生姜鲜榨汁中纳米囊泡的离体肠吸收特点及体外吸收机制研究

张雨佳，郭小萌，王 琪，赵 一，郭彦晨，王 婷，秦 敏，李睿怡，吴 莎，李 静，贺 蕊，张 楠，龚慕辛*

首都医科大学中医药学院，中医络病研究北京市重点实验室，北京 100069

摘 要：目的 阐明生姜 *Zingiber officinale* 鲜榨汁纳米囊泡结构对其中成分离体肠吸收的影响及其被肠细胞摄取的机制。**方法** 富集生姜中的纳米囊泡进行冻干处理，复溶后对其进行表征；同时，超声制备的纳米囊泡破碎组样品，采用液质联用技术对二者肠吸收液中的 6 种姜辣素类成分进行测定，计算各成分在不同肠段中的累积吸收量、吸收速率常数及表观渗透系数。通过 CCK-8 法测定纳米囊泡对人结直肠腺癌 Caco-2 细胞的细胞毒性；利用 PKH67、鬼笔环肽和 DAPI 分别对纳米囊泡、Caco-2 细胞的细胞骨架及细胞核进行标记，观察细胞对纳米囊泡的摄取情况；加入不同类型的摄取抑制剂，采用流式细胞术检测荧光强度，探究纳米囊泡的细胞摄取机制。**结果** 生姜鲜榨汁纳米囊泡冻干粉得率为 2.21%；纳米囊泡组肠吸收样品中未检测到 6-去氢姜二酮（6-dehydrogingerdione，6-De），纳米囊泡破碎组肠吸收样品中未检测到 6-De 和 10-姜酚（10-gingerol，10-Gi）；纳米囊泡组 4-Gi 和 6-姜烯酚（6-shogaol，6-Sh）在各肠段中的表观渗透系数均高于纳米囊泡破碎组（$P<0.05$）；确定纳米囊泡冻干粉质量浓度为 500 μg/mL 进行 PKH67 荧光染色，加入阿米洛利与甲基-β-环糊精抑制剂的 2 组细胞荧光强度分别下降了 26%、30%。**结论** 纳米囊泡可促进生姜中成分的吸收，且可被 Caco-2 细胞完整摄取，其可能通过巨胞饮途径和脂筏介导途径进入细胞。

关键词：生姜；纳米囊泡；外翻肠囊；Caco-2 细胞；摄取机制；6-去氢姜二酮；10-姜酚；6-姜烯酚

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2024)22 - 7704 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.014

Intestinal absorption characteristics and absorption mechanism *in vitro* of nano vesicles from fresh *Zingiber officinale* juice

ZHANG Yujia, GUO Xiaomeng, WANG Qi, ZHAO Yi, GUO Yanchen, WANG Ting, QIN Min, LI Ruiyi, WU Sha, LI Jing, HE Rui, ZHANG Nan, GONG Muxin

Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To clarify the impact of the structure of plant-derived nanovesicles in Shengjiang (*Zingiber officinale*) juice on the intestinal absorption of its internal constituents, and to explore the uptake mechanism *in vitro*. **Methods** First, enrich the nanovesicles followed by freeze-drying, and the freeze-dried powder was rehydration, the nanovesicles fragmentation samples were prepared by ultrasound, and six gingerol compounds in both intestinal sac absorption fluid were determined by LC-MS/MS method. The actual cumulative absorption quantity per unit area, the absorption rate (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}) were calculated and compared between two groups. The cytotoxicity of nanovesicles to Caco-2 cells was determined using the CCK-8 method to determine appropriate concentration. PKH67, phalloidin and DAPI were used to label nano-vesicles and the cytoskeleton and nucleus of Caco-2 cells respectively, and the uptake of nanocapsules by cells were observed. The uptake mechanism of nanovesicles was studied using flow cytometry after adding different types of uptake inhibitors. **Results** The yield of freeze-dried powder from *Z. officinale* juice nanovesicle was 2.21%. 6-dehydrogingerdione (6-De) was not detected in nanovesicle group, and 6-De and 10-gingerol (10-Gi) were not detected in the disrupted nanovesicle group. The P_{app} of 4-Gi and 6-shogaol (6-Sh) were higher in the nanovesicle group than those in disrupted nanovesicle group in all four intestinal segments with statistical significance ($P < 0.05$).

收稿日期：2024-07-15

基金项目：国家重点研发计划（2023YFC3504003）；首都医科大学学生科研创新项目（XSKY2023）

作者简介：张雨佳，本科，中药学专业。E-mail: yujiazhang113@163.com

***通信作者：**龚慕辛，教授，博士生导师，从事中药制剂工艺与质量标准研究。Tel: (010)83911624 E-mail: gongmuxin@ccmu.edu.cn

500 μg/mL freeze-dried powder nanocapsules was fluorescence stained with PKH67 to observe the uptake results, the fluorescence intensity of amiloride group and methyl-β-cyclodextrin group decreased by 26% and 30% respectively. **Conclusion** The nanocapsules can promote the absorption of the main components in *Z. officinale*, and nanocapsules can be uptaken with a complete structure by Caco-2 cells, the results indicate through the raft-mediated pathway and macropinocytosis pathway.

Key words: *Zingiber officinale* Rosc.; nanophase; everted intestinal sac; Caco-2 cells; uptake mechanism; 6-dehydrogingerdione; 10-gingerol; 6-shogaol

生姜 *Zingiber officinale* Rosc.是常用的药食同源中药，具有解表散寒、温中止呕的功效。金元四大家之一的朱丹溪擅长运用生姜的鲜榨汁给患者内服或用于丸药的黏合剂以及炮制辅料，起到增强药效、缓和药性的作用。清代《本草从新》记载“姜汁润，开痰，辛温”[1-2]。研究表明，药食两用植物，尤其是新鲜植物中存在着植物源性纳米囊泡[3]，不仅含有药理活性成分，而且在治疗疾病时表现出良好的安全性、组织相容性、组织渗透性及组织趋向性[4]。据文献报道，生姜鲜榨汁[5]和生姜煮汁[6]中均含有纳米囊泡。本课题组前期研究发现，生姜鲜榨汁纳米囊泡组中的小分子药效成分的肠吸收要优于这些成分的等浓度单体成分混合溶液，然而，由于混合溶液不能完全复原纳米囊泡中的其他微量成分以及蛋白质、多糖、氨基酸、脂质成分等，尚不足以阐明纳米囊泡结构对于肠吸收的直接影响。此外，纳米囊泡的完整结构能否被肠细胞完整摄取以及通过哪些途径被摄取值得关注。因此，本研究采用超声破碎的物理方法将生姜鲜榨汁中的纳米囊泡破碎，在最大程度保留纳米囊泡中成分的基础上，进行外翻肠囊吸收实验，比较破碎前后样品的吸收参数；采用共聚焦荧光显微技术观测纳米囊泡能否以完整结构进入人结直肠腺癌 Caco-2 细胞，并在此基础上添加已知细胞摄取途径的抑制剂，通过观察其对纳米囊泡吸收的影响，探究纳米囊泡的摄取途径。

1 材料

1.1 细胞株与动物

Caco-2 细胞（15～25 代），由中国科学院上海生物化学与细胞研究所提供。

SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180～220 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号 SCXK（京）2021-0006。动物适应性喂养 7 d，自由饮食，循环光照 12 h。动物实验程序符合《实验动物护理和使用指南》，并获得首都医科大学动物伦理委员会批准（批准号 AEEI-2020-002）。

1.2 药品与试剂

生姜（批号 20240312）经首都医科大学中医药学院龚慕辛教授鉴定为姜科植物姜 *Z. officinale* Rosc.的新鲜根茎，经检查符合《中国药典》2020 年版各项规定。

6-去氢姜二酮（6-dehydrogingerdione，6-De，批号 PS011747，质量分数＞98.0%）、4-姜酚（4-gingerol，4-Gi，批号 202103110086，质量分数＞98.0%）、6-Gi（批号 PS010928，质量分数＞95.0%）、8-Gi（批号 PS010249，质量分数＞98.0%）、10-Gi（批号 PS000018，质量分数＞98.0%）、6-姜烯酚（6-shogaol，6-Sh，批号 PS010913，质量分数＞95.0%）均购自成都普思生物科技股份有限公司。DMEM 细胞培养基（批号 6123114）、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，批号 6121119）购自美国 Gibco 公司；胰蛋白酶-EDTA 消化液（批号 20231122）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；细胞毒性检测剂（cell counting kit-8，CCK-8，批号 CK04）购自北京北仁化学科技有限公司；青霉素-链霉素（批号 C100C5）购自苏州新赛美生物科技有限公司；1% 牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，批号 0122070002）、PKH67（批号 D0031）、鬼笔环肽（批号 CA1610）、DAPI 染液（批号 G1264）均购自北京索莱宝科技有限公司。阿米洛利（amiloride hydrochloride，AMI，批号 A21149）、甲基-β-环糊精（methyl-β-cyclodextrin，M-β-CD，批号 DR0667）、吲哚美辛（indometacin，INM，批号 SR0914）均购自北京华中海威基因科技有限公司；氯丙嗪（chlorpromazine，CPZ，批号 31679）购自德国默克公司。

1.3 仪器

NC-91220 型榨汁机（东莞恩优希电子有限责任公司）、Venus 2.5 L/−55 ℃型冷冻干燥机（杭州富睿捷科技有限公司）、JEM-2100 型透射电子显微镜（日本电子株式会社）、NanoBrooK 90 Plus PALS 型粒度分析仪（美国布鲁克海文仪器公司）、ZetaView 型纳

米颗粒跟踪分析仪（德国 Particle Metrix 公司）、Agilent 1290 Infinity II 型 UPLC 超高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）、QTRAP 6500＋型 UPLC-QqQ-MS/MS 仪（美国 ABSCIEX 公司）、ALC-M 型恒温离体组织实验仪（上海奥尔科特生物技术有限公司）、Class II BSC 型超净台（新加坡艺思高科技有限公司）、T1-SAM 型倒置荧光显微镜（日本尼康株式会社）、BD LSRFortessa 型流式细胞仪（上海碧迪医疗器械有限公司）。

2 方法

2.1 生姜鲜榨汁纳米囊泡冻干粉的制备

取新鲜生姜，去皮切块，放入榨汁机得到粗姜汁，用去离子水润湿的 4 层纱布滤过，弃去残渣后得到生姜鲜榨汁。将生姜鲜榨汁分装于离心管中，4 ℃、3 000×*g* 离心 30 min，取上清，4 ℃、6 500×*g* 离心 30 min，取上清，12 500×*g* 离心 60 min，取上清，计算生药浓度。上清液经 0.45 μm 的滤膜滤过，即得生姜鲜榨汁纳米囊泡液。纳米囊泡液于−20 ℃冷冻 4 h、−80 ℃冷冻 1 d 后，置于冷冻干燥机中，在冷阱温度−57.67 ℃、真空度 7.044 Pa 条件下冷冻干燥，将冻干粉置于密封袋中避光保存。

2.2 生姜鲜榨汁纳米囊泡的破碎与物理表征

依据文献方法[7]配制台氏液，将冻干粉用台氏液复溶至与鲜榨汁中原生药浓度相同，采用断续超声法室温、超声 15 min、重复 3 次，对生姜鲜榨汁纳米囊泡结构进行破坏，得到纳米囊泡破碎组（以下简称破碎组）台氏液复溶液。采用台氏液和去离子水分别复溶冻干粉至与鲜榨汁中原生药浓度相同，得到台氏液复溶的纳米囊泡组（以下简称囊泡组）和去离子水复溶的纳米囊泡组复溶液。将 3 种复溶液分别稀释至相同浓度，采用动态光散射法（dynamic light scattering，DLS）测定生姜鲜榨汁纳米囊泡粒径的大小，以及 Zeta 电位。将 3 种复溶液稀释同样倍数后吸取 10 μL 滴加于电镜铜网上，静置 10 min 使其吸附，用 2%的磷钨酸溶液复染 5 min。静置使其干燥，采用透射电子显微镜（transmission electron microscope，TEM）在 160 kV 下观察不同组别生姜鲜榨汁纳米囊泡的形态。

2.3 生姜鲜榨汁纳米囊泡中成分检测方法的建立及方法学考察

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称定 6-De、4-Gi、8-Gi、10-Gi、6-Gi、6-Sh 对照品各 5 mg，加适量甲醇定容至 5 mL 量瓶中，稀释成质量浓度为 1.00 μg/mL 的溶液，备用。

2.3.2 色谱条件 Waters ACQUITYUPLCHSST3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），以 0.1%甲酸水溶液为流动相（A），0.1%甲酸乙腈为流动相（B），梯度洗脱：0～0.5 min，40% B；0.5～1.5 min，40%～90% B；1.5～2.3 min，90% B；2.3～3.3 min，90%～100% B；3.3～4.3 min，100% B；4.3～4.5 min，100%～40% B。体积流量 0.4 mL/min；柱温 35 ℃；进样体积 2 μL。

2.3.3 质谱条件 电喷雾离子源（ESI），多反应监测模式（MRM），正、负离子模式气帘气（CUR）压力均为 35 psi（1 psi＝6.895 kPa），碰撞气（CAD）为 8（ESI^+），喷雾电压为–5 500 V（ESI^-）、4 500 V（ESI^+），雾化气温度（TEM）均为 500 ℃，雾化气（GS1）和辅助气（GS2）压力均为 60 psi，射入电压（EP）为 10 V；碰撞室射出电压（CXP）为–11 V（ESI^-）、10 V（ESI^+）。

2.3.4 线性关系考察 取混合对照品溶液适量，依次等比稀释，制得 6 个不同质量浓度系列的混合对照品溶液，按液质检测条件进行进样分析。以对照品峰面积为纵坐标（*y*），以对照品质量浓度为横坐标（*x*），进行线性回归分析，得到线性方程、相关系数（*r*）和线性范围。

2.3.5 供试品溶液的制备 精密称定纳米囊泡冻干粉 0.1 g，置于 100 mL 锥形瓶中，加甲醇 25 mL，密塞、称定质量，超声 45 min 后补足减失的质量，0.45 μm 滤膜滤过，取续滤液置于 50 mL 离心管中，分别稀释 5、100 倍后经 0.22 μm 滤膜滤过，计算供试品溶液中各成分含量。

2.3.6 方法学考察 精密吸取空白肠吸收液、对照品溶液、供试品溶液各 2 μL，进样分析，考察专属性；精密取同一对照品溶液，连续测定 6 次，计算 6 种成分峰面积 RSD，考察精密度；平行制备 6 份供试品溶液，进样分析，计算 6 种成分平均质量浓度 RSD，考察重复性；于供试品溶液制备后的 0、2、4、8、12、24 h 分别进样分析，计算 6 种成分峰面积 RSD；取已知含量的吸收供试液样品，按低、中、高 3 个水平精密加入适量对照品，进样分析，测定峰面积，考察加样回收率[6]。

2.3.7 肠囊吸收液样品的制备 依据文献方法[7]构建大鼠外翻肠囊吸收模型，将大鼠随机分为囊泡组和破碎组，每组 3 只。实验前大鼠禁食 12 h，自由饮水，麻醉后依次剖取大鼠十二指肠、空肠、回肠和

结肠，在肠管中充入 37 ℃预热的台氏液直至充盈，平衡 5 min 后替换为 37 ℃预热的破碎组和囊泡组溶液，分别在 15、30、45、60、90、120 min 时精密吸取 0.2 mL 肠囊吸收液，同时补充同体积 37 ℃预热的空白台氏液。将样品置于−20 ℃冰箱，4 h 后转移至−80 ℃冰箱中冷冻 1 d 以上，取出，采用冷冻干燥机冻干，加入 500 μL 甲醇，超声 30 min，13 000×*g* 离心 10 min，吸取上清液，氮气吹干，再次加入 100 μL 甲醇，超声 5 min，13 000×*g* 离心 10 min，取上清液，按“2.3.2”项下色谱条件、“2.3.3”项下质谱条件进样分析，计算肠囊吸收液样品溶液中各成分含量。

2.4 外翻肠囊吸收参数的计算

肠囊吸收液样品取样结束后将肠管取出，测量肠囊长度、宽度和肠囊内剩余液体体积，按式（1）计算大鼠各肠段中各成分的实际累积吸收量（Q_1）；按式（2）计算大鼠各肠段中各成分的累积吸收量（Q）；按式（3）计算大鼠各肠段中各成分的单位面积实际累积吸收量（Q'_1）；按式（4）分别计算大鼠各肠段中各成分的单位面积累积吸收量（Q'）。将每个时间点各组小鼠的 Q' 平均值对时间（t）作图，得到 Q'-t 曲线，其斜率为各成分在 2 组大鼠不同肠段的吸收速率常数（K_a）。根据式（5）计算大鼠各肠段中各成分的表观渗透系数（P_{app}）。

$$Q_1 = C_n \times V + 0.2 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i \quad (1)$$

$$Q = C_n \times V_0 + 0.2 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i \quad (2)$$

C_n 表示在第 n 个时间点取样时肠液的实际检测浓度，V 为 120 min 时肠囊液中剩余的台氏液的体积，V_0 为加入肠囊空白台氏液的体积

$$Q'_1 = Q_1/\text{肠段面积} \quad (3)$$

$$Q' = Q/\text{肠段面积} \quad (4)$$

$$P_{app} = K_a/C_0 \quad (5)$$

C_0 表示台氏液复溶的生姜纳米囊泡破碎组各成分的初始浓度

2.5 含药培养基的制备

取 0.1 g 冻干粉溶于 1 mL 去离子水，经 0.22 μm 滤膜滤过，得到质量浓度为 100 mg/mL（相当于生药量 4.5 g/mL）的冻干粉母液。使用不同体积的 DMEM 培养基进行稀释，获得不同质量浓度的生姜纳米囊泡含药培养基。

2.6 细胞给药浓度筛选

取对数生长期细胞，以 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔板，每孔 100 μL，24 h 后开始实验。将细胞分为空白组、对照组、生姜纳米囊泡组及抑制剂组，每组设 3 个复孔，空白组不含细胞仅加入 110 μL 的 CCK-8 溶液，对照组细胞加入 110 μL CCK-8 溶液，生姜纳米囊泡组细胞加入不同质量浓度（7.812 5、15.625 0、31.250 0、62.500 0 μg/mL、0.125、0.250、0.500、0.625、1. 000、1.250、2.500、5.000、7.500、1.000 mg/mL）的生姜纳米囊泡含药培养基，孵育 24 h。抑制剂组细胞分别加入 100 μL（AMI 质量浓度为 10、30、100 μg/mL；M-β-CD 质量浓度为 2.5、5、10 μg/mL；氯丙嗪质量浓度为 5、10、20 μg/mL；INM 质量浓度为 50、100、200 μg/mL）抑制剂[8-10]，孵育 1 h。生姜纳米囊泡组与抑制剂组孵育完成后洗涤细胞，再次加入 110 μL 的 CCK-8 溶液，置于培养箱孵育 2 h，使用酶标仪于 450 nm 波长处检测吸光度（A）值，通过式（6）计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \quad (6)$$

2.7 Caco-2 细胞对纳米囊泡的摄取机制研究

2.7.1 纳米囊泡的荧光标记 按照 PKH67 试剂说明书，采用灭菌后的超纯水制得质量浓度为 500 μg/mL 的 PKH67 标记的冻干粉含药染液，经 0.22 μm 滤膜滤过。将 Caco-2 细胞以 7×10^4 个/mL 接种于 20 mm 的激光共聚焦培养皿中培养 24 h，弃去培养基；洗涤细胞后加入 1 mL PKH67 标记的冻干粉含药染液，孵育 12 h，弃培养基；洗涤细胞后加入 500 μL 4% 多聚甲醛，室温避光孵育 10 min；洗涤细胞后通过 500 μL 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 8 min，洗涤细胞后将鬼笔环肽染液混匀后加入培养皿中，室温避光孵育 30 min，标记 Caco-2 细胞的细胞骨架；洗涤细胞后加入 DAPI 染液，避光孵育 4 min，标记 Caco-2 细胞的细胞核；洗涤细胞后加入适量封片剂，于显微镜下拍照，观察 Caco-2 细胞对生姜鲜榨汁纳米囊泡的摄取情况。

2.7.2 Caco-2 细胞摄取时间的测定 细胞以 5×10^4 个/mL 接种于黑色玻璃底 96 孔板中培养 24 h 至形成单层致密细胞。按照 PKH67 试剂说明书对纳米囊泡进行染色标记，将染色的纳米囊泡冻干粉避光加入 96 孔板，使培养基中的冻干粉质量浓度为 500 μg/mL，分别于不同时间（0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h）下观察细胞的摄取效果。孵育结束后，洗涤细胞 3 次，加入 100 μL PBS 于荧光酶标仪测定荧光强度值[8]，依据细胞内荧光强度明确生姜纳米囊泡进入细胞的峰值时间。

2.7.3 不同抑制剂对 Caco-2 细胞摄取纳米囊泡的影

响　以 5×10⁴ 个/mL 的密度将 Caco-2 细胞接种于 12 孔板中培养 24 h 至形成单层致密细胞，加入各浓度的不同种类抑制剂，每组平行 3 次，孵育 1 h[11]，洗涤细胞后加入 PKH67 标记的冻干粉含药染液，孵育 6 h，洗涤细胞后每孔加入 200 μL 胰酶消化 4 min，加入 400 μL 的完全培养基终止消化，用移液枪将贴壁细胞吹匀，取细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 500 μL 的 PBS 重悬后吹打均匀，细胞悬液经流式滤膜滤过，设置发射光 490 nm、激发光 502 nm，选取 1×10⁴ 个完整细胞进行测定，通过式（7）计算细胞摄取变化率，从而确定生姜纳米囊泡被细胞摄取的途径。

摄取变化率＝1－(抑制剂组荧光强度－空白组荧光强度)/(对照组荧光强度－空白组荧光强度)　（7）

2.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.5.0 及 FlowJo 7.6.1 软件作图；利用 SPSS 27.0 软件进行数据分析，采用独立样本 *t* 检验，组间比较使用单因素方差分析（One-Way ANOVA），以 Dunnet 或 Turkey 做多重比较分析。

3　结果

3.1　纳米囊泡冻干粉得率

所得生姜鲜榨汁纳米囊泡冻干粉质量为 95.82 g，冻干粉得率为 2.21%。

3.2　纳米囊泡的物理表征

粒度仪测定结果表明，制备的生姜鲜榨汁中纳米囊泡粒径在 100～150 nm，与相关研究报道一致[12]。电位测定结果表明，纳米囊泡经台氏液和去离子水复溶后仍能稳定存在（表 1）。

如图 1 所示，生姜鲜榨汁纳米囊泡在经肠吸收后仍可保持完整囊泡结构。与吸收前的纳米囊泡比较，各肠段吸收液中纳米囊泡的粒径均不同程度增大，聚集度指数（polydispersity index，PDI）减小，与相关研究报道一致[13]。在破碎组吸收液中未观察到纳米囊泡，表明破碎组中成分经肠吸收后不会再自发形成纳米囊泡。

3.3　线性关系

各化合物在线性范围内显示良好的线性关系，*r* 均大于 0.99（表 2）。

3.4　外翻肠囊液的吸收参数

以破碎组中各成分浓度为外翻肠囊供试品液成分的初始浓度 C_0，即 6-Gi、4-Gi、6-Sh、8-Gi、10-Gi、6-De 分别为 127 381.000、8 316.740、6 036.640、290.085、600.207、16.566 ng/mL。如表 3 所示，通过比较各成分在大鼠空肠中的 Q'_1，发现囊泡组 6-Gi 和 8-Gi 的 Q'_1 显著高于破碎组（$P<0.05$），说明囊泡结构的存在增加了 6-Gi 和 8-Gi 在空肠的吸收，二者在空肠吸收差异明显，与空肠是药物在小肠吸收的主要部位有关[14]。

如图 2 所示，各成分不同肠段的 Q' 随时间延长逐渐增加，囊泡组各时间点的 Q' 均呈现高于破碎组的趋势，与相关研究结果一致[6]。10-Gi 在囊泡组肠吸收液中可以检测到，而在破碎组肠吸收液中未能检测到，推测囊泡结构的存在可促进 10-Gi 的吸收，且 10-Gi 仅能在囊泡结构中稳定存在，而在破碎组中不稳定，容易被破坏。

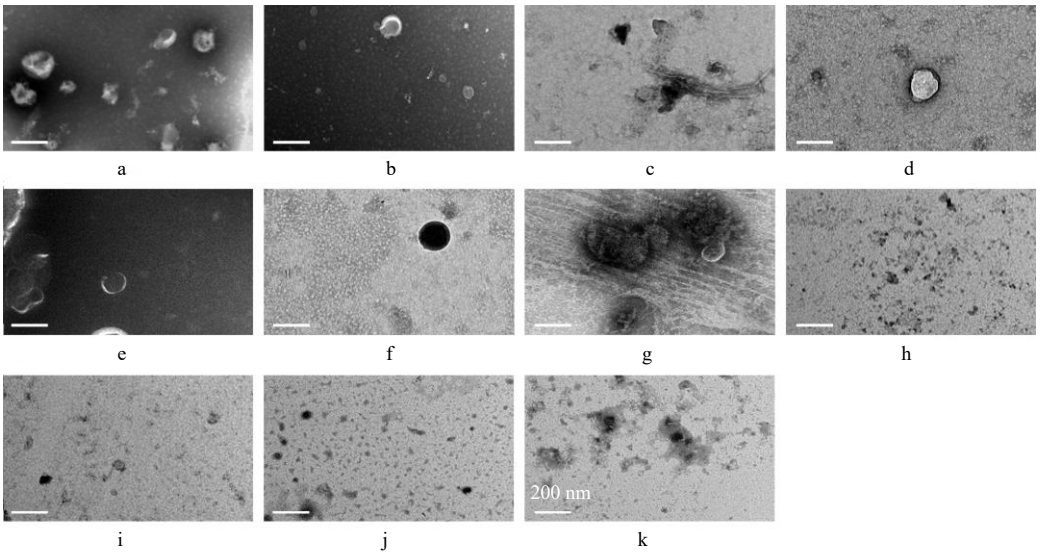
通过比较各肠段中囊泡组和破碎组各成分的 Q'，发现十二指肠中的 8-Gi 在 90、120 min 时，囊泡组 Q' 显著高于破碎组（$P<0.05$、0.01）。空肠中的 6-Gi 在 90、120 min 时，4-Gi 在 90 min 时，8-Gi 在 45、60、90、120 min 时，囊泡组 Q' 显著高于破碎组（$P<0.05$、0.01）；6-Sh 在 120 min 时囊泡组 Q' 显著高于破碎组（$P<0.001$）。回肠中的 6-Gi 在 120 min 时；8-Gi 在 45、60、90、120 min 时，囊泡组 Q' 显著高于破碎组（$P<0.05$、0.01）。结肠中的 6-Gi 在 120 min 时，4-Gi 在 45、60、120 min 时囊泡组 Q' 显著高于破碎组（$P<0.05$）。

如表 4 所示，通过比较囊泡组、破碎组的 K_a 值，发现差异无统计学意义，由此推断纳米囊泡并不影响成分的肠吸收速率。各成分的 K_a 值在

表 1　生姜鲜榨汁纳米囊泡的表征

Table 1　Characterization of fresh *Zingiber officinale* juice nanovesicles

组别	质量浓度/(mg·mL⁻¹)	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
水复溶生姜鲜榨汁纳米囊泡	16.5	162.73±3.03	0.257±0.036	−15.30±1.76
台氏液复溶生姜鲜榨汁纳米囊泡	16.5	121.24±1.19	0.308±0.017	−13.08±1.90
十二指肠肠囊液	—	196.98±0.51	0.181±0.004	−11.70±1.32
空肠肠囊液	—	185.88±0.92	0.164±0.002	−8.40±0.47
回肠肠囊液	—	218.17±2.31	0.143±0.018	−13.15±2.13
结肠肠囊液	—	167.22±0.92	0.241±0.004	−14.49±2.24



a-水复溶纳米囊泡；b-台氏液复溶纳米囊泡；c-台氏液复溶超声破碎纳米囊泡；d-纳米囊泡组十二指肠肠囊液；e-纳米囊泡组空肠肠囊液；f-纳米囊泡组回肠肠囊液；g-纳米囊泡组结肠肠囊液；h-纳米囊泡破碎组十二指肠肠囊液；i-纳米囊泡破碎组空肠肠囊液；j-纳米囊泡破碎组回肠肠囊液；k-纳米囊泡破碎组结肠肠囊液。

a-nanovesicles rehydration by water; b-nanovesicles rehydration by Tyrode solution; c-fragmentation nanovesicles rehydration by Tyrode; d-duodenum sac absorption fluid of nanovesicles; e-jejunum sac absorption fluid of nanovesicles; f-ileum sac absorption fluid of nanovesicles; g-colon sac absorption fluid of nanovesicles; h-duodenum sac absorption fluid of nanovesicles fragmentation; i-jejunum sac absorption fluid of nanovesicles fragmentation; j-ileum intestinal sac absorption fluid of nanovesicles fragmentation; k-colon sac absorption fluid of nanovesicles fragmentation.

图 1　在不同溶剂体系中纳米囊泡的形态

Fig. 1　Morphology of nanovesicles in different solvent systems

表 2　6 个成分的线性回归方程及线性范围

Table 2　Regression equations and linear ranges of six components

成分	线性回归方程	r	线性范围/(ng·mL^{-1})	检测限/(ng·mL^{-1})	定量限/(ng·mL^{-1})
4-Gi	y=8.47 x−230.71	0.999 17	59.38～1900	3.45	46.5
6-Gi	y=7078.63 x+17 015.35	0.998 16	5.040～322.5	0.44	1.49
8-Gi	y=50.01 x+356.47	0.999 00	17.34～2220	8.49	9.84
10-Gi	y=10.28 x+49.72	0.998 39	15.16～1940	1.07	7.95
6-De	y=91 857.40 x+17 006.39	0.999 00	1.030～131.2	0.01	0.29
6-Sh	y=23 079.45 x+26 764.54	0.997 49	1.950～125.0	0.04	0.32

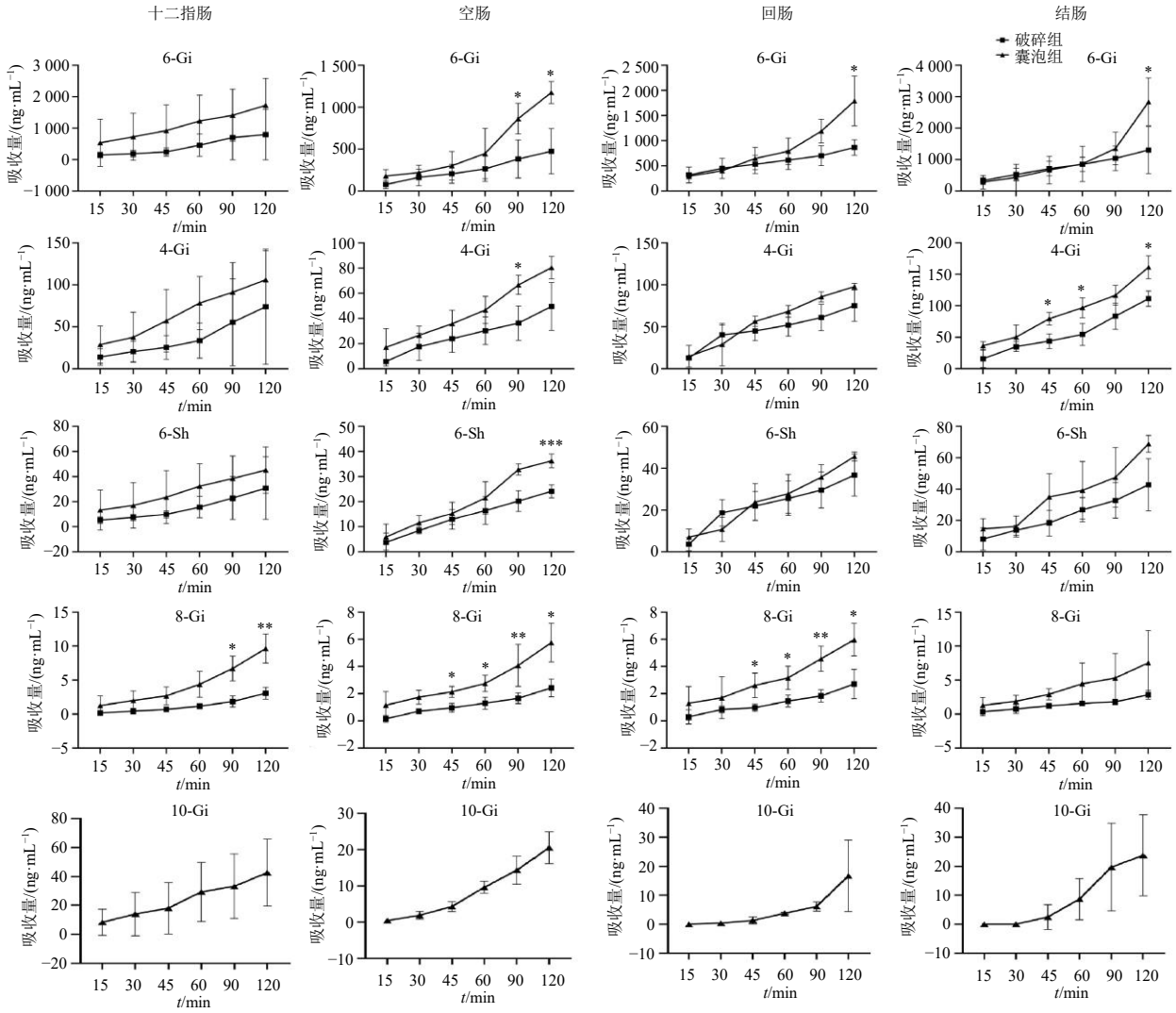
表 3　生姜鲜榨汁纳米囊泡组与破碎组中各成分在不同肠段中的单位面积实际累积吸收量 ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Table 3　Actual acumulative absorption quantity per unit area of each component in nanovesicle group and nanovesicle fragmentation group from fresh *Z. officinale* juice in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

肠段	组别	Q'_1/(ng·mL^{-1})				
		6-Gi	4-Gi	6-Sh	8-Gi	10-Gi
空肠	囊泡	887.78±229.51*	61.13±11.71	27.67±5.48	4.22±0.81**	15.48±5.83
	破碎	357.31±205.91	36.77±12.66	18.31±2.30	1.78±0.39	—
回肠	囊泡	1274.18±513.87	73.38±14.49	35.08±16.58	4.53±1.74	9.86±4.85
	破碎	627.41±129.85	54.47±14.19	26.64±7.87	1.89±0.68	—
结肠	囊泡	1993.96±524.07	116.30±16.97	49.46±6.32	5.16±2.64	15.90±7.57
	破碎	1145.89±749.63	94.06±20.46	37.11±17.57	2.35±0.38	—
十二指肠	囊泡	1166.12±724.49	71.47±30.45	30.69±16.53	6.22±2.29	27.92±17.99
	破碎	651.59±636.59	60.03±54.13	25.09±19.57	2.40±0.59	—

与破碎组比较：$^{*}P$<0.05　$^{**}P$<0.01　$^{***}P$<0.001，下表同。

$^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01　$^{***}P$ < 0.001 *vs* fragmentation group, same as below tables.



与破碎组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$　$^{***}P<0.001$。

$^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* fragmentation group.

图 2　生姜纳米囊泡组与破碎组中各成分在不同肠段的单位面积累积吸收量经时变化（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 2　Accumulated absorption quantity per unit area-*t* curves of each component in nanovesicle and nanovesicle fragmentation group from fresh *Z. officinale* juice in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

十二指肠、空肠、回肠和结肠中依次呈现先降低后升高的趋势，K_a 值的最高值出现在十二指肠或结肠中。结合 K_a 值、Q'_1 和 Q'综合分析结果，囊泡对 8-Gi 的结肠吸收无影响；10-Gi 仅在囊泡组的肠吸收液中检出，而在破碎组任何时间、任何肠段中均未被检测出。

如表 5 所示，6-Gi 作为生姜中的主要有效成分，其在十二指肠和结肠段的 P_{app} 差异无统计学意义，说明囊泡结构对 6-Gi 在这 2 个肠段吸收无显著影响；囊泡中微量成分 4-Gi 和 6-Sh 在所有肠段的 P_{app} 值均高于破碎组；8-Gi 的 P_{app} 值除结肠外在其他肠段也均高于破碎组。各肠段中 P_{app} 值的变化趋势依次呈现先降低后增高的趋势，P_{app} 值的最高值出现在十二指肠或结肠中。

3.5　药物对 Caco-2 细胞的毒性研究

通过 CCK-8 法测定生姜鲜榨汁纳米囊泡和各类抑制剂对于细胞的毒性，发现冻干粉质量浓度为 7.8～1 000.0 μg/mL 时对 Caco-2 细胞无毒性。

采用 CCK-8 法筛选抑制剂的浓度，如图 3 所示，所有抑制剂的低、中、高浓度对本研究所使用的细胞均无毒性，结合相应的文献报道[15]，后续实验选择的各抑制剂浓度分别为 AMI 30 μg/mL、M-β-CD 5 μg/mL、氯丙嗪 10 μg/mL、INM 100 μg/mL。

表 4 生姜鲜榨汁纳米囊泡组与破碎组中各成分在不同肠段中的吸收速率（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4 Absorption rate of each component in nanovesicle and nanovesicle fragmentation group from fresh *Z. officinale* juice in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

肠段	组别	K_a				
		6-Gi	4-Gi	6-Sh	8-Gi	10-Gi
十二指肠	囊泡	11.26±3.50	0.76±0.21	0.31±0.03	0.08±0.02**	0.33±0.16
	破碎	6.90±8.10	0.58±0.61	0.25±0.23	0.03±0.01	—
空肠	囊泡	10.08±2.49*	0.62±0.12	0.30±0.07	0.04±0.02	0.20±0.05
	破碎	3.72±2.16	0.38±0.14	0.19±0.01	0.02±0.01	—
回肠	囊泡	14.13±5.06*	0.79±0.12	0.37±0.12	0.04±0.02	0.15±0.10
	破碎	4.85±0.15	0.51±0.14	0.27±0.09	0.02±0.01	—
结肠	囊泡	22.89±6.54	1.16±0.14	0.51±0.06	0.06±0.04	0.26±0.16
	破碎	8.88±5.93	0.88±0.19	0.33±0.23	0.02±0.01	—

表 5 生姜鲜榨汁纳米囊泡组与破碎组中各成分在不同肠段表观渗透系数（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 5 Apparent permeability of each component in nanovesicle and nanovesicle fragmentation group from fresh *Z. officinale* juice in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

肠段	组别	P_{app}				
		6-Gi	4-Gi	6-Sh	8-Gi	10-Gi
十二指肠	囊泡	88.44±27.48	91.47±25.22**	51.95±3.60***	280.84±54.29*	545.87±264.28
	破碎	54.18±63.62	4.59±4.78	1.98±1.84	0.22±0.08	—
空肠	囊泡	79.11±19.52**	74.20±14.46*	50.23±11.97*	149.27±55.49*	331.50±89.46
	破碎	29.22±16.93	3.00±1.09	1.47±0.08	0.16±0.05	—
回肠	囊泡	110.92±39.74***	95.36±15.11***	62.06±19.42*	156.28±63.94*	250.91±159.98
	破碎	38.11±1.11	3.98±1.09	2.09±0.70	0.17±0.05	—
结肠	囊泡	179.70±51.30*	138.98±17.45**	84.17±9.86**	204.19±141.91	431.35±267.65
	破碎	69.68±46.54	6.94±1.49	2.57±1.79	0.17±0.07	—

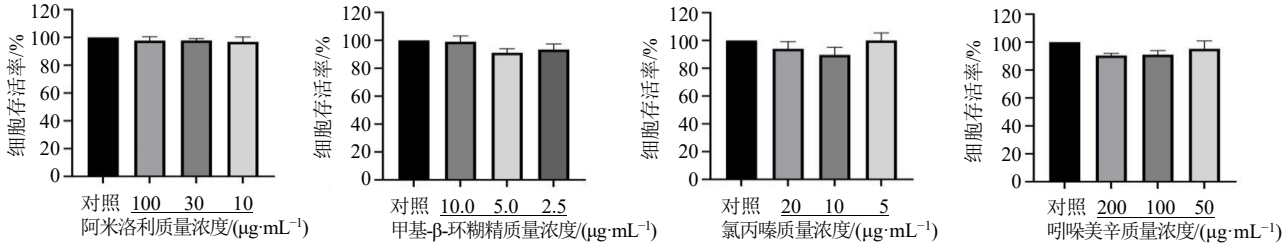


图 3 不同质量浓度的各摄取途径抑制剂对 Caco-2 细胞存活率影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 3 Effect of different concentrations of various uptake pathway inhibitors on survival rate of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6 Caco-2 细胞对纳米囊泡的摄取

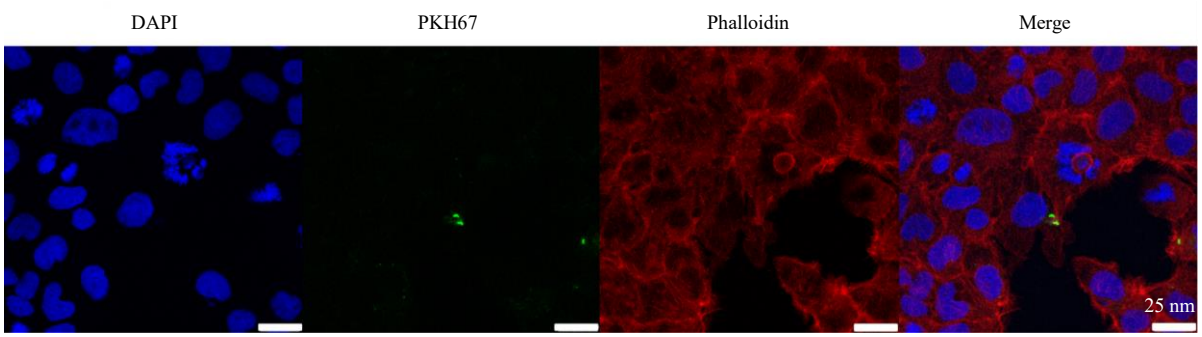
如图 4 所示，蓝色荧光和红色荧光图分别表示细胞数量与细胞分布情况，细胞核无重叠，细胞骨架紧凑，表明细胞培养 24 h 后胞无重叠现象，细胞生长紧凑，在该生长条件下能形成致密的单层细胞，细胞核附近可见绿色荧光的纳米囊泡，说明生姜鲜榨汁纳米囊泡以完整结构被摄取进入到细胞中。

3.7 生姜鲜榨汁纳米囊泡摄取时间的确定

如图 5 所示，与对照组比较，在给药 6 h 时细胞内的荧光强度显著升高（$P < 0.05$），表明在 6 h 时，生姜纳米囊泡进入到 Caco-2 中的含量最多。因此，抑制剂摄取实验选定的摄取测定时间为 6 h。

3.8 Caco-2 细胞摄取生姜纳米囊泡的内吞途径

对照组荧光强度为 104，对照组荧光强度为 2 632、AMI 组荧光强度为 1 986、M-β-CD 组荧光强度为 1 875、氯丙嗪组荧光强度为 2 842、INM 组荧光强度为 2 754。与对照组比较，巨胞饮抑制剂组的摄取率下降了 26%，脂筏介导途径抑制剂组的摄取率下降了 30%，说明生姜鲜榨汁纳米囊泡进

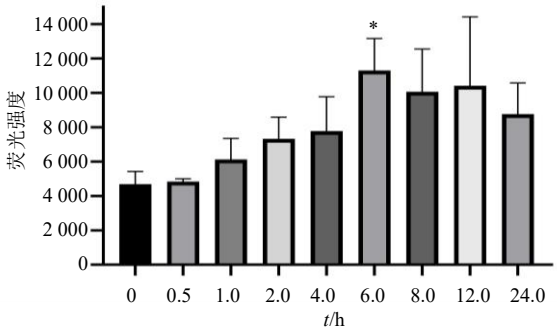


蓝色荧光显示 Caco-2 的细胞核，绿色荧光显示生姜鲜榨汁纳米囊泡，红色荧光显示 Caco-2 细胞骨架。

Blue fluorescence showed the nucleus of Caco-2, green fluorescence showed the ginger fresh juice nanovesicles, and red fluorescence showed the Caco-2 cytoskeleton.

图 4　Caco-2 细胞对完整结构生姜鲜榨汁纳米囊泡的摄取

Fig. 4　Uptake of intact nanovesicles from fresh *Z. officinale* juice by Caco-2 cells



与对照组 (0 h) 比较：$^*P<0.05$。

$^*P < 0.05$ *vs* control group (0 h).

图 5　不同时间生姜纳米囊泡摄入 Caco-2 细胞的荧光强度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5　Fluorescence intensity of Caco-2 cells ingested by nanovesicles from fresh *Z. officinale* juice at different times ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

入到 Caco-2 细胞中可能通过巨胞饮途径和脂筏介导途径[9]。

4　讨论

近年来，针对植物来源纳米囊泡的研究逐渐兴起。已有研究表明，纳米囊泡因具有类脂质膜结构，可促进其包裹的难溶性药物或易挥发性药物的体内吸收[16]。有关生姜纳米囊泡的研究表明，姜辣素类成分在纳米囊泡中的含量高于在生姜中的含量，同时，已有研究表明其中姜辣素类成分的主要吸收部位为十二指肠，但并未深入研究吸收的具体机制[14]。纳米囊泡的细胞摄入途径主要为网格蛋白介导和巨胞饮介导途径，而人工制备的纳米制剂的摄取途径主要为网格蛋白介导途径和小窝蛋白介导途径，二者差异是否与生物相容性有关值得进一步探讨[17]。本研究发现，生姜鲜榨汁纳米囊泡的吸收机制为通过脂筏途径和巨胞饮途径摄取。M-β-CD 已被报道是胆固醇消耗剂[18]，同时也是一种药用包合辅料，本研究发现其会大大降低生姜鲜榨汁中纳米囊泡被细胞摄取的效率。AMI 是西医中常用的保钾利尿药，呕吐不良反应明显，需同食物一起服用，如与生姜鲜榨汁同服，则会降低生姜止呕的效果。

生姜鲜榨汁可作为药物炮制的液体辅料，改善药物的归经与性味，而从生姜鲜榨汁中获得的纳米囊泡，可以作为其他药物的载体[19]，以另一种方式对中药的性味归经进行调整。同时，以鲜汁入药是中医临床用药的特色之一，探究鲜药榨汁中纳米囊泡的吸收机制，有利于从新的角度阐明鲜药的独特疗效产生的机制，使其发挥更广泛的治疗作用。

本研究通过物理化学表征、外翻肠囊离体吸收实验和 Caco-2 细胞摄取途径研究，发现生姜鲜榨汁纳米囊泡经肠吸收后粒径、PDI 值均增大，说明纳米囊泡以完整结构被肠囊吸收和被细胞摄取，但其物理性质发生了一定变化，同时发现囊泡结构对生姜中成分的吸收有促进作用。

本课题组前期采用外翻肠囊模型探究生姜水煎液中纳米囊泡肠吸收的特点[6]，在生药量相同的情况下比较生姜水煎液纳米囊泡和生姜鲜榨汁纳米囊泡 P_{app} 最高值的肠段，发现生姜水煎液组纳米囊泡 P_{app} 最高值出现在空肠、回肠中，说明其中的成分易在小肠部位吸收；而生姜鲜榨汁组 P_{app} 最高值则主要出现在结肠段，说明其中成分易在结肠吸收。已有研究表明，生姜鲜榨汁[20]和鲜铁皮石斛中的天然脂质纳米囊泡[21]对结肠炎治疗效果好，与其中有效成分在结肠的高渗透性有关。

综上，本研究结果表明生姜鲜榨汁中纳米囊泡的各成分在肠道的吸收效果优于未被囊泡装载的游离成分，其细胞摄取途径为巨胞饮途径和脂筏介导途径，不同于人工制备的纳米制剂，也不同于已知植物来源的纳米囊泡。本研究为生姜鲜榨汁中纳米囊泡的合理使用与制剂研发提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 杨秀娟, 王佳佳, 郭晶晶, 等. 生姜、干姜、炮姜的性效考证及其化学成分、药理活性的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(4): 595-605.

[2] 刘雅芳, 曲昌成, 林艳巧. 朱丹溪应用生姜汁的经验浅析 [J]. 现代中医临床, 2024, 31(3): 54-57.

[3] 陈春苹, 徐红艳, 刘帅辰, 等. 植物类外泌体样纳米颗粒特性、成分与功能研究进展 [J]. 食品与机械, 2024, 40(1): 226-233.

[4] 陈婷婷. 药食两用植物源性纳米囊泡在疾病治疗领域的研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2022, 56(6): 477-488.

[5] Zhuang X Y, Deng Z B, Mu J Y, *et al*. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4: 28713.

[6] 郭小萌, 王琪, 李美景, 等. 基于外翻肠囊模型考察人参、生姜单煎及合煎液纳米相态的肠吸收特性差异 [J]. 中国实验方剂学杂志: 2024, 5(30): 1-16.

[7] 许永崧, 潘学强, 龚慕辛, 等. 吴茱萸汤外翻肠囊吸收成分与原药中各成分相关关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2490-2498.

[8] 陶庆丰. 花色苷纳米脂质体对胃肠细胞抗氧化作用的研究 [D]. 杭州: 中国计量大学, 2019.

[9] 李之清, 王志清, 张艳丽, 等. 巨胞饮内吞途径介导蒲公英汤剂体进入细胞 [J]. 基础医学与临床, 2019, 39(7): 925-931.

[10] 侯妍. 菊粉修饰口服双层纳米颗粒的构建及其对原位结肠癌的靶向治疗作用研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2022.

[11] 谢爽. 靶向高分子囊泡作为口服胰岛素载体的体内体外性能研究 [D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2018.

[12] 李俊言, 王文苹, 张祎, 等. 植物类中药来源囊泡的研究进展 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2023, 52(3): 349-360.

[13] 况文亮. 基于肠道自组装胆盐囊泡形成的葛根—丹参配伍协同吸收机制研究 [D]. 江西: 江西中医药大学, 2024.

[14] Man F L, Meng C, Liu Y, *et al*. The study of ginger-derived extracellular vesicles as a natural nanoscale drug carrier and their intestinal absorption in rats [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(6): 206.

[15] 柴桂宏. 固体脂质纳米粒的小肠上皮细胞转运机制研究及其载体构建 [D]. 杭州: 浙江大学, 2016.

[16] 孙利珍. 纳米级高分子囊泡作为口服胰岛素载体材料的研究 [D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2014.

[17] Chen Z M, Schmid S L. Evolving models for assembling and shaping clathrin-coated pits [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(9): e202005126.

[18] 袁小铃. 新型内质网靶向阳离子脂质体的胞内基因递送机制研究 [D]. 浙江: 浙江大学, 2020.

[19] 赵梦, 刘卓雅, 于嘉敏, 等. 生姜细胞外囊泡样纳米粒载吴茱萸碱的处方工艺及体外释药研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(6): 527-533

[20] Zhang M Z, Viennois E, Prasad M, *et al*. Edible ginger-derived nanoparticles: A novel therapeutic approach for the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated cancer [J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 321-340.

[21] 谢登超. 铁皮石斛来源天然脂质纳米囊泡在溃疡性结肠炎口服治疗中的应用 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.

[责任编辑 罗 曦]