

柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒在Caco-2单层细胞模型中的转运机制及其应用

康晶玲¹, 李汉宗², 李心怡¹, 梁浩斌¹, 陈尊旭¹, 钟玉鸣¹, 肖更生^{1,3}, 王琴¹, 刘祎帆^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东省普通高校药食同源食品精深加工工程技术研究中心, 广东广州 510225) (2. 波士顿大学乔巴尼安与阿韦迪西安医学院, 美国波士顿 02118) (3. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东广州 510507)

摘要: 为了探究柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒 (PP-TPNs) 在生物体内的吸收率及其在食品领域的应用潜力, 该研究采用 Caco-2 细胞单层模型评估 PP-TPNs 对细胞存活率、跨上皮电阻值及碱性磷酸酶活性的影响, 并将 PP-TPNs 添加到双柚汁、碳酸饮料和牛乳中, 通过测定色差和多酚保留率来确定其在饮料中的适用性。该实验结果显示, 在质量浓度为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, 空载颗粒和 PP-TPNs 均表现出良好的生物相容性, 细胞存活率分别为 88.83% 和 84.27%; PP-TPNs 在 Caco-2 细胞单层模型上的单向转移率分别为 41.72% 和 32.91%, 双向转运系数为 1.60。应用实验结果显示, 4 $^{\circ}\text{C}$ 储藏 30 d 后 PP-TPNs 双柚饮料和 PP-TPNs 碳酸饮料中多酚保留率分别为 82.42% 和 79.62%; 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 1 h 后 PP-TPNs 蛋白饮料中多酚保留率在 91.89%。该研究结论为 PP-TPNs 在小肠中易被吸收, 吸收方式以主动运输为主; PP-TPNs 在高温、光照等不利环境下仍能在饮料中稳定存在, 这为深入研究 PP-TPNs 在肠道中的吸收机制提供了基础, 并为相关应用研究指明方向。

关键词: 纳米颗粒; 柚皮蛋白; 茶多酚; Caco-2 单层细胞模型; 饮料

文章编号: 1673-9078(2025)04-14-24

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.4.1957

Pomelo Peel Protein-tea Polyphenol Nanoparticle Applications and Elucidation of Their Transport Mechanism in a Caco-2 Cell Monolayer Model

KANG Jingling¹, LI Hanzong², LI Xinyi¹, LIANG Haobin¹, CHEN Zunxu¹, ZHONG Yuming¹, XIAO Gengsheng^{1,3}, WANG Qin¹, LIU Huifan^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Science, Universities in Guangdong Province Lingnan Special Food-Medicine Homology Diet Nutrition and Health Engineering Research Center, Zhongkai University of Agriculture and

引文格式:

康晶玲, 李汉宗, 李心怡, 等. 柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒在Caco-2单层细胞模型中的转运机制及其应用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(4): 14-24.

KANG Jingling, LI Hanzong, LI Xinyi, et al. Pomelo peel protein-tea polyphenol nanoparticle applications and elucidation of their transport mechanism in a Caco-2 cell monolayer model [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(4): 14-24.

收稿日期: 2024-12-31

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2022B0202040002); 广东省普通高校工程技术研究 (开发) 中心 (2024GCZX002); 广东省百校联百县助力百千万工程行动项目 (BQW2024001); 广东省重点建设学科科研能力提升项目 (2022ZDJS021)

作者简介: 康晶玲 (1999-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 18109438006@163.com; 共同第一作者: 李汉宗 (1998-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 法医科学与技术, E-mail: lhq27cn27@gmail.com

通讯作者: 刘祎帆 (1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物开发, E-mail: lm_zkng@163.com

Engineering, Guangzhou 510225, China) (2. Boston University Chobanian & Avedisian School of Medicine, Boston 02118, USA) (3. Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510507, China)

Abstract: To explore the absorption efficiency of pomelo peel protein-tea polyphenol nanoparticles (PP-TPNs) *in vivo* and elucidate potential food industry applications, the effects of PP-TPNs on cell viability, transepithelial electrical resistance, and alkaline phosphatase activity were evaluated using a Caco-2 cell monolayer model. PP-TPNs were also added to pomelo juice, carbonated beverages, and milk to determine their impacts on beverages by measuring color differences and polyphenol retention rates. At 400 $\mu\text{g/mL}$, unloaded nanoparticles and PP-TPNs both exhibit good biocompatibility, and respective cell viability rates are 88.83% and 84.27%. The respective unidirectional transport rates of PP-TPNs across a Caco-2 cell monolayer are 41.72% and 32.91%, and the bidirectional transport coefficient is 1.60. Application experiments indicate that after storage at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 30 days, the respective polyphenol retention rates in pomelo juice and carbonated beverages with added PP-TPN are 82.42% and 79.62%. After heating at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h, the polyphenol retention rate in protein beverages with PP-TPNs remains at 91.89%. These studies indicate that PP-TPNs can easily be absorbed in the small intestine, primarily through active transport. PP-TPNs can also remain stable in beverages under adverse conditions such as high temperatures and light exposure. These findings provide a basis for further research on the absorption mechanism of PP-TPNs in the gut and offer insights to guide related application research.

Key words: nanoparticles; pomelo peel proteins; tea polyphenols; Caco-2 cell monolayer model; beverages

茶多酚 (Tea Polyphenols, TP) 是决定茶叶色、香、味和功效的主要成分, 占茶叶干重的 20%~30%^[1], 具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]、抗癌^[4]、抗辐射^[5]等生物活性。由于茶多酚对胃肠道环境敏感、被生物体内的酶分解导致口服生物利用度很低^[6]; 并且对温度、光、pH 和氧气的稳定性差, 在长期储存过程中容易被降解, 因此在很大程度上限制了其在食品领域的应用。纳米包埋是目前能够改变这一现状的最好手段, 常见的纳米递送体系主要包括脂质体、乳液、纳米颗粒、微胶囊等^[7]。递送体系中的天然高分子纳米载体具有靶向转运、生物相容性、可降解性和高安全性的特点, 根据其分子量分为两类: 小分子类 (卵磷脂) 和大分子类 (蛋白质、碳水化合物聚合物)^[8]。茶多酚纳米颗粒 (Tea Polyphenols Nanoparticles, TPNs) 利用食物蛋白和壳聚糖作为茶多酚的载体, 可显著促进肠道对茶多酚的吸收^[9]。壳聚糖是从水产中分离的唯一能结合酸分子的碱性多糖, 因其结构中存在大量的游离氨基而带正电荷^[10], 已经证实壳聚糖作为载体可以可逆性的打开上皮细胞之间的紧密连接或通过跨细胞途径促进纳米颗粒在细胞中的转运, 增加 TP 的肠道通透性和吸收^[11]。柚皮清蛋白是一种良好的植物源免疫蛋白, 细胞免疫活性强^[12], 其自身存在的三维空间网络结构易于装载茶多酚, 且酸性蛋白带负电荷。这两种物质特殊的生物结合特性能够通过静电复合装载茶多酚形成 TPNs。

Caco-2 (Cancer Cell-2) 细胞是从人类结肠癌中衍生的上皮细胞, 在体外培养分化后的单层结构与肠细胞结构功能相似, 具有微绒毛结构、相邻细胞间连接紧密并含有小肠刷状缘上皮相关的酶系, 已被广泛应用于多种肠道研究^[13,14]。因此采用 Caco-2 细胞模型探究纳米颗粒在肠道内的转运和摄取机制真实可靠。

为解决 TP 口服生物利用度低、储存时易被氧化的问题, 本课题组已经开发出一种柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒 (PP-TPNs), 粒径范围 538.5~668.6 nm, 包埋率 43.04%。本文在此基础上通过 Caco-2 模型确定 PP-TPNs 渗透率, 探究转运机制, 并且将其应用于不同饮料中, 为相关食品研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

茶多酚: 准确称取 1.0 g 茶粉末于离心管, 溶解于 pH 值 3.5 的磷酸缓冲液中, 添加果胶纤维素复合酶质量比为 2:1, 添加量 1.5%, 酶解 4.5 h, 600 W、60 $^{\circ}\text{C}$ 下超声 30 min 后, 3 000 r/min、20 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 5 min, 抽滤取全部上清液旋蒸后冻干得茶多酚。

柚皮蛋白: 采用林诺怡等^[12]得方法准确称取 50.0 g 柚皮粉末与去离子水 1:15 混合, 调 pH 值至 11.0, 水浴提取 (50 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 h) 后离心 (4 500 r/min, 10 min), 取上清液用 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 值为 7.0, 再次水浴提取 (50 $^{\circ}\text{C}$, 0.5 h), 离心 (4 500 r/min,

10 min) 取上清液调 pH 值调至 4.0, 离心取固形物冻干得柚皮蛋白。

壳聚糖季铵盐 (货号 850124), 上海麦克林生化科技股份有限公司; Caco-2, 上海赛百慷生物; 胎牛血清 (货号 164210-50), 普诺赛; MEM 培养基 (货号 10-010-CV), 康宁; PBS (货号 PB180327), 普诺赛; 胰酶 (货号 BL512A), Biosharp; 碱性磷酸酶检测试剂盒 (货号 P0321S), 碧云天; CCK8 (货号 IV08-100), Invigentech; Hanks 缓冲液 (货号 H1025), 索莱宝; 12 孔 Transwell 板 (货号 14212), 甄选; 总酚含量测定试剂盒 (货号 P930444), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 其他试剂均为分析纯。牛乳 (货号 6907992502052), 内蒙古伊利实业集团股份有限公司; 双柚汁复合果汁饮料 (货号 6936240138309), 梅州市珍宝金柚实业有限公司; 碳酸饮料 (货号 695392510012), 可口可乐广东饮料有限公司。

1.2 主要仪器设备

WIGGENSWCI-180 CO₂ 恒温培养箱, 北京桑翌实验仪器研究所; SW-CJ-2FD 超净工作台, 上海笃特科学仪器有限公司; TD5 离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; ERS-2 细胞电阻仪, Millipore Millicell; HBS-1096A 酶标分析仪, 南京德铁生物科技有限公司; XO-SM100 超声波微波协同反应工作站, 南京先欧仪器制造有限公司; SCIENTZ-18N/B 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 柚皮蛋白-茶多酚纳米颗粒的制备

将 1 g 柚皮蛋白溶于 100 mL 纯水中, 磁力搅拌 1 h, 在 8 000 r/min, 4 °C 条件下离心 20 min, 离去除不溶蛋白后 4 °C 静置过夜水和后为溶液 1, 柚皮蛋白的终浓度为 1% (m/V); 将 1 g 壳聚糖季铵盐溶于 100 mL 纯水中, 磁力搅拌 2 h 后加入 0.5 g 茶多酚, 溶解条件为 50 °C 水浴, 完全溶解后 4 °C 静置过夜水和后得到溶液 2, 壳聚糖季铵盐终浓度为 1% (m/V), 茶多酚终浓度为 0.5% (m/V); 将溶液 1 与溶液 2 进行 1:1 混合, pH 值调至 6±0.1, 加入苯甲酸钠使其终浓度为 1% (m/V), 在 20 W/cm³, 5 s 开 5 s 关超声 5 min 制备成纳米颗粒溶液, 经预冷后冻干得到 PP-TPNs, 保存在冰箱中以用于后续实验。

1.3.2 Caco-2 细胞培养

Caco-2 细胞在 37 °C 水浴复苏后, 按照 79% (V/V) MEM 基础培养基, 20% (V/V) 胎牛血清, 1% (V/V)

青霉素-链霉素的比例配制完全培养基, 培养条件为 5% (V/V) CO₂、37 °C、饱和湿度。

1.3.3 PP-TPNs 对细胞存活率的影响

用完全培养基将 PP-TPNs 和空载颗粒 (PP-Ns) 配置成 100、200、400、800、1 000 μg/mL 的溶液, 取对数生长期的 Caco-2 细胞, 进行细胞计数, 调整细胞浓度, 按照 4×10⁴ 个接种到 96 孔板中, 空白组每孔加入 100 μL 的完全培养基, 实验组每孔加入 100 μL 的 PP-TPNs 溶液, 对照组每孔加入 100 μL 的 PP-Ns 溶液, 5% (V/V) CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养 24 h。移除培养基, 用 PBS 清洗各孔三次, 按照每孔 100 μL 加入含 10% (V/V) CCK8 的培养基, 5% (V/V) CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱中培养 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。按照式 1 计算相对细胞活力。

$$B = \frac{A_1 - A}{A_0 - A} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B——相对细胞活力 (RCA), %;

A₁——实验组 / 对照组在 450 nm 处的吸光度;

A——多孔板本身 (未加培养基和细胞的孔) 在 450 nm 处的吸光度;

A₀——空白组在 450 nm 处的吸光度。

1.3.4 体外 Caco-2 细胞模型的构建

取对数生长期的 Caco-2 细胞, 进行细胞计数, 调整细胞浓度, 按照 4×10⁴ 个 / 孔接种到 12 孔板的 Transwell 小室中, 置于 5% (V/V) CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱中进行培养。在 1、3、6、9、12、15、18 和 21 d 进行细胞形态拍摄、电阻值检测、并收取滤膜的顶侧 (Apical Side, AP) 和基底侧 (Basolateral Side, BL) 上清液进行 ALP 检测。测定电阻值后按照式 2 计算细胞 TEER 值。ALP 测定时取 0.5 mmol 的 p-nitrophenol 溶液 4、8、16、24、32、40 μL, 用 DEA 缓冲液补充至 100 μL, 在 420 nm 下检测吸光度绘制标准曲线; 细胞样品稀释后取 10 μL 加入 50 μL 显色底物, 用 DEA 缓冲液补充至 100 μL, 在 420 nm 下检测吸光度 A₁, 空白对照为 50 μL 显色底物, 50 μL DEA 缓冲液, 在 420 nm 下检测吸光度 A₂, 根据标准曲线计算样品中 p-nitrophenol 生成量 Y, 按式 3 计算碱性磷酸酶活性。

$$H = (R_1 - R_0) \times S \quad (2)$$

式中:

H——跨上皮细胞膜电阻值 (TEER), Ω·cm²;

R_1 —Caco-2 细胞电阻值, Ω ;

R_0 —空白膜电阻值, Ω ;

S —膜面积, 1.13 cm^2 。

$$U = \frac{Y}{1 \times t} \times D \quad (3)$$

式中:

U —酶活力, U/L;

Y —样品中生成 p-nitrophenol 生成量, μL ;

1 —每分钟水解 para-nitrophenyl phosphate 显色底物产生 $1 \mu\text{mol}$ p-nitrophenol 所需的碱性磷酸酶的量定义为一个酶活力单位;

t —反应时间, 30 min;

D —稀释倍数, 20 000。

1.3.5 PP-TPNs 吸收的测定

将构建好的 Caco-2 单层细胞模型用预热至 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 Hanks 缓冲液清洗 2 次, 弃去缓冲液, 分别添加 $500 \mu\text{L}$ pH 值 6.0 的 Hanks ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) 到 AP 侧和 $1500 \mu\text{L}$ pH 值 7.4 的 Hanks ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) 到 BL 侧, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 15 min 后 AP 侧和 BL 侧均更换为 Hanks 缓冲液, 弃去缓冲液。正向转运实验: 在 AP 侧加入 $500 \mu\text{L}$ $400 \mu\text{g/mL}$ 的 PP-TPNs 溶液, BL 处加入 $1500 \mu\text{L}$ 的 Hanks 缓冲液; 反向转运实验: 在 AP 侧加入 $1500 \mu\text{L}$ 的 Hanks 缓冲液, BL 侧加入 $500 \mu\text{L}$ $400 \mu\text{g/mL}$ 的 PP-TPNs 溶液, 将 Transwell 板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育至 3 h。样本采集前后检测电阻值, 按照式 2 计算 TTER 值。将 TP 溶于 Hanks 制备成 $400 \mu\text{g/mL}$ 的 TP 溶液, 进行紫外全波长扫描, 确定在波长为 223 nm 时吸光值最大, 采用溶解于 Hanks 溶液的浓度梯度 TP 溶液在 223 nm 下测定吸光值, 并绘制标准曲线。采集的样本在 223 nm 下测定吸光值, 按照标准曲线计算 TP 浓度后根据公式 4 计算 PP-TPNs 的 Caco-2 细胞吸收率, 按照公式 5 计算表观渗透系数, 按照公式 6 计算双向转运系数。

$$G = \frac{C_1}{C_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

G —TP 在 Caco-2 细胞模型的吸收率 (Abs), %;

C_1 —BL 侧 TP 质量浓度, $\mu\text{g/mL}$;

C_0 —AP 侧初始样品 TP 质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

$$P_{\text{app}} = \frac{dC/dt}{S \times C_0} \quad (5)$$

式中:

P_{app} —表观渗透系数, cm/s ;

dC/dt —单位时间内 BL 侧 TP 的浓度变化, $\mu\text{g/s}$;

S —细胞膜面积, 1.13 cm^2 ;

C_0 —AP 侧 TP 的起始质量浓度, $\mu\text{g/mL}$ 。

$$P_{\text{appratio}} = \frac{P_{\text{appBL-AP}}}{P_{\text{appAP-BL}}} \quad (6)$$

式中:

P_{appratio} —双向转运系数, cm/s ;

$P_{\text{appBL-AP}}$ —反向转运表观渗透系数, cm/s ;

$P_{\text{appAP-BL}}$ —正向转运表观渗透系数, cm/s 。

1.3.6 PP-TPNs 在饮料中的应用

根据饮料不同的基质选取乳饮料、碳酸饮料和果汁饮料作为添加 PP-TPNs 的基底饮料。国标^[15]针对各类茶饮料中 TP 含量有明确规定, 在果味、乳饮料中茶多酚最大添加量为 200 mg/kg , 在碳酸饮料中茶多酚最大添加量为 100 mg/kg 。

1.3.6.1 饮料样品制备

PP-TPNs 蛋白饮料: 根据国标和细胞毒性结果, 将 PP-TPNs 按 400 mg/kg (相当于茶多酚添加量 80 mg/kg) 加入牛乳中磁力搅拌至溶解制作而成; PP-TPNs 碳酸饮料: 根据国标和细胞毒性结果, 将 PP-TPNs 按 200 mg/kg (相当于茶多酚添加量 40 mg/kg) 加入市售无色碳酸饮料中磁力搅拌至溶解制作而成; PP-TPNs 双柚饮料: 根据国标和细胞毒性结果, 将 PP-TPNs 按 400 mg/kg (相当于茶多酚添加量 80 mg/kg) 加入双柚汁磁力搅拌至溶解中制作而成。

1.3.6.2 PP-TPNs 双柚饮料和 PP-TPNs 碳酸饮料的储藏稳定性

将添加 PP-TPNs 双柚饮料和 PP-TPNs 碳酸饮料分别置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗、 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗、自然光室温 (Natural Light, NL)、避光室温 (Avoid Light, AL)、白炽光室温 (Incandescent Light, IL) 的条件下储存, 一月内每 5 d 测定不同储藏条件下不同饮料体系中多酚保留率和色差。用色差仪测定获得 L 、 a 、 b 值, 取适量饮料置于比色皿, 色差仪的模式为总透射, 区域 1 000 in, 紫外过滤正常、非标准化设置, 按照公式 (7) 计算色差。取样品 0.1 mL 加入 2 mL 60% 乙醇, 振荡提取 2 h 后 $10\ 000 \text{ g}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 离心 10 min 取上清, 用 $\varphi=60\%$ 乙醇定容至 2 mL , 用试剂盒测定多酚含量。

$$E = \sqrt{L^2 + a^2 + b^2} \quad (7)$$

式中:

E —色差;

L —亮度;

a —红绿度;

b —黄蓝度。

1.3.6.3 PP-TPNs蛋白饮料的加热稳定性

将添加 PP-TPNs 蛋白饮料置于 95 °C 水浴锅中, 1 h 内每 10 min 测定体系中多酚的保留率和色差, 由此表征纳米颗粒牛乳的加热稳定性。

1.3.7 统计学分析

所有实验设置 3 组平行, 实验结果用平均值 ± 标准差表示。采用 SPSS 27.0.1 软件进行数据分析, Origin 2021 作图。

2 结果与讨论

2.1 PP-TPNs对细胞存活率的影响

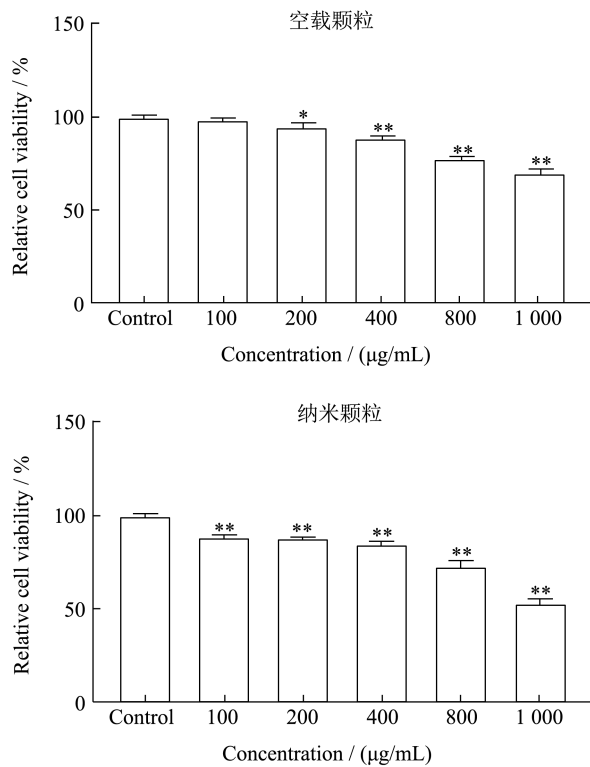


图 1 Caco-2 细胞与样品共培养 24 h 时细胞的活力变化

Fig.1 Changes in cell viability of Caco-2 cells cultured with samples for 24 h

注: Control 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 误差棒表示 ± 标准偏差 ($n=3$)。

CCK8 法 (Cell Counting Kit-8), 基于 WST-8 (2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐) 的一种检测方法。WST-8

在电子耦合试剂存在的情况下, 可以被细胞线粒体内的脱氢酶还原成橙黄色的 Formazan 化合物, 此时 Caco-2 细胞数目与颜色深浅呈线性关系, 细胞增殖越多越快颜色越深, 细胞毒性越大颜色越浅。CCK-8 法与普通的 MTT 法相比, 具有更高的灵敏度和稳定性, 且线性范围更宽^[16]。细胞活力测定结果如图 1, 在空载颗粒 PP-Ns 质量浓度为 400、800 µg/mL 时细胞存活率为 88.83%、77.48%, 纳米颗粒 PP-TPNs 质量浓度为 400、800 µg/mL 时的细胞存活率为 84.27%、73.01%。有研究表明, 如果样品导致细胞存活率低于 80% 时, 则表明该样品对细胞有毒性作用^[17], PP-Ns 和 PP-TPNs 相对质量浓度在 100~400 µg/mL 范围内均无细胞毒性, 表明 PP-Ns 和 PP-TPNs 均具有良好的生物相容性, 选用 400 µg/mL 的质量浓度进行后续分析。

2.2 体外Caco-2细胞模型的构建

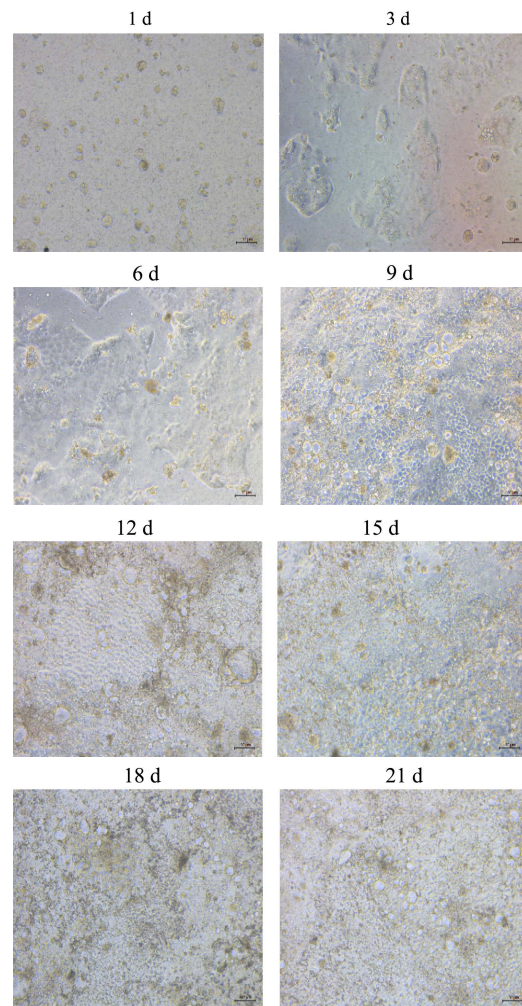


图 2 Caco-2 生长不同天数细胞形态学观察

Fig.2 Morphological observation of Caco-2 cell with different growth days

人工构建 Caco-2 细胞单层膜模型能够模拟小肠上皮细胞的功能和特性。本实验通过显微镜 (100 μm) 观察记录了 Caco-2 细胞在不同生长阶段的形态变化如图 2 所示, 清晰的展示了 Caco-2 细胞紧密连接程度的演变。在培养的最初阶段, Caco-2 细胞的分布较为稀疏, 细胞间的空隙较大; 随着培养时间的延长第 3 天可以观察到细胞开始形成更为致密的结构, 这表明细胞间的连接正在增强; 到第 6 天细胞已经覆盖了孔板大部分区域, 显示出良好的生长态势; 第 9 天细胞间隙显著减少, 表明细胞间的紧密连接程度进一步提高; 第 12 天后细胞开始进入对数增长期, 生长速度加快; 第 15 天由于细胞数量的增加, 细胞开始受到挤压, 体积变小; 到第 21 天时细胞单层膜的连接变得非常紧密, 形成了一个完整的细胞屏障。这种形态学上的变化趋势表明 Caco-2 细胞单层膜模型已经成功建立^[18], 可用于后续实验。

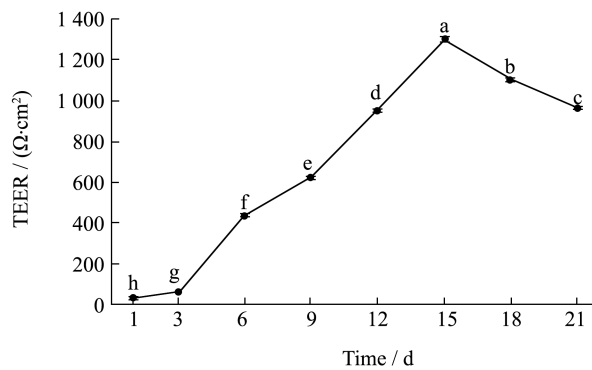


图 3 Caco-2 生长不同天数 TEER 值测定

Fig.3 The TEER value of Caco-2 cell with different growth days

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。图 9、10 同。

在评估细胞单层膜的紧密连接程度时, 跨上皮电阻 (Trans epithelial Electrical Resistance, TEER) 值是一个关键的参数。TEER 值的高低反映了细胞单层膜的紧密连接程度, 进而间接反映了膜的渗透性, TEER 值越高, 表示单层细胞的紧密连接越好, 渗透性越低; 反之, TEER 值越低, 膜的渗透性越高^[19]。根据图 3 可知, TEER 值从第 6 天至第 15 天呈稳定上升趋势, 这与细胞生长和紧密连接程度的增加相一致。在第 18 天, 由于细胞密度过高导致营养耗竭和代谢废物积累, TEER 值出现了下降^[20]。尽管如此, 到了第 21 天, TEER 值仍然保持在 $966.15 \Omega\cdot\text{cm}^2$ 的高水平。有研究表明, TEER 值

在 $200\sim 1\ 000 \Omega\cdot\text{cm}^2$ 范围内, 表示 Caco-2 细胞紧密度良好^[21], 适合用于后续实验。

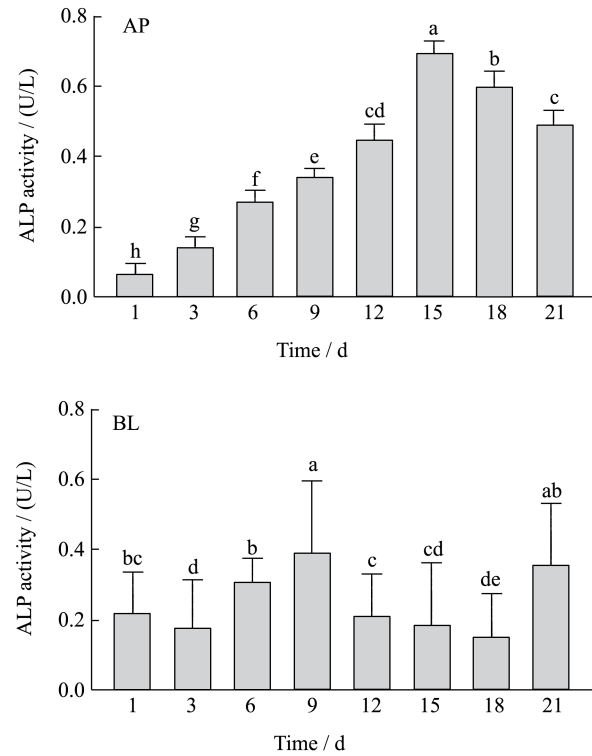


图 4 Caco-2 生长不同天数 ALP 酶活测定

Fig.4 The ALP activity of Caco-2 cell with different growth days

注: 不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$); AP: 膜顶侧; BL: 膜基底侧。

除了 TEER 值, 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, ALP) 活性也是评估 Caco-2 细胞极性形成的一个重要指标。ALP 是小肠上皮细胞的标志性酶之一, 其在 Caco-2 细胞模型中其活性可以反应细胞极性的形成^[22]。Caco-2 细胞极化后, 形成具有极性的单细胞层, 分化出肠腔 AP 侧和肠内壁 BL 侧。AP 侧含有各种营养物质转运载体, 能够发挥主动转运物质的作用, 因此在 AP 侧可以检测到 ALP 酶活力。通过建立的标准曲线 $y=0.026\ 5x-0.001\ 7$ ($R^2=0.999\ 7$), 我们可以得出酶活结果。如图 3 所示, Caco-2 细胞两侧的 ALP 活性随细胞生长天数的增加而发生显著变化, AP 侧的 ALP 酶活先增加后降低, 这与 TEER 的检测结果保持一致, 进一步证实了实验数据的真实性和可靠性。到了第 21 天, ALP 活力 AP/BL 比值达到 10 倍以上, 这表明 Caco-2 细胞单层膜已经形成并展现出明显的极性分化特征, 为后续实验的进行提供了基础。

表 1 Caco-2细胞单层膜上的转移率

Table 1 Conversion rate of Caco-2 cells on monolayer membrane

Groups	TEER/($\Omega \cdot \text{cm}^2$)		Transfer Inde/%	Papp(10^{-6} cm/s)	P _{app} ratio
	Before	After			
AP-BL	928.84 \pm 4.41	923.19 \pm 6.10	41.72 \pm 0.02	7.30 \pm 0.01	1.60 \pm 0.02
BL-AP	892.12 \pm 3.28	881.95 \pm 7.12	32.91 \pm 0.03	7.06 \pm 0.57	

2.3 PP-TPNs吸收的测定

研究表明 TP 中多种儿茶素在小肠的吸收转运方式以主动外排为主^[23]，这被认为是茶多酚生物利用度低的原因之一。本实验通过研究 PP-TPNs 在 Caco-2 细胞单层模型上的转运吸收，揭示了其在模拟小肠上皮细胞吸收过程中的特性，并证实了包埋技术能够提高茶多酚的生物利用度。实验中，通过构建标准曲线 $y=0.000\ 079\ 5x+0.000\ 033\ 9$ ($R^2=0.9879$)，可以得出样品中 TP 浓度，进而计算样品在 Caco-2 细胞模型上的吸收率，结果如表 1 所示。采样前后 TEER 值未发生显著变化，表明实验操作过程中未破坏 Caco-2 细胞单分子层的完整性，维持了细胞屏障的功能状态。正向转运实验（从 AP 侧到 BL 侧）的吸收率高于反向转运实验（从 BL 侧到 AP 侧），这一结果证明了 PP-TPNs 在 Caco-2 细胞单层模型上的吸收作用大于外排作用，而且两种吸收率均高于 20%，根据国际标准对难吸收物质的定义^[24]，这表明 PP-TPNs 易穿过小肠细胞屏障，具有良好的吸收潜力。Papp（表观渗透系数）是用于评估分子渗透性的关键指标，能够预测药物在体内的吸收情况。目前研究认为当 Paap 值大于 1×10^{-6} cm/s 时，可以认为吸收良好^[25]。此外，当 Papp 比值（Pappratio，正向 Papp 与反向 Papp 的比值）大于 0.5 小于 1.5 时通常被认为是被动运输^[26]，而该实验中 Pappratio 大于 1.5，这可能意味着 PP-TPNs 在 Caco-2 细胞单层模型上存在主动运输机制，佐艳秋^[23]的研究表明 EGCG 和 ECG 在小肠中的 Pappratio 为 0.47 和 0.40，均小于 0.5 属于主动外排，对比研究表明包埋技术能够提高 TP 在生物体内的吸收率。PP-TPNs 的壁材之一是壳聚糖，有研究表明壳聚糖作为载体可以可逆性打开上皮细胞之间的紧密连接，促进纳米颗粒在细胞旁路中的转运，增加肠道通透性和吸收^[11]，这种特性也解释了 PP-TPNs 在 Caco-2 细胞上的高吸收率。上述内容表明 PP-TPNs 在 Caco-2 细胞上展现出了良好的吸收特性，这可能归因于其主动运输和

细胞旁路途径的跨膜吸收机制，以及壳聚糖壁材对细胞紧密连接的调节作用，这些发现为 PP-TPNs 能够提高了茶多酚的生物利用度提供了有力的实验支持。

2.4 PP-TPNs在饮料中的应用

2.4.1 PP-TPNs双柚饮料和PP-TPNs碳酸饮料的储藏稳定性

为了进一步探索 PP-TPNs 在食品工业中的应用潜力，我们将其加入到两种常见的酸性饮料体系中：双柚汁饮料（pH 值 3.61）和碳酸饮料（pH 值 3.67），目标是开发富含 TP 的创新饮品。Mona 等^[27]的研究表明，TP 具有减轻碳酸饮料等酸性饮料对牙齿的侵蚀作用，并能增加牙釉质表面的硬度，这对于开发具有健康效益的饮品具有重要意义。在两种饮料中加入 PP-TPNs 后于不同条件下储存 30 d，通过监测饮料的色差值和多酚含量的变化，评估 PP-TPNs 在饮料体系中的分散均匀性和稳定性，并确定这两种饮料的最佳储藏条件。基底双柚汁和碳酸饮料的色差值为 83.39 和 74.61，置于离心管中肉眼观察两种饮料，如图 5 所示，分别呈现为透明亮黄色无沉淀和透明白色有气泡，加入纳米颗粒后，PP-TPNs 双柚饮料有细微沉淀，图 6 可以看出其色差值明显下降；PP-TPNs 碳酸饮料颜色略微发黄，气泡在搅拌过程中破裂，色差值显著上升。不同储藏条件下的 PP-TPNs 双柚饮料在第 5 天时色差值出现了显著变化，这可能是由于纳米颗粒在饮料中逐渐均匀分布，导致色差值的变化。有文献报道，饮料中的 TP 在碱性条件和加热条件下会发生颜色变化，色差值降低^[28]，在本实验 35 $^{\circ}\text{C}$ 的储藏条件下，第 5 天至第 30 天储藏期间内，PP-TPNs 双柚饮料的色差值在统计学上没有差异，这表明 TP 被成功包埋且 PP-TPNs 能够在双柚汁中稳定存在。NL 储藏 15 d 后的 PP-TPNs 双柚饮料色差值明显小于 IL 和 AL 储藏条件下的，建议该饮料不进行露天售卖。图 6b 展示了 PP-TPNs 碳酸饮料在储存过程中色差

值的变化。数据显示,在第5天色差值发生显著变化。特别是在自然光照射和 35 °C 储存环境下,饮料的色差值较其他条件显著下降,这表明 PP-TPNs 碳酸饮料不宜在这些条件下长时间存放。因此,建议将该饮料存放在常温或冷藏环境中以保持其品质。测定多酚含量时的标准曲线为 $y=2.808x+0.0012$ ($R^2=0.9994$),图 7 揭示了饮料模型中多酚含量的变化情况,研究发现,储藏温度显著影响 PP-TPNs 饮料中 TP 的稳定性。在 4 °C 的低温储藏条件下,30 d 后两种饮料的多酚保留率分别为 82.42% 和 79.62%。相对而言,35 °C 的高温储藏对饮料的影响更为显著,有研究人员通过储藏动力学模型研究证实,温度是影响饮料物理化学稳定性的重要因素^[29]。在自然光照射条件下,两种饮料模型中多酚含量降至 72.64% 和 73.47%,这表明光照对饮料的影响大于温度。对比图 7a、7b 可以发现,碳酸饮料的多酚保留率变化小于双柚汁饮料,这可能是因为在整个储藏过程中,碳酸饮料的 pH 值都略高于双柚汁,为 PP-TPNs 提供了更稳定的环境。结果表明适当低温、避光更有助于延长饮料的保存期限。综合以上结果,可以得出结论,适当的低温和避光储藏条件更有助于延长 PP-TPNs 饮料的保存期限,从而保持其营养价值和感官品质。这不仅为 PP-TPNs 在食品饮料中的应用提供了科学依据,也为开发具有健康益处的功能性饮料提供了新的思路。通过优化储藏条件,可以最大限度地保持 PP-TPNs 饮料中的多酚含量,从而提高其在市场上的核心竞争力和消费者的认可度。

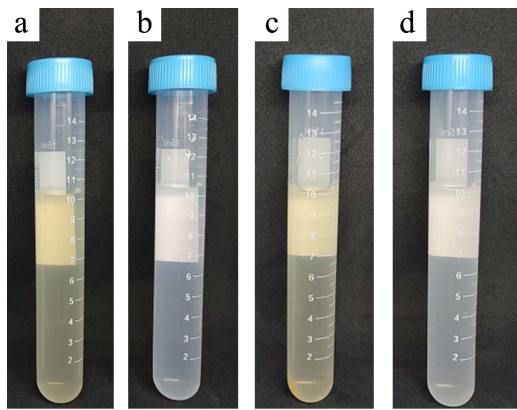


图 5 (a) 双柚汁、(b) 碳酸饮料、(c) PP-TPNs 双柚汁、(d) PP-TPNs 碳酸饮料色泽观察

Fig.5 (a) Double pomelo juice, (b) carbonated beverages, (c) PP-TPNs Double pomelo juice, (d) PP-TPNs carbonated beverages color observation

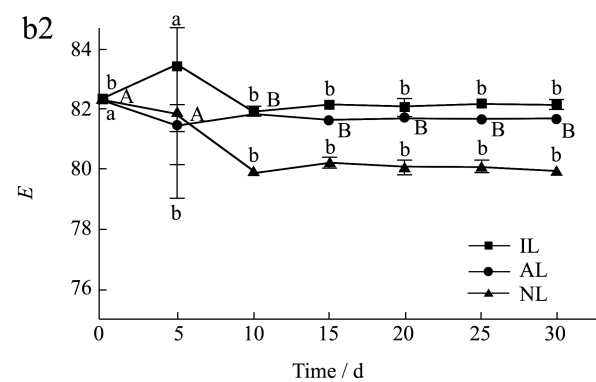
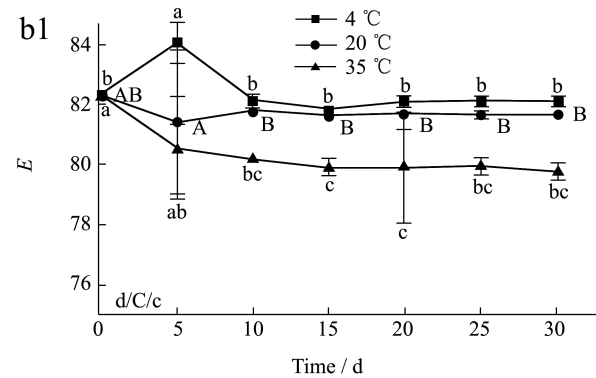
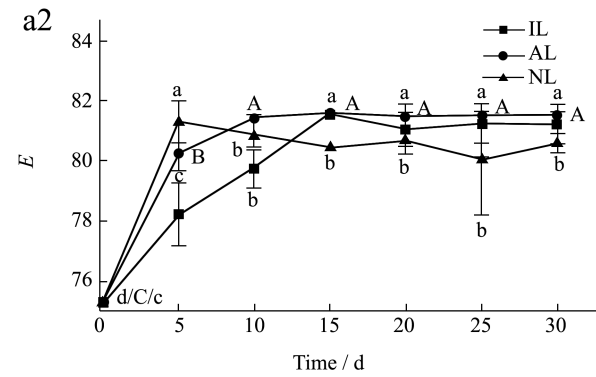
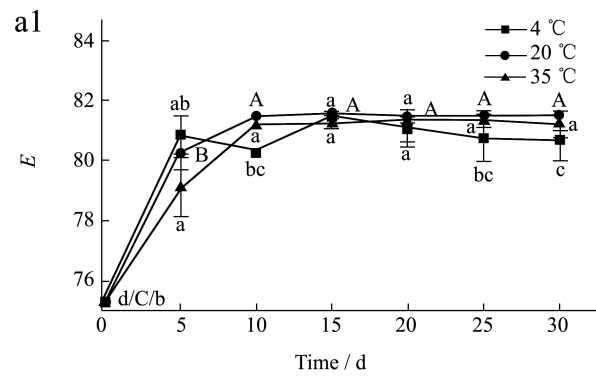


图 6 PP-TPNs (a) 双柚汁 (b) 碳酸基底饮料的色差 Fig.6 E of PP-TPNs in (a) Double pomelo juice (b) carbonated beverages

注: 不同位置的大小写字母表示数据具有显著差异 ($P<0.05$)。

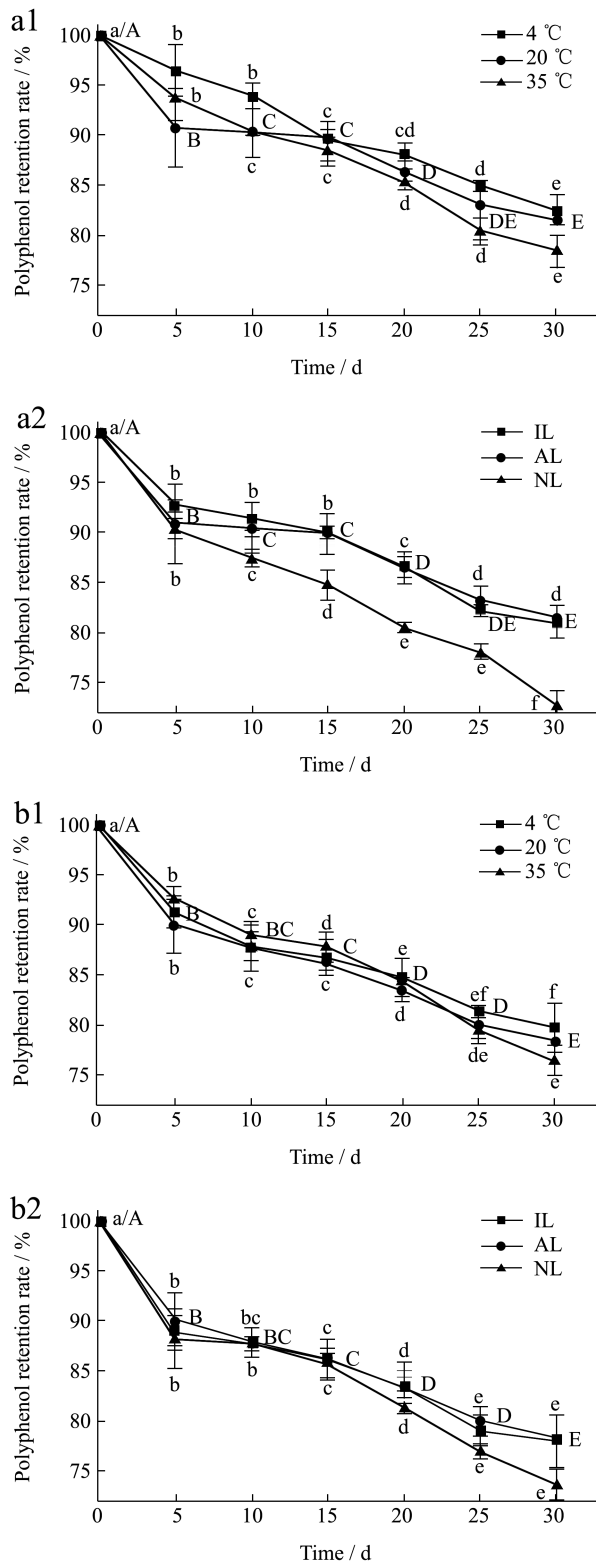


图7 PP-TPNs在(a)双柚汁和(b)碳酸饮料中的多酚保留率

Fig.7 Polyphenol retention rates of PP-TPNs in (a) Double pomelo juice and (b) carbonated beverages

注：不同位置的大小写字母表示数据具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.2.2 PP-TPNs蛋白饮料的加热稳定性

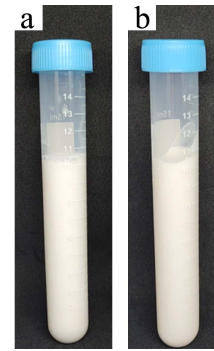


图8 (a)牛乳 (b) PP-TPNs 蛋白饮料色泽观察

Fig.8 (a) Milk (b) PP-TPNs protein beverages color observation

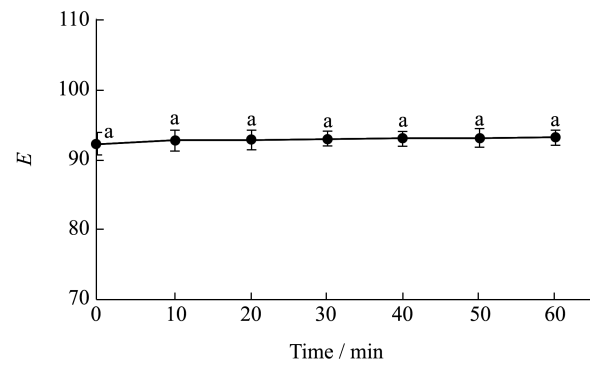


图9 PP-TPNs 牛乳的色差

Fig.9 E of PP-TPNs in milk

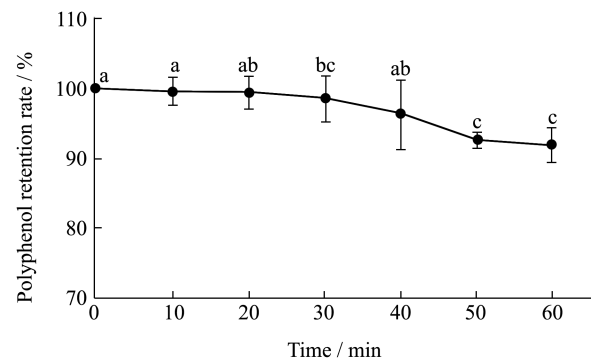


图10 PP-TPNs 在牛乳中的多酚保留率

Fig.10 Polyphenol retention rate of PP-TPNs in milk

热处理是奶茶产品生产中一个不可或缺的步骤，它不仅能够提升产品的口感和风味，还对产品的安全性和稳定性起到关键作用。本研究中将 PP-TPNs 作为一种营养成分加入到牛乳中，并进行了加热处理。基底牛乳的初始色差值为 93.15，图 8 可以看出添加 PP-TPNs 前后样品颜色基本无差异，如图 9 所示，PP-TPNs 蛋白饮料在加热过程中的颜色变化规律在统计学上不显著，这可能是因为 PP-TPNs 与牛乳中

的乳清蛋白相互作用，从而提高了多酚的颜色稳定性^[30]。此外，牛奶的白色也能抵消或遮挡 PP-TPNs 的颜色，使色差值变化不明显。后续实验观察了加热后 PP-TPNs 蛋白饮料中多酚保留率的变化，结果如图 10 所示。经过加热 1 h 后，PP-TPNs 蛋白饮料中多酚保留率仍保持在 91.89%，这证明短时间的加热对 PP-TPNs 牛乳影响不大，特别是在前 30 min 内几乎没有影响。这一结果表明，PP-TPNs 应用于牛乳中具有良好的热稳定性，即使在热处理过程中也能保持其多酚的活性，这对于开发新型奶茶产品具有重要意义。综上所述，PP-TPNs 在牛乳中的应用不仅具有良好的热稳定性，而且还能够提高茶多酚的生物利用度，这对于开发具有健康益处的奶茶新品提供了科学依据。适当控制热处理条件，可以最大限度地保留 PP-TPNs 的营养价值，同时确保奶茶产品的品质和安全性。这些发现为 PP-TPNs 在食品工业中的应用提供了新的可能性，也为未来的研究和产品开发指明了方向。

3 结论

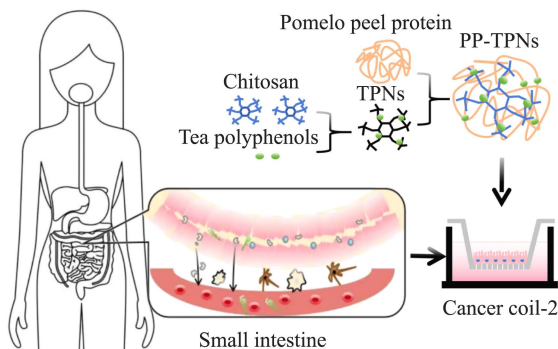


图 11 PP-TPNs 吸收转运示意图

Fig.11 Schematic representation of PP-TPNs uptake and transport

本文以静电复合法制备的 PP-TPNs 为研究对象，借助 Caco-2 单层细胞模型，测定出 PP-TPNs 中 TP 在正向转运实验中的吸收率为 41.72%，高于反向转运实验中的吸收率 32.91%，双向转运系数为 1.599，揭示了 PP-TPNs 在 Caco-2 小肠细胞模型中以主动吸收为主的转运机制（如图 11）。进一步的应用研究表明：PP-TPNs 能够成功应用于双柚汁、碳酸饮料、牛乳等不同饮料基底中，4 °C 避光储藏 30 d 后 PP-TPNs 双柚饮料和 PP-TPNs 碳酸饮料中多酚保留率分别为 82.42% 和 79.62%；95 °C 加热 1 h 后 PP-TPNs 蛋白饮料中多酚保留率在 91.89%，这表明 PP-TPNs 具有良好的环境适应性。综上所述，本研

究不仅为 PP-TPNs 在肠道中的吸收利用提供了理论依据，还为 PP-TPNs 饮料的研发和优化提供了重要的参考。通过对茶多酚的包埋可以显著提高其在食品工业中的应用潜力，特别是在开发富含茶多酚的功能性饮料方面。

参考文献

- [1] JOSÉ M L, PAULO E S M. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2016, 6(8): 709-719.
- [2] YAN Z M, ZHONG Y Z, DUAN Y H, et al. Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits [J]. *Animal Nutrition*, 2020, 6(2): 115-123.
- [3] VAN-LONG T, WOO-SIK J. Antioxidant and anti-inflammatory roles of tea polyphenols in inflammatory bowel diseases [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(3): 502-511.
- [4] ANUVA T T, MYNUL H S, et al. Tea Polyphenols and their preventive measures against cancer: current trends and directions [J]. *Foods*, 2022, 21(11): 3349.
- [5] XIE L W, CAI S, ZHAO T S, et al. Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 161: 175-186.
- [6] YIN Z Y, ZHENG T, HO C T, et al. Improving the stability and bioavailability of tea polyphenols by encapsulations: a review [J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(3): 537-556.
- [7] QI C Y, LIU G Y, PING Y, et al. A comprehensive review of nano-delivery system for tea polyphenols: Construction, applications, and challenges [J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 17: 100571.
- [8] ZAHRA A, REZA M, MILAD A. Drug delivery systems for resveratrol, a non-flavonoid polyphenol: Emerging evidence in last decades [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019, 51: 591-604.
- [9] LI N, LI Z Q, LIU W F, ZHONG X H. Nano-strategies for enhancing the bioavailability of tea polyphenols: preparation, applications, and challenges [J]. *Foods*, 2022, 11(3): 387.
- [10] TANG W, WANG J, HOU H W, et al. Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 240: 124398.
- [11] YIN C Y, CHENG L, ZHANG X, et al. Nanotechnology improves delivery efficiency and bioavailability of tea

- polyphenols [J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(9): 13380.
- [12] 林诺怡,成坚,王琴,等.柚皮蛋白的结构表征及细胞免疫活性初步研究[J].食品与发酵工业,2021,47(3):59-65.
- [13] NIMISHRAJ P, PHILLIP M G. The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 624: 122004.
- [14] DING X M, HU X Y, CHEN Y, et al. Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 455-465.
- [15] GB 7101-2022,食品安全国家标准 饮料[S].
- [16] CAI L, QIN X J, XU Z H, et al. Comparison of cytotoxicity evaluation of anticancer drugs between real-time cell analysis and CCK-8 method [J]. ACS Omega, 2019, 4(7): 12036-12042.
- [17] 曲凤凤.基于Caco-2细胞模型的茶黄素转运和代谢机制研究[D].武汉:华中农业大学,2022.
- [18] 王琴,梁嘉熹,吴晖,等.基于Caco-2单层细胞模型的兜唇石斛多糖的转运机制研究[J].现代食品科技,2019,35(5): 1-6.
- [19] ELISA S, LAURA B, CARMELA T P, et al. TEER and ion selective transwell-integrated sensors system for Caco-2 cell model [J]. Micromachines, 2023, 3(14): 496.
- [20] GEOEG L, SUZANA D, LEA S, et al. Cell barrier characterization in transwell inserts by electrical impedance spectroscopy [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 165: 112345.
- [21] BEDIA B K, SANDEEP K, GOWSINTH G, et al. Rethinking of TEER measurement reporting for epithelial cells grown on permeable inserts [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2023, 188: 106511.
- [22] JIN C Y, CHU C, ZHU X H, et al. Fractional extraction phenolics from *C. oleifera* seed kernels exhibited anti-inflammatory effect via PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway under Caco-2/RAW264.7 co-culture cell model [J]. Food Research International, 2024, 197: 115268.
- [23] 佐艳秋.基于Caco-2模型的茶叶中多酚类物质转运研究[D].合肥:安徽农业大学,2019.
- [24] 刘祎帆.兜唇石斛免疫活性多糖及抗氧化肽的结构鉴定及功能表征[D].广州:华南理工大学,2018.
- [25] QIU J B, ZHANG J R, LI A F. Cytotoxicity and intestinal permeability of phycotoxins assessed by the human Caco-2 cell model [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 249: 114447.
- [26] 樊月琴.茶多酚及其氧化物对Caco-2细胞吸收转运氟的影响及机制探究[D].武汉:华中农业大学,2022.
- [27] DELI M, SALSABILLA A, DIDDIN K. Effect of black tea (*Camellia sinensis*) toward tooth enamel hardness after being soaked in carbonated drinks [J]. Editorial Board Bali Medical Journal, 2024, 13(1): 1-192
- [28] WANG J Q, FU Y Q, GRANATO D, et al. Study on the color effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate under different pH and temperatures in a model beverage system [J]. Food Control, 2022, 139: 109112.
- [29] 田桂林,李昊昕,董楠,等.鱼鳞明胶水解物制备饮料的储藏及模拟消化稳定性[J].现代食品科技,2025,41(2):183-192.
- [30] WANG S, YE X Q, SUN Y, et al. Nanocomplexes derived from chitosan and whey protein isolate enhance the thermal stability and slow the release of anthocyanins in simulated digestion and prepared instant coffee [J]. Food Chemistry, 2021, 336: 127707.