, 利用不同靶点的协同作用进一步增强靶向特异性, 为复杂疾病的精准治疗提供更高效率的递送系统[5] [61] [90] [91]。

乳汁作为 MDEs 的丰富来源, 为其规模化应用提供了物质基础, 但大规模生产高质量、标准化的 MDEs 仍是当前面临的主要技术瓶颈。一方面, 乳汁成分具有显著的个体差异性, 供体的物种(人、牛、羊等)、泌乳阶段、饮食结构、健康状况(如是否患有乳腺炎、白血病等)均会影响 MDEs 的产量、功能成分组成及生物活性, 导致不同批次 MDEs 的特性难以统一。另一方面, 现有提取纯化方法(如超速离心法、试剂盒法等)存在操作繁琐、回收率低、纯度不均一等问题, 且缺乏统一的定量标准和质量控制体系, 无法满足临床应用中药物载体剂量精准性、安全性的严格要求。未来需从两方面突破这一困境: 一是建立 MDEs 供体筛选与标准化养殖/管理体系, 通过严格控制供体健康状态、饮食及泌乳阶段, 减少原料差异对 MDEs 特性的影响; 二是开发高效、低成本、可规模化的提取纯化技术, 如自动化尺寸排阻色谱法、膜分离集成技术等, 并制定统一的质量评估标准, 包括 MDEs 粒径分布、纯度、载药效率、生物活性等关键指标, 实现 MDEs 生产的标准化与可重复性, 为其作为药物载体的临床应用奠定基础[92]-[94]。

MDEs 与基因治疗的结合有望拓展其应用边界, 为遗传性疾病的治疗提供新的策略。MDEs 具备良好的生物膜屏障穿透能力和核酸保护能力, 可有效避免基因药物(如 mRNA、siRNA、基因编辑工具等)在体内被降解, 同时降低其免疫原性。现有研究已证实, MDEs 可成功装载 miRNA 等核酸药物并实现靶向递送, 基于此, 未来可进一步探索其在遗传性疾病治疗中的应用: 例如, 在肌肉萎缩症(如肌营养不良)的治疗中, 将正常的肌营养不良蛋白基因或编码该蛋白的 mRNA 装载于 MDEs 中, 通过口服或局部递送方式递送至肌肉细胞, 有望恢复肌肉细胞的正常功能; 在遗传性肠道疾病的治疗中, 利用 MDEs 递送基因编辑工具(如 CRISPR/Cas9 系统), 精准修复肠道上皮细胞中的致病基因, 实现疾病的根治。此外, MDEs 还可与基因工程技术结合, 通过改造供体细胞, 使其分泌的 MDEs 稳定携带治疗性基因, 提升基因递送的效率和持久性。未来需重点攻克基因装载效率提升、基因编辑特异性调控等关键技术, 明确 MDEs 介导基因递送的体内机制, 为其在基因治疗领域的应用提供理论与实验支撑[93] [95]。

MDEs 与生物支架材料的结合是拓展其在组织修复领域应用的重要方向。生物支架材料(如羟基磷灰石、明胶、水凝胶等)具有良好的生物相容性和结构支撑作用, 可为细胞生长和组织再生提供适宜的微环境; 而 MDEs 可通过携带生长因子、成骨相关基因等功能成分, 调控细胞增殖、分化, 促进组织修复。将 MDEs 与生物支架材料复合构建新型组织工程支架, 可实现“结构支撑”与“生物活性调控”的协同作用: 例如, 在骨组织修复中, 将装载淫羊藿素(ICA)的 MDEs 与骨修复支架复合, 可同时发挥支架的力学支撑作用和 MDEs 的成骨诱导作用, 显著提升骨缺损修复效率; 在肠道黏膜修复中, 将 MDEs 与生物可降解水凝胶复合, 可延长 MDEs 在肠道损伤部位的滞留时间, 持续发挥抗炎和上皮修复作用。未来研究需优化 MDEs 与生物支架的复合方式, 确保 MDEs 的活性保留与可控释放; 同时, 探索复合支架的体内降解行为与生物安全性, 推动其在骨修复、黏膜修复、肌肉再生等组织工程领域的应用[94] [95]。

尽管 MDEs 应用前景广阔, 但当前研究仍存在诸多核心问题亟待解决, 主要集中在功能机制认知不足与安全性风险评估两方面。其一, MDEs 的功能机制尚未完全明确: 现有研究多聚焦于其携带的核酸、蛋白质等成分的单一功能, 而 MDEs 作为一个复杂的功能整体, 其成分间的协同作用、不同来源 MDEs 的功能差异、以及在不同疾病微环境下的作用机制仍需深入解析。未来需借助多组学技术(基因组学、蛋

白质组学、脂质组学)全面解析 MDEs 的成分谱与功能网络,明确其在疾病发生发展中的调控作用,为功能导向的 MDEs 工程改造提供理论依据。其二,安全性风险是 MDEs 临床应用的首要考量,主要包括跨物种基因传递风险与病原体感染风险:一方面, MDEs 携带的核酸可能发生跨物种传递,干扰受体基因组稳定性,尤其在使用动物源 MDEs 进行跨物种治疗时,该风险需重点评估;另一方面,乳汁可能携带 HIV、牛白血病病毒(BLV)等病原体,若分离纯化过程不彻底,可能导致感染风险。未来需建立严格的病原体检测与去除流程,优化提取纯化技术以保障 MDEs 纯度;同时,通过长期动物实验评估 MDEs 的体内安全性,包括跨物种基因传递的可能性、长期暴露的免疫反应及器官毒性等,制定完善的安全性评估标准,为 MDEs 的临床应用保驾护航[91] [93]-[95]。

总之,乳汁外泌体作为一种天然的纳米生物材料,在生物医药领域具有巨大的发展潜力。未来的研究需以临床需求为导向,进一步优化靶向修饰、规模化生产等核心技术,推动其与基因治疗、组织工程等领域的深度融合,同时加强功能机制解析与安全性评估,突破从基础研究到临床转化的关键瓶颈。随着研究的不断深入, MDEs 有望成为改善人类健康的有力工具,在疾病诊断、精准治疗及组织修复等领域实现广泛应用。

## 基金项目

本文章由济宁市重点研发计划项目支持(基金编号: 2022-yxyc-007)。

## 参考文献

- [1] Ong, S.L., Blenkiron, C., Haines, S., Acevedo-Fani, A., Leite, J.A.S., Zemleni, J., *et al.* (2021) Ruminant Milk-Derived Extracellular Vesicles: A Nutritional and Therapeutic Opportunity? *Nutrients*, **13**, Article 2505. <https://doi.org/10.3390/nu13082505>
- [2] Wang, K., Zhao, X., Yang, S., Qi, X., Zang, G., Li, C., *et al.* (2024) Milk-Derived Exosome Nanovesicles: Recent Progress and Daunting Hurdles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **65**, 2388-2403. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2338831>
- [3] Muskan, M., Abeysinghe, P., Cecchin, R., Branscome, H., Morris, K.V. and Kashanchi, F. (2024) Therapeutic Potential of RNA-Enriched Extracellular Vesicles: The Next Generation in RNA Delivery via Biogenic Nanoparticles. *Molecular Therapy*, **32**, 2939-2949. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.02.025>
- [4] Al-Madhangi, H. (2024) The Landscape of Exosomes Biogenesis to Clinical Applications. *International Journal of Nanomedicine*, **19**, 3657-3675. <https://doi.org/10.2147/ijn.s463296>
- [5] Deng, C., Cheng, X., Sun, Q., Yeerbolati, Y., Zheng, R., Liu, Y., *et al.* (2025) Oral Delivery of Chitosan/Hyaluronic-Acid-Coated Milk-Derived Exosomes for Ulcerative-Colitis Amelioration. *International Journal of Pharmaceutics: X*, **10**, Article ID: 100447. <https://doi.org/10.1016/j.ijpx.2025.100447>
- [6] Yi, D. and Kim, S. (2021) Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. *Nutrients*, **13**, Article 3094. <https://doi.org/10.3390/nu13093094>
- [7] Sánchez, C., Franco, L., Regal, P., Lamas, A., Cepeda, A. and Fente, C. (2021) Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. *Nutrients*, **13**, Article 1026. <https://doi.org/10.3390/nu13031026>
- [8] Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013) Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *Journal of Cell Biology*, **200**, 373-383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- [9] Keller, S., Rupp, C., Stoeck, A., Runz, S., Fogel, M., Lugert, S., *et al.* (2007) CD24 Is a Marker of Exosomes Secreted into Urine and Amniotic Fluid. *Kidney International*, **72**, 1095-1102. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002486>
- [10] Gonzales, P.A., Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Tchapyjnikov, D., Star, R.A., Kleta, R., *et al.* (2009) Large-Scale Proteomics and Phosphoproteomics of Urinary Exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology*, **20**, 363-379. <https://doi.org/10.1681/asn.2008040406>
- [11] Zhou, M., He, X., Mei, C. and Ou, C. (2023) Exosome Derived from Tumor-Associated Macrophages: Biogenesis, Functions, and Therapeutic Implications in Human Cancers. *Biomarker Research*, **11**, Article No. 100. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00538-w>
- [12] He, X., Kuang, G., Wu, Y. and Ou, C. (2021) Emerging Roles of Exosomal Mirnas in Diabetes Mellitus. *Clinical and*

- Translational Medicine*, **11**, e468. <https://doi.org/10.1002/ctm2.468>
- [13] Bahadorani, M., Nasiri, M., Dellinger, K., Aravamudhan, S. and Zadegan, R. (2024) Engineering Exosomes for Therapeutic Applications: Decoding Biogenesis, Content Modification, and Cargo Loading Strategies. *International Journal of Nanomedicine*, **19**, 7137-7164. <https://doi.org/10.2147/ijn.s464249>
- [14] Krylova, S.V. and Feng, D. (2023) The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 1337. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- [15] Woodman, P.G. and Futter, C.E. (2008) Multivesicular Bodies: Co-Ordinated Progression to Maturity. *Current Opinion in Cell Biology*, **20**, 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2008.04.001>
- [16] Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. (2005) Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell*, **122**, 735-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>
- [17] Mashouri, L., Yousefi, H., Aref, A.R., Ahadi, A.m., Molaei, F. and Alahari, S.K. (2019) Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Molecular Cancer*, **18**, Article No. 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0991-5>
- [18] Yin, W., Ma, H., Qu, Y., Wang, S., Zhao, R., Yang, Y., et al. (2024) Targeted Exosome-Based Nanoplatfrom for New-Generation Therapeutic Strategies. *Biomedical Materials*, **19**, Article ID: 032002. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/ad3310>
- [19] Galley, J.D. and Besner, G.E. (2020) The Therapeutic Potential of Breast Milk-Derived Extracellular Vesicles. *Nutrients*, **12**, Article 745. <https://doi.org/10.3390/nu12030745>
- [20] Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. and Gupta, R.C. (2016) Bovine Milk-Derived Exosomes for Drug Delivery. *Cancer Letters*, **371**, 48-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.020>
- [21] Stefanon, B., Cintio, M., Sgorlon, S., Scarsella, E., Licastro, D., Zecconi, A., et al. (2023) Regulatory Role of MicroRNA of Milk Exosomes in Mastitis of Dairy Cows. *Animals*, **13**, Article 821. <https://doi.org/10.3390/ani13050821>
- [22] Abbas, M.A., Al-Saigh, N.N. and Saqallah, F.G. (2023) Regulation of Adipogenesis by Exosomal Milk miRNA. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **24**, 297-316. <https://doi.org/10.1007/s11154-023-09788-3>
- [23] Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2008) Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs. *Genome Research*, **19**, 92-105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- [24] Hatmal, M.M., Al-Hatamleh, M.A.I., Olaimat, A.N., Alshaer, W., Hasan, H., Albakri, K.A., et al. (2022) Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines*, **10**, Article 1219. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061219>
- [25] Zempleni, J., Sukreet, S., Zhou, F., Wu, D. and Mutai, E. (2019) Milk-Derived Exosomes and Metabolic Regulation. *Annual Review of Animal Biosciences*, **7**, 245-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115300>
- [26] Słyk-Gulewska, P., Kondracka, A. and Kwaśniewska, A. (2023) MicroRNA as a New Bioactive Component in Breast Milk. *Non-Coding RNA Research*, **8**, 520-526. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2023.06.003>
- [27] Stremmel, W., Weiskirchen, R. and Melnik, B.C. (2020) Milk Exosomes Prevent Intestinal Inflammation in a Genetic Mouse Model of Ulcerative Colitis: A Pilot Experiment. *Inflammatory Intestinal Diseases*, **5**, 117-123. <https://doi.org/10.1159/000507626>
- [28] Alsaweed, M., Lai, C.T., Hartmann, P.E., Geddes, D.T. and Kakulas, F. (2016) Human Milk Cells and Lipids Conserve Numerous Known and Novel miRNAs, Some of Which Are Differentially Expressed during Lactation. *PLOS ONE*, **11**, e0152610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152610>
- [29] Ocansey, D.K.W., Zhang, L., Wang, Y., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., et al. (2020) Exosome-Mediated Effects and Applications in Inflammatory Bowel Disease. *Biological Reviews*, **95**, 1287-1307. <https://doi.org/10.1111/brv.12608>
- [30] Kim, N., Kim, J., Lee, J., Bae, H. and Kim, C.Y. (2023) Application of Milk Exosomes for Musculoskeletal Health: Talking Points in Recent Outcomes. *Nutrients*, **15**, Article 4645. <https://doi.org/10.3390/nu15214645>
- [31] Stastna, M. (2023) Advances in Separation and Identification of Biologically Important Milk Proteins and Peptides. *Electrophoresis*, **45**, 101-119. <https://doi.org/10.1002/elps.202300084>
- [32] Timofeeva, A.M., Paramonik, A.P., Sedykh, S.S. and Nevinsky, G.A. (2023) Milk Exosomes: Next-Generation Agents for Delivery of Anticancer Drugs and Therapeutic Nucleic Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 10194. <https://doi.org/10.3390/ijms241210194>
- [33] Skotland, T., Sandvig, K. and Llorente, A. (2017) Lipids in Exosomes: Current Knowledge and the Way Forward. *Progress in Lipid Research*, **66**, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
- [34] Colitti, M., Sgorlon, S. and Stefanon, B. (2020) Exosome Cargo in Milk as a Potential Marker of Cow Health. *Journal of Dairy Research*, **87**, 79-83. <https://doi.org/10.1017/s0022029920000485>
- [35] Buratta, S., Urbanelli, L., Tognoloni, A., Latella, R., Cerrotti, G., Emiliani, C., et al. (2023) Protein and Lipid Content

- of Milk Extracellular Vesicles: A Comparative Overview. *Life*, **13**, Article 401. <https://doi.org/10.3390/life13020401>
- [36] Cui, Z., Amevor, F.K., Zhao, X., Mou, C., Pang, J., Peng, X., *et al.* (2023) Potential Therapeutic Effects of Milk-Derived Exosomes on Intestinal Diseases. *Journal of Nanobiotechnology*, **21**, Article No. 496. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02176-8>
- [37] Morozumi, M., Izumi, H., Shimizu, T. and Takeda, Y. (2021) Comparison of Isolation Methods Using Commercially Available Kits for Obtaining Extracellular Vesicles from Cow Milk. *Journal of Dairy Science*, **104**, 6463-6471. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19849>
- [38] Rashidi, M., Bijari, S., Khazaei, A.H., Shojaei-Ghahrizjani, F. and Rezakhani, L. (2022) The Role of Milk-Derived Exosomes in the Treatment of Diseases. *Frontiers in Genetics*, **13**, Article 1009338. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1009338>
- [39] Coughlan, C., Bruce, K.D., Burgy, O., Boyd, T.D., Michel, C.R., Garcia-Perez, J.E., *et al.* (2020) Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. *Current Protocols in Cell Biology*, **88**, e110. <https://doi.org/10.1002/cpcb.110>
- [40] Sidhom, K., Obi, P.O. and Saleem, A. (2020) A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- [41] Merchant, M.L., Rood, I.M., Deegens, J.K.J. and Klein, J.B. (2017) Isolation and Characterization of Urinary Extracellular Vesicles: Implications for Biomarker Discovery. *Nature Reviews Nephrology*, **13**, 731-749. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.148>
- [42] Xu, W., Li, A., Chen, J. and Sun, E. (2022) Research Development on Exosome Separation Technology. *The Journal of Membrane Biology*, **256**, 25-34. <https://doi.org/10.1007/s00232-022-00260-y>
- [43] Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., *et al.* (2015) Isolation of Exosomes by Differential Centrifugation: Theoretical Analysis of a Commonly Used Protocol. *Scientific Reports*, **5**, Article No. 17319. <https://doi.org/10.1038/srep17319>
- [44] Greening, D.W., Xu, R., Ji, H., Tauro, B.J. and Simpson, R.J. (2015) A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. In: Posch, A., Ed., *Proteomic Profiling*, Springer, 179-209. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_15)
- [45] El-Andaloussi, S., Lee, Y., Lakhal-Littleton, S., Li, J., Seow, Y., Gardiner, C., *et al.* (2012) Exosome-Mediated Delivery of siRNA *in Vitro* and *in Vivo*. *Nature Protocols*, **7**, 2112-2126. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.131>
- [46] Mondal, J., Pillarisetti, S., Junnuthula, V., Surwase, S.S., Hwang, S.R., Park, I., *et al.* (2024) Extracellular Vesicles and Exosome-Like Nanovesicles as Pioneering Oral Drug Delivery Systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **11**, Article 1307878. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1307878>
- [47] Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R. and Stevens, M.M. (2015) Active Loading into Extracellular Vesicles Significantly Improves the Cellular Uptake and Photodynamic Effect of Porphyrins. *Journal of Controlled Release*, **205**, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.029>
- [48] Zhang, M., Xu, C., Liu, D., Han, M.K., Wang, L. and Merlin, D. (2017) Oral Delivery of Nanoparticles Loaded with Ginger Active Compound, 6-Shogaol, Attenuates Ulcerative Colitis and Promotes Wound Healing in a Murine Model of Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, **12**, 217-229. <https://doi.org/10.1093/ecco-icc/jjx115>
- [49] Wu, L., Wang, L., Liu, X., Bai, Y., Wu, R., Li, X., *et al.* (2022) Milk-Derived Exosomes Exhibit Versatile Effects for Improved Oral Drug Delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **12**, 2029-2042. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.015>
- [50] Li, Y., Xing, L., Wang, L., Liu, X., Wu, L., Ni, M., *et al.* (2023) Milk-Derived Exosomes as a Promising Vehicle for Oral Delivery of Hydrophilic Biomacromolecule Drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **18**, Article ID: 100797. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100797>
- [51] Tian, M., Hao, D., Liu, Y., He, J., Zhao, Z., Guo, T., *et al.* (2023) Milk Exosomes: An Oral Drug Delivery System with Great Application Potential. *Food & Function*, **14**, 1320-1337. <https://doi.org/10.1039/d2fo02013k>
- [52] Kooijmans, S.A.A., Stremersch, S., Braeckmans, K., de Smedt, S.C., Hendrix, A., Wood, M.J.A., *et al.* (2013) Electroporation-Induced siRNA Precipitation Obscures the Efficiency of siRNA Loading into Extracellular Vesicles. *Journal of Controlled Release*, **172**, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.014>
- [53] Ahmed, F., Tamma, M., Pathigadapa, U., Reddanna, P. and Yenuganti, V.R. (2022) Drug Loading and Functional Efficacy of Cow, Buffalo, and Goat Milk-Derived Exosomes: A Comparative Study. *Molecular Pharmaceutics*, **19**, 763-774. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00182>
- [54] Wallen, M., Aqil, F., Spencer, W. and Gupta, R.C. (2023) Milk/Colostrum Exosomes: A Nanoplatfrom Advancing Delivery of Cancer Therapeutics. *Cancer Letters*, **561**, Article ID: 216141. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216141>
- [55] Tong, L., Hao, H., Zhang, X., Zhang, Z., Lv, Y., Zhang, L., *et al.* (2020) Oral Administration of Bovine Milk-Derived

- Extracellular Vesicles Alters the Gut Microbiota and Enhances Intestinal Immunity in Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, **64**, e1901251. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901251>
- [56] Zhou, F., Paz, H.A., Sadri, M., Cui, J., Kachman, S.D., Fernando, S.C., *et al.* (2019) Dietary Bovine Milk Exosomes Elicit Changes in Bacterial Communities in C57BL/6 Mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **317**, G618-G624. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00160.2019>
- [57] Benmoussa, A. and Provost, P. (2019) Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **18**, 703-722. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12424>
- [58] Liao, Y., Du, X., Li, J. and Lönnerdal, B. (2017) Human Milk Exosomes and Their MicroRNAs Survive Digestion *in Vitro* and Are Taken up by Human Intestinal Cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, **61**, Article ID: 1700082. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082>
- [59] Wolf, T., Baier, S.R. and Zemleni, J. (2015) The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *The Journal of Nutrition*, **145**, 2201-2206. <https://doi.org/10.3945/jn.115.218586>
- [60] Melnik, B.C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S.M. and Schmitz, G. (2021) Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules*, **11**, Article 851. <https://doi.org/10.3390/biom11060851>
- [61] Hussain, S., Ijaz, S., Wajid, A., Qadeer, A., Suliman, M., Alzahrani, F.M., *et al.* (2025) Decoding the Functional Plasticity of Milk-Derived Exosomes: Implications for Nutrition, Immunity, and Therapy. *Frontiers in Immunology*, **16**, Article 1645355. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1645355>
- [62] Mulcahy, L.A., Pink, R.C. and Carter, D.R.F. (2014) Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, **3**. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- [63] Manca, S., Upadhyaya, B., Mutai, E., Desaulniers, A.T., Cederberg, R.A., White, B.R., *et al.* (2018) Milk Exosomes Are Bioavailable and Distinct microRNA Cargos Have Unique Tissue Distribution Patterns. *Scientific Reports*, **8**, Article No. 11321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29780-1>
- [64] García-Martínez, J., Pérez-Castillo, Í.M., Salto, R., López-Pedrosa, J.M., Rueda, R. and Girón, M.D. (2022) Beneficial Effects of Bovine Milk Exosomes in Metabolic Interorgan Cross-talk. *Nutrients*, **14**, Article 1442. <https://doi.org/10.3390/nu14071442>
- [65] Samuel, M., Chisanga, D., Liem, M., Keerthikumar, S., Anand, S., Ang, C., *et al.* (2017) Bovine Milk-Derived Exosomes from Colostrum Are Enriched with Proteins Implicated in Immune Response and Growth. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 5933. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06288-8>
- [66] Yang, M., Song, D., Cao, X., Wu, R., Liu, B., Ye, W., *et al.* (2017) Comparative Proteomic Analysis of Milk-Derived Exosomes in Human and Bovine Colostrum and Mature Milk Samples by iTRAQ-Coupled LC-MS/MS. *Food Research International*, **92**, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.041>
- [67] Miglio, A., Moscati, L., Fruganti, G., Pela, M., Scoccia, E., Valiani, A., *et al.* (2013) Use of Milk Amyloid a in the Diagnosis of Subclinical Mastitis in Dairy Ewes. *Journal of Dairy Research*, **80**, 496-502. <https://doi.org/10.1017/s0022029913000484>
- [68] Jin, W., Ibeagha-Awemu, E.M., Liang, G., Beaudoin, F., Zhao, X. and Guan, L.L. (2014) Transcriptome MicroRNA Profiling of Bovine Mammary Epithelial Cells Challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria Reveals Pathogen Directed MicroRNA Expression Profiles. *BMC Genomics*, **15**, Article No. 181. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-181>
- [69] Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K. and Prévost, G. (2019) Coagulase-Negative Staphylococci Pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, Article 1215. <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
- [70] Rahman, M.M., Takashima, S., Kamatari, Y.O., Badr, Y., Kitamura, Y., Shimizu, K., *et al.* (2021) Proteomic Profiling of Milk Small Extracellular Vesicles from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *Scientific Reports*, **11**, Article No. 2951. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82598-2>
- [71] Nakanishi, R., Takashima, S., Wakihara, Y., Kamatari, Y.O., Kitamura, Y., Shimizu, K., *et al.* (2022) Comparing MicroRNA in Milk Small Extracellular Vesicles among Healthy Cattle and Cattle at High Risk for Bovine Leukemia Virus Transmission. *Journal of Dairy Science*, **105**, 5370-5380. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20989>
- [72] Tsukada, F., Takashima, S., Wakihara, Y., Kamatari, Y.O., Shimizu, K., Okada, A., *et al.* (2022) Characterization of miRNAs in Milk Small Extracellular Vesicles from Enzootic Bovine Leukosis Cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article 10782. <https://doi.org/10.3390/ijms231810782>
- [73] Li, D., Yao, S., Zhou, Z., Shi, J., Huang, Z. and Wu, Z. (2020) Hyaluronan Decoration of Milk Exosomes Directs Tumor-Specific Delivery of Doxorubicin. *Carbohydrate Research*, **493**, Article ID: 108032. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108032>
- [74] Li, D., Gong, L., Lin, H., Yao, S., Yin, Y., Zhou, Z., *et al.* (2022) Hyaluronic Acid-Coated Bovine Milk Exosomes for

- Achieving Tumor-Specific Intracellular Delivery of miRNA-204. *Cells*, **11**, Article 3065. <https://doi.org/10.3390/cells11193065>
- [75] Pullan, J., Dailey, K., Bhallamudi, S., Feng, L., Alhalhooly, L., Froberg, J., *et al.* (2022) Modified Bovine Milk Exosomes for Doxorubicin Delivery to Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ACS Applied Bio Materials*, **5**, 2163-2175. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00015>
- [76] Wang, L., Gao, R., Li, B., Alganabi, M., He, W., Shen, C., *et al.* (2022) Human Breast Milk-Derived Exosomes Protect against Intestinal Ischemia and Reperfusion Injury in Neonatal Rats. *Journal of Pediatric Surgery*, **57**, 1264-1268. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2022.02.029>
- [77] He, S., Liu, G. and Zhu, X. (2021) Human Breast Milk-Derived Exosomes May Help Maintain Intestinal Epithelial Barrier Integrity. *Pediatric Research*, **90**, 366-372. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01449-y>
- [78] Gao, R., Zhang, R., Qian, T., Peng, X., He, W., Zheng, S., *et al.* (2019) A Comparison of Exosomes Derived from Different Periods Breast Milk on Protecting against Intestinal Organoid Injury. *Pediatric Surgery International*, **35**, 1363-1368. <https://doi.org/10.1007/s00383-019-04562-6>
- [79] Go, G., Jeon, J., Lee, G., Lee, J.H. and Lee, S.H. (2021) Bovine Milk Extracellular Vesicles Induce the Proliferation and Differentiation of Osteoblasts and Promote Osteogenesis in Rats. *Journal of Food Biochemistry*, **45**, e13705. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13705>
- [80] Dong, M., Shi, C., Yu, X., Yang, Q., Wu, S., Liu, R., *et al.* (2022) Milk-Derived Small Extracellular Vesicles: Nanomaterials to Promote Bone Formation. *Journal of Nanobiotechnology*, **20**, Article No. 370. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01580-w>
- [81] Yun, B., Maburutse, B.E., Kang, M., Park, M.R., Park, D.J., Kim, Y., *et al.* (2020) Short Communication: Dietary Bovine Milk-Derived Exosomes Improve Bone Health in an Osteoporosis-Induced Mouse Model. *Journal of Dairy Science*, **103**, 7752-7760. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17501>
- [82] Yu, X., Dong, M., Wang, L., Yang, Q., Wang, L., Han, W., *et al.* (2023) Nanotherapy for Bone Repair: Milk-Derived Small Extracellular Vesicles Delivery of Icaritin. *Drug Delivery*, **30**, Article ID: 2169414. <https://doi.org/10.1080/10717544.2023.2169414>
- [83] Leiferman, A., Shu, J., Grove, R., Cui, J., Adamec, J. and Zempleni, J. (2018) A Diet Defined by Its Content of Bovine Milk Exosomes and Their RNA Cargos Has Moderate Effects on Gene Expression, Amino Acid Profiles and Grip Strength in Skeletal Muscle in C57BL/6 Mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **59**, 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.007>
- [84] Mobley, C.B., Mumford, P.W., McCarthy, J.J., Miller, M.E., Young, K.C., Martin, J.S., *et al.* (2017) Whey Protein-Derived Exosomes Increase Protein Synthesis and Hypertrophy in C2-C12 Myotubes. *Journal of Dairy Science*, **100**, 48-64. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11341>
- [85] Parry, H.A., Mobley, C.B., Mumford, P.W., Romero, M.A., Haun, C.T., Zhang, Y., *et al.* (2019) Bovine Milk Extracellular Vesicles (EVs) Modification Elicits Skeletal Muscle Growth in Rats. *Frontiers in Physiology*, **10**, Article 436. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00436>
- [86] Kumar, D.N., Chaudhuri, A., Shiromani, U., Kumar, D. and Agrawal, A.K. (2024) An Investigation of *in Vitro* Anti-Cancer Efficacy of Dihydroartemisinin-Loaded Bovine Milk Exosomes against Triple-Negative Breast Cancer. *The AAPS Journal*, **26**, Article No. 91. <https://doi.org/10.1208/s12248-024-00958-y>
- [87] Kumar, D.N., Chaudhuri, A., Dehari, D., Shekher, A., Gupta, S.C., Majumdar, S., *et al.* (2022) Combination Therapy Comprising Paclitaxel and 5-Fluorouracil by Using Folic Acid Functionalized Bovine Milk Exosomes Improves the Therapeutic Efficacy against Breast Cancer. *Life*, **12**, Article 1143. <https://doi.org/10.3390/life12081143>
- [88] Bruner, L.P., White, A.M. and Proksell, S. (2023) Inflammatory Bowel Disease. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **50**, 411-427. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2023.03.009>
- [89] Wang, K., Zhao, X., Liu, Y., Yan, Y., Zheng, J., Li, A., *et al.* (2025) Thermal Stability of Milk-Derived miRNAs Guides Graded Processing Strategies: Thermosensitive Biomarker Screening and P38 MAPK-Mediated Intestinal Inflammatory Regulation. *Food Research International*, **222**, Article ID: 117502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.117502>
- [90] Aare, M., Padakanti, S.C. and Singh, M. (2025) In Vivo Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Assessment of Cannabidiol-Loaded Camel Milk Exosomes in Doxorubicin-Resistant Triple-Negative Breast Cancer Xenografts. *AAPS PharmSciTech*, **26**, Article No. 227. <https://doi.org/10.1208/s12249-025-03201-9>
- [91] Kong, C., Huang, L., Yang, M., Yue, N., Zhang, Y., Tian, C., *et al.* (2025) Milk-Derived Extracellular Vesicles: Nature's Nanocarriers for Drug Delivery and Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, **16**, Article 1595891. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1595891>
- [92] Seegobin, N., Taub, M., Vignal, C., Waxin, C., Chris, V., Awad, A., *et al.* (2025) Small Milk-Derived Extracellular Vesicles: Suitable Vehicles for Oral Drug Delivery? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **212**, Article ID: 114744. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114744>

- 
- [93] Zhu, Q., Guo, J., Alee, I., Wang, C. and Li, L. (2025) Differential Expression of Bovine Milk-Derived Exosomal miRNAs and Their Role in Modulating Endometrial Receptivity during Early Pregnancy. *Research in Veterinary Science*, **190**, Article ID: 105636. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2025.105636>
- [94] Kim, K., Kim, J., Jang, H., Dan, K.B., Kim, B.K., Ji, Y.W., *et al.* (2025) Protective Effects of Human Breast Milk-Derived Exosomes on Inflammatory Bowel Disease through Modulation of Immune Cells. *npj Science of Food*, **9**, Article No. 34. <https://doi.org/10.1038/s41538-025-00400-3>
- [95] Strauch, B.M., Niemand, R.K., Winkelbeiner, N.L. and Hartwig, A. (2017) Comparison between Micro- and Nanosized Copper Oxide and Water Soluble Copper Chloride: Interrelationship between Intracellular Copper Concentrations, Oxidative Stress and DNA Damage Response in Human Lung Cells. *Particle and Fibre Toxicology*, **14**, Article No. 28. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0209-1>