于飞, 吴彤, 冯玉超, 等. 绿豆多酚在煮制加工中的变化规律及其对热应激诱导的 Caco-2 细胞凋亡的调控作用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 1−15. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010224

YU Fei, WU Tong, FENG Yuchao, et al. Variation Patterns of Mung Bean Polyphenols during Cooking Processes and Their Regulatory Effects on Heat Stress-induced Apoptosis in Caco-2 Cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 1−15. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010224

·特邀主编专栏—植物基食品原料基础研究、前沿技术创新及其健康绿色产品开发（客座主编：于寒松、张健、李健）·

# 绿豆多酚在煮制加工中的变化规律及其对热应激诱导的 Caco-2 细胞凋亡的调控作用

于　飞[1], 吴　彤[1], 冯玉超[1], 富天昕[1], 张　舒[1], 王长远[1,2,*]
（1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319）

**摘　要:** 本研究以绿豆为原料，通过提取不同煮制时间处理的多酚，测定多酚含量、抗氧化活性及单体酚组成。采用逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR 和 Western blotting 等技术深入探究了煮制加工绿豆提取多酚对热应激诱导的细胞凋亡的影响机制。结果显示，煮制 25 min 的绿豆具有较高的多酚含量（16.017 mg/g）和抗氧化活性（DPPH：90.733%；$ABTS^+$：89.997%；T-AOC：90.423 U/mL），可用于后续实验；与热应激组（Heat stress，HS）相比，煮制 25 min 绿豆提取多酚能够显著抑制热休克蛋白（Hsp27、Hsp70、Hsp90）的 mRNA（1.336、1.319、1.354）及凋亡蛋白表达（Bax：1.212）（$P<0.05$），降低细胞内活性氧（Reactive oxygen species，ROS）含量，绿豆多酚预防组（Mung bean polyphenol prevention group，Pro-mbp：157.96%），绿豆多酚缓解组（Mung bean polyphenol remission group，Rem-mbp：163.48%）；与 Rem-mbp 相比，Pro-mbp *BCL-2*（0.976）和 Bcl-2（0.696）表达升高，*CYCS*（1.323）、*CASP3*（1.496）和 *PARP1*（1.208）及相关蛋白质表达降低，表明煮制 25 min 的绿豆提取多酚对热应激的预防作用大于缓解作用。煮制 25 min 绿豆提取多酚通过降低细胞内 ROS 含量，调节 *HSP27*（HS：1.015，NAC（ROS 抑制剂）：0.832，Pro-mbp+NAC：0.482，Rem-mbp+NAC：0.697）、*HSP70*（HS：1.013，NAC：0.856，Pro-mbp+NAC：0.497，Rem-mbp+NAC：0.732）、*HSP90*（HS：1.016，NAC：0.873，Pro-mbp+NAC：0.501，Rem-mbp+NAC：0.726）的表达，证实热应激诱导的细胞凋亡与 Caspase 介导的线粒体通路有关，从而抑制热应激诱导的细胞凋亡。本研究为后续探究煮制加工绿豆提取多酚调控热应激的相关通路提供理论依据。

**关键词:** 绿豆多酚, 煮制时间, 热休克蛋白, ROS, 细胞凋亡
**中图分类号:** TS214.9; O629.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0001−15
**DOI:** 10.13386/j.issn1002-0306.2025010224
本文网刊:

# Variation Patterns of Mung Bean Polyphenols during Cooking Processes and Their Regulatory Effects on Heat Stress-induced Apoptosis in Caco-2 Cells

**YU Fei[1], WU Tong[1], FENG Yuchao[1], FU Tianxin[1], ZHANG Shu[1], WANG Changyuan[1,2,*]**
（1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China）

**Abstract:** This study extracted polyphenols from mung beans subjected to varying cooking times and subsequently determined their total polyphenol content, antioxidant activity, and individual phenolic profile. Reverse transcription-

**收稿日期:** 2025−01−23
**基金项目:** 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目（LJGXCG2023-019）。
**作者简介:** 于飞（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 3244860375@qq.com。
*** 通信作者:** 王长远（1976−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程, E-mail: byndwcy@163.com。

polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting techniques were used to investigate the effect of polyphenols extracted from mung bean on apoptosis induced by heat stress. The results showed that mung beans cooked for 25 min yielded polyphenols with the highest content (16.017 mg/g) and antioxidant capacity (DPPH: 90.733%; $ABTS^{+}$: 89.997%; T-AOC: 90.423 U/mL). Consequently, this extract was selected for all subsequent experiments. Compared with heat stress group (HS), polyphenols extracted from mung bean after cooking for 25 min could significantly inhibit the mRNA (1.336, 1.319, 1.354) of heat shock proteins (Hsp27, Hsp70, Hsp90) and apoptotic protein expression (Bax: 1.212) ($P$<0.05), decreased intracellular reactive oxygen species (ROS) content, mung bean polyphenol prevention group (Pro-mbp 157.96%), mung bean polyphenol remission group (Rem-mbp: 163.48%). Compared with Rem-mbp, the expressions of Pro-mbp *BCL-2* (0.976) and Bcl-2 (0.696) were increased, while the expressions of *CYCS* (1.323), *CASP3* (1.496), *PARP1* (1.208) and related proteins were decreased. The results indicated that the effect of polyphenols extracted from mung bean boiled for 25 min on the prevention of heat stress was greater than the relief effect. After boiling mung bean for 25 min, polyphenols extracted from mung bean reduced intracellular ROS content, regulated *HSP27* (HS: 1.015, NAC (ROS inhibitor): 0.832, Pro-mbp+NAC: 0.482, Rem-mbp+NAC: 0.697), *HSP70* (HS: 1.013, NAC: 0.856, Pro-mbp+NAC: 0.497, Rem-mbp+NAC: 0.732), and *HSP90* (HS: 1.016, NAC: 0.873, Pro-mbp+NAC: 0.501, Rem-mbp+NAC: 0.726), confirmed that heat stress-induced apoptosis was related to the mitochondrial pathway mediated by Caspase, thereby inhibiting heat stress-induced apoptosis. This study provides a theoretical basis for further research on the related pathways of heat stress regulation by polyphenols extracted from mung bean.

**Key words:** mung bean polyphenols; cooking time; heat shock protein (HSP); ROS; apoptosis

热应激(Heat stress)是指生物体在高温环境刺激下,因产热与散热稳态失衡而引发的非特异性生理反应总和[1]。随着全球气候变暖趋势的加剧,极端高温天气事件频发[2],热应激已成为威胁公共卫生安全的重要挑战之一。其对人类健康的影响日益显著,不仅导致多种热相关疾病的发病率上升,并且还可能对经济、社会和环境产生负面效应[3]。因此,探索快速有效的预防和缓解策略已成为当前研究的热点。

绿豆(*Vigna radiata*),又称青小豆,是我国传统杂粮作物之一,在《本草纲目》中即有“疏热解毒、消渴饮水”功效记载[4]。研究表明,绿豆富含多种生物活性物质,包括多酚类化合物、生物活性肽、超氧化物歧化酶(SOD)以及几丁质酶等[5−7]。其中,多酚类物质因其含量丰富且具有显著的生理活性而备受营养学和食品科学领域的关注。绿豆中的多酚主要包括酚酸类(如咖啡酸、香豆酸、阿魏酸和没食子酸)和黄酮类(如牡荆素、异牡荆素和槲皮素)化合物[8−9]。这些多酚类物质因其强大的抗氧化特性,在缓解热应激方面具有潜在的应用价值[10]。热应激状态下,机体会产生大量活性氧(ROS),导致抗氧化系统受损,氧化物质清除能力下降,进而破坏内环境稳态,诱发氧化应激[11−12]。已有研究表明,天然多酚类物质如茶多酚和阿魏酸等可通过调节抗氧化酶活性和热休克蛋白表达来缓解热应激。此外,阿魏酸可通过降低ROS、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)水平,同时提高SOD 活性,有效抑制热应激诱导的肠道氧化应激[13]。然而,尽管多酚缓解热应激的研究已取得一定进展,但关于不同加工方式对绿豆多酚调节热应激功效的影响及其调节热应激的作用机制研究还未见报道。

煮制作为绿豆最常用的加工方式之一,显著影响其生物活性功能。研究表明,不同的热处理方式对谷物中多酚类物质的含量和活性具有显著影响。张欢[14] 通过比较不同蒸煮方式处理糙米发现,高压蒸煮可使糙米多酚含量提高 15.58%,而其他蒸煮方式则导致多酚含量下降,但蒸煮后的多酚仍保持抗氧化活性。值得注意的是,绿豆作为复杂的食品体系,其含有的抗营养因子(如单宁、植酸、皂苷等)会显著降低多酚的生物利用度。虽然热处理能够有效减少或去除这些抗营养因子,但其对绿豆多酚的营养和生物活性成分的影响则取决于具体的加工时间。例如,薛璐璐[15] 研究热处理方式对绿豆和奶白花芸豆抗营养因子的抑制作用,结果表明,蒸煮时间在 30 min 时皂苷和单宁含量下降最多。刘璐等[16] 发现蒸煮时间为 90 min 时糙米多酚含量最高、抗氧化活性最好。曾子聪[17] 发现糙米多酚经过不同温度的热液处理 30 min 后,其多酚含量、黄酮含量以及抗氧化性均降低;且随着处理时间的延长,其多酚含量、黄酮含量以及抗氧化性均有所回升。因此,深入研究煮制时间对绿豆多酚类物质含量、生物活性及其缓解热应激诱导细胞凋亡的作用机制,不仅具有重要的理论价值,还可为优化绿豆加工工艺提供科学依据。

Caco-2 细胞是一种功能和结构类似于成熟小肠上皮细胞的人肠上皮细胞模型,常被用作肠上皮细胞的热应激模型[18−19],因此本研究选择 Caco-2 细胞,探讨煮制加工绿豆多酚调节热应激的作用机制。先前的研究[20] 发现,牡荆素、荭草苷和咖啡酸是绿豆中具有调控热应激作用的单体酚,通过建立轻、中、重度(39、41、43 ℃)热应激细胞模型,确定最佳热应激建模时间为 6 h。基于此,本研究采用人肠上皮细胞系(Caco-2)作为模型,模拟人体中暑的温度和时间(41 ℃,6 h),考察煮制加工绿豆多酚对热应激的预防和缓解作用,旨在阐明煮制加工绿豆多酚调节热应激诱导的细胞凋亡的机制,从而为缓解热应激提供研究基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与仪器

绿豆　市售; 石油醚、无水乙醇　中国辽宁泉瑞试剂有限公司; DPPH、ABTS$^+$、总抗氧化(T-AOC)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒　南京建成生物科技有限公司; 维生素 C(Vitamin C, $V_C$)　上海源叶生物科技有限公司; Caco-2 细胞　武汉普诺赛生命科技有限公司; Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖与毒性检测试剂盒　北京兰杰柯科技有限公司; AB-8 大孔树脂　北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒　上海碧云天生物有限公司; 胰蛋白酶-EDTA(0.25%)　赛默飞世尔科技中国有限公司; Tanespimycin(Hsp90 抑制剂)、VER-155008(Hsp70 抑制剂)、HSP27 inhibitor J2(Hsp27 抑制剂)、NAC(ROS 抑制剂)　美国 MCE 生物科技公司; TRIzol 试剂、PrimeScript RT 试剂盒、TB Green Premix Ex Taq 试剂盒　宝日医生物技术有限公司; 所有分离用有机溶剂均为国产分析纯。

Cary 60 紫外分光光度计　美国安捷伦公司; RE-2000E 旋转蒸发仪　上海耀特仪器有限公司; FW100 高速粉碎机　沙鹰科学仪器(上海)有限公司; DK-S24 数显恒温水浴锅　上海双旭电子有限公司; VL-220B 高速冷冻离心机　长沙湘仪有限责任公司; S10-3 磁力搅拌器　上海司乐仪器有限公司; Varioskan LUX 多功能酶标仪　赛默飞科技有限公司; CKX41 倒置显微镜　日本 Olympus 公司; Mini-Protean 4 电泳仪　美国 Bio-Rad 公司; AI600 化学成像系统　美国 GE 公司; qTOWER 高速荧光定量 PCR 仪　德国 Jena AG 公司; Amersham Imager6oo 超灵敏多功能成像仪　英国 Cytiva(思拓凡)公司。

### 1.2　实验方法

1.2.1　筛选绿豆多酚提取的最佳蒸煮时间

1.2.1.1　煮制绿豆中多酚的提取　参照 Zhang 等[21]方法并进行修改, 绿豆清洗后烘干至恒重, 绿豆/水的比例 1∶5(w/v)在 100 ℃ 下煮 10、15、20、25、30 min, 用纱布过滤网(20 cm×30 cm)将不同时间段的煮制绿豆固液分离, 将处理后的绿豆干燥后磨成粉末, 绿豆汤 3000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 并将上清液避光真空冷冻干燥后, 于−80 ℃ 下保存, 用于后续实验。绿豆粉过 80 目筛, 绿豆粉/石油醚的比例 1∶5(w/v)脱脂三次(每次 5 h)后进行下一步实验。取一定量的脱脂绿豆粉, 在温度 40 ℃、功率 400 W 的超声条件下, 用 80% 乙醇对多酚类物质提取 20 min, 3000 r/min 离心 15 min 后收集上清液, 并按上述方法继续对残渣进行两次提取。将混合后的上清液在 45 ℃ 下减压旋转蒸发去除乙醇, 得到的多酚提取液避光真空冷冻干燥后, 于−80 ℃ 下保存, 用于后续游离酚的测定。参照盛亚男等[22]方法, 采用有机溶剂提取法对煮制绿豆中多酚类物质进行提取。取一定量的脱脂绿豆粉, 在料液比 1∶12(g/mL)、提取温度 46 ℃、提取时间 1.6 h 条件下, 用 60% 乙醇对多酚类物质进行提取, 3000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 并按上述方法继续对残渣进行两次提取。将混合后的上清液在 45 ℃ 下减压旋转蒸发去除乙醇, 得到的多酚提取液避光真空冷冻干燥后, 于−80 ℃ 下保存, 用于后续多酚的测定。

1.2.1.2　多酚含量的测定　以没食子酸标准品溶液浓度和对应的吸光度绘制的标准曲线线性回归方程为 y=3.0306x+0.0165($R^2$=0.9968), 说明线性关系良好。采用 Shao 等[23]所使用的测定方法, 并进行适当修改。取 1 mL 绿豆多酚冻干粉配制的样品溶液与 1 mL 福林酚试剂混合, 加入 15% $Na_2CO_3$ 溶液 4 mL, 并用蒸馏水将混合物的体积调整为 10 mL, 立即摇匀后, 避光孵育 60 min, 3000 r/min 离心 5 min, 取上清液用分光光度计在 765 nm 波长下测吸光度。多酚含量以每克样品的没食子酸当量(mg GAE/g DW)表示。

$$X(mg/g)=\frac{(C\times 10\times N)\times 10^{-3}}{M} \quad 式(1)$$

式中: X: 多酚含量(mg/g); C: 没食子酸浓度(μg/mL); N: 样品稀释倍数; M: 试样的质量(g)。

1.2.1.3　多酚的纯化与纯度测定　参考吴彤等[24]的方法, 选择 AB-8 大孔树脂(30 mm×450 mm)用于绿豆多酚的纯化, 吸附时上样(绿豆多酚冻干粉配制的多酚溶液)质量浓度 0.8 mg/mL、pH6、流速 1 BV/h、上样体积 60 mL, 解吸时乙醇体积分数 80%。纯度计算公式如下:

$$多酚纯度(\%)=\frac{C\times V}{m}\times 100 \quad 式(2)$$

式中: C: 纯化后冻干的绿豆多酚提取物质量浓度(mg/mL); V: 纯化后绿豆多酚溶液体积(mL); m: 纯化后绿豆多酚冻干粉质量(mg)。

1.2.1.4　不同煮制时间对绿豆提取多酚抗氧化活性的影响　a.DPPH 自由基清除活性测定: 取 0.1 mL 的绿豆多酚冻干粉配制的多酚待测液加入 3.9 mL 的 DPPH 工作液(此时 DPPH 工作液的吸光度为 0.70±0.02), 充分摇匀后避光静置 30 min, 选用无水乙醇作空白参比, 在 515 nm 处测定吸光度值 $A_1$; 取 0.1 mL 的无水乙醇加入 3.9 mL 的 DPPH 工作液, 同等条件下测定吸光度值 $A_2$; 取 0.1 mL 的绿豆多酚冻干粉配制的多酚待测液加入 3.9 mL 的无水乙醇, 同等条件下测定吸光度值标记为 $A_3$。DPPH 自由基清除率计算公式如下:

$$DPPH自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_1-A_3}{A_2}\right)\times 100 \quad 式(3)$$

b.ABTS$^+$自由基清除活性测定: 提取物的 ABTS$^+$

自由基清除活性采用 Yap 等[25] 的方法进行测定，并稍加修改。配制好的 $ABTS^+$原液避光孵育过夜，使用前用乙醇稀释，使工作液在 734 nm 处吸光度值为 0.70±0.02。取 0.1 mL 绿豆多酚冻干粉配制的样品溶液与 3.9 mL 新鲜制备的 $ABTS^+$自由基工作液混合，在 734 nm 处测定吸光度标为 $A_x$。$ABTS^+$自由基清除率计算公式如下：

$$ABTS^+自由基清除率(\%)=\left(1-\frac{A_x-A_{x0}}{A_0}\right)\times 100 \quad 式（4）$$

式中：$A_{x0}$ 为 0.1 mL 样品溶液+3.9 mL 溶剂（无水乙醇）；$A_0$ 为 0.1 mL 溶剂+3.9 mL $ABTS^+$工作液。

c.总抗氧化能力（T-AOC 法）测定：使用总抗氧化检测试剂盒，按照试剂盒使用说明进行检测。计算公式如下：

$$总抗氧化能力(U/mL)=\frac{A_{测定}-A_{对照}}{0.01T}\times\frac{V_{反总}}{V_{样}}\times N \quad 式（5）$$

式中：T：反应时间，30 min；$V_{反总}$：反应体系总体积，mL；$V_{样}$：取样量，mL；N：样本测试前稀释倍数。

1.2.1.5 LC-MS 检测单体酚成分 参考 Kiani 等[26] 的方法并进行适当修改，取适量多酚冻干粉加入等体积无水乙醇溶解，过 0.22 μm 有机相滤膜。LC-MS 联用仪配备 $C_{18}$ 色谱柱（1.7 μm×2.1 mm×100 mm），进样量为 10 μL，流速为 0.4 mL/min，柱温 30 ℃，检测波长 280 nm。使用流动相 A（0.1% 的甲酸水溶液）和流动相 B（乙腈）洗脱，洗脱程序如下：0~1.5 min，5% B；1.5~11 min，5%~40% B；11~14 min，40%~95% B；14~16.5 min，95% B；16.5~16.8 min，95%~5% B；16.8~20 min，5% B。采用 ESI 正离子扫描模式，扫描范围（m/z）为 50~1200 amu。离子源温度为 120 ℃，毛细管电压为 0.5 kV，采用高纯度 $N_2$ 作为雾化气和干燥气，脱气气体和锥形气体流速分别为 800 L/h 和 50 L/h。

1.2.2 煮制 25 min 绿豆提取多酚对热应激诱导的细胞凋亡的影响

1.2.2.1 细胞活力检测 将细胞以 $1\times10^4$ 细胞/孔的密度接种到 96 孔板中培养 36 h。将浓度分别为 1、3、10、30、100 μg/mL 的绿豆多酚和 $V_C$ 添加到细胞中培养 24 h。加入 10 μL 的 CCK-8 试剂，孵育 2 h，使用酶标仪在 450 nm 下检测吸光度。细胞存活率计算公式如下：

$$细胞存活率(\%)=\frac{A_{实验组}-A_{空白校零孔}}{A_{对照组}-A_{空白校零孔}}\times 100 \quad 式（6）$$

式中：$A_{实验组}$：添加不同浓度煮制 25 min 绿豆多酚或 $V_C$ 细胞的吸光度；$A_{空白校零孔}$：不含细胞但含有培养基和 CCK-8 试剂的孔的吸光度；$A_{对照组}$：未经过任何处理的正常细胞的吸光度。

1.2.2.2 细胞培养和药物处理 Caco-2 细胞在含有 20% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中培养，并在 37 ℃ 和 5% $CO_2$ 饱和湿度下孵育。当细胞密度达到 70%~80% 时，用 2 mL 0.25% 胰蛋白酶消化并传代。

参考 Feng 等[20] 的方法并进行适当修改。采用 41 ℃ 处理 Caco-2 细胞 6 h 作为热应激建模条件。分组如下：细胞在 37 ℃ 培养（对照组，CG）。细胞在 41 ℃ 处理 6 h 后，37 ℃ 恢复 12 h（热应激组，HS）。细胞用绿豆多酚溶液（100 μg/mL）预处理 2 h 后 41 ℃ 处理 6 h，37 ℃ 恢复 12 h（绿豆多酚预防组，Pro-mbp）。细胞在 41 ℃ 处理 6 h 后，加入绿豆多酚溶液（100 μg/mL）后 37 ℃ 恢复 12 h（绿豆多酚缓解组，Rem-mbp）。细胞用 $V_C$（10 μg/mL）预处理 2 h 后 41 ℃ 处理 6 h，37 ℃ 恢复 12 h（$V_C$ 预防组，Pro-$V_C$）。细胞在 41 ℃ 处理 6 h 后，加入 $V_C$ 后 37 ℃ 恢复 12 h（$V_C$ 缓解组，Rem-$V_C$）。抑制剂组（其余抑制剂与 VER-155008 方法相同）：细胞用多酚溶液和 VER-155008（100 μg/mL）预处理 2 h 后 41 ℃ 处理 6 h，37 ℃ 恢复 12 h（绿豆多酚+VER-155008 预防组，Pro-mbp+VER-155008）。细胞在 41 ℃ 处理 6 h 后，加入多酚溶液和 VER-155008 后 37 ℃ 恢复 12 h（绿豆多酚+VER-155008 缓解组，Rem-mbp+VER-155008）。细胞用 $V_C$ 和 VER-155008（10 μg/mL）预处理 2 h 后 41 ℃ 处理 6 h，37 ℃ 恢复 12 h（$V_C$+VER-155008 预防组，Pro-$V_C$+VER-155008）。细胞在 41 ℃ 处理 6 h 后，加入 $V_C$ 和 VER-155008 后 37 ℃ 恢复 12 h（$V_C$+VER-155008 缓解组，Rem-$V_C$+VER-155008）。

1.2.2.3 抗氧化酶活性检测 收集细胞，按照 SOD、GSH-Px、CAT、MDA 试剂盒的说明书进行检测。

1.2.2.4 ROS 含量检测 参照 He 等[27] 方法并适当修改。将细胞以 $1\times10^5$ 个细胞/孔的密度接种到 6 孔板中并培养 36 h。使用荧光探针 DCFH-DA 进行 ROS 检测。磷酸盐缓冲盐水洗涤 CG、HS、Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$、Rem-$V_C$ 组细胞后，用 0.25% 胰蛋白酶消化并收集。然后将处理好的各组细胞与 DCFH-DA 探针在黑暗中在 37 ℃ 下孵育 30 min。每 3~5 min 将细胞倒置并混合，以确保探针和细胞之间的完全接触。用无血清细胞培养基洗涤细胞后，避光 30 min 后，荧光板读取器的平均激发波长为 488 nm，发射波长为 525 nm，检测细胞内 ROS 水平。

1.2.2.5 细胞凋亡检测 使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。用 PBS 洗涤细胞后，用 0.25% T/E 消化并收集，加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞，再加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL 碘化丙啶染色液，轻轻混合细胞并在室温下孵育 20 min。使用荧光显微镜检测细胞凋亡。

1.2.2.6 RT-PCR 检测 向细胞中加入浓度为 1、3、10、30、100 μg/mL 的绿豆多酚（$V_C$）2 h 后，将细胞在 41 ℃ 下处理 6 h，并在 37 ℃ 下恢复 12 h。细胞培养 36 h 后，根据 1.2.2.2 步骤处理抑制剂组细胞。

使用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA, PrimeScript RT 试剂盒从 RNA 逆转录 cDNA, TB Green Premix Ex Taq 试剂盒和 qTOWER 仪器对 cDNA 进行 RT-qPCR(预变性 95 ℃ 30 s(升温速率 4.4 ℃/s), 1 循环; PCR 分析模式: 定量分析 95 ℃ 5 s(升温速率 4.4 ℃/s), 60 ℃ 30 s(升温速率 2.2 ℃/s, 获取模式: Single), 40 循环; 融解: 分析模式: 融解曲线 95 ℃ 5 s (升温速率 4.4 ℃/s), 60 ℃ 1 min(升温速率 2.2 ℃/s), 95 ℃(升温速率 0.11 ℃/s, 获取模式: Continuous, Acquisitions: 5 per ℃), 1 循环; 降温 50 ℃ 30 s(升温速率 2.2 ℃/s), 1 循环, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 表达水平。引物序列列于表 1 中。

表 1　引物序列
Table 1　Primer sequence

| 基因 | 上游引物/下游引物 | 退火温度(℃) | PCR产物大小(bp) |
|---|---|---|---|
| *HSP27* | GATGGCGTGGTGGAGATCA<br>GGTGACTGGGATGGTGATCT | 60 | 150 |
| *HSP70* | TTGAAGAGCAACAGCAGCAG<br>GCTGATTCTCGATTGGCAGG | 60 | 248 |
| *HSP90* | GAAACTGCGCTCCTGTCTTC<br>CCTTCTTCTTGGCGTTCTTG | 60 | 239 |
| *BAX* | AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT<br>GTTCTGATCAGTTCCGGCAC | 60 | 181 |
| *BCL-2* | GGATAACGGAGGCTGGGATG<br>TGACTTCACTTGTGGCCCAG | 60 | 156 |
| *CYCS* | ACAGAAACCAGGCAGCCTTT<br>CAGGGACTGTGCTCTGGAAG | 60 | 123 |
| *CASP3* | GGCGGTTGTAGAAGAGTTTCG<br>ACACAGCCACAGGTATGAGC | 60 | 53 |
| *PARP1* | AGCGTGTTTCTAGGTCGTGG<br>CATCAAACATGGGCGACTGC | 60 | 194 |
| *ACTB* | CCCTGGAGAAGAGCTACGAG<br>CGTACAGGTCTTTGCGGATG | 60 | 240 |

1.2.2.7　蛋白质印迹分析检测　处理好的细胞经 PBS 洗涤后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并收集。将细胞在裂解缓冲液中裂解 30 min。蛋白质在 10%~12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 然后转移到聚偏二氟乙烯膜上, 在室温下在 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h。将膜洗涤并与一抗 Anti-Bax antibody( ab32503)、Anti-Bax antibody( ab 194583)等在 4 ℃ 孵育 12 h, 然后与鼠抗在室温下孵育 1 h。使用增强化学发光试剂盒和阿默舍姆 Imager 600 检测蛋白质, 并使用 Image-Pro Plus 软件进行分析。

### 1.3　数据处理

实验结果以均数±标准差(n≥3)表示。使用 Origin8.5 构建图。统计学分析采用 SPSS 25 软件进行单因素方差分析(ANOVA)和邓肯检验(D)(不同字母代表差异显著, $P<0.05$)。

## 2　结果与分析

### 2.1　绿豆多酚提取的最佳蒸煮时间

2.1.1　多酚含量、纯度、抗氧化活性测定　煮制时间对多酚含量的影响如图 1a 所示, 随着煮制时间的延长, 绿豆汤中多酚含量逐渐增加, 这主要是因为酚类物质的热稳定性差, 易分解, 高温条件使得分子运动加速, 氢键易断裂, 多酚的渗透溶解速度加快, 多酚溶出量变多, 引起含量增加[28−30]。煮制绿豆中多酚含量则呈现先升后降的趋势, 并在 25 min 时达到最大值(16.017 mg/g), 这主要是因为热加工可能破坏绿豆细胞膜和细胞壁的基本结构, 促进酚类物质的溶解, 导致绿豆结合酚含量上升, 而随着煮制时间的增加, 结合酚释放的速率小于绿豆中游离酚溶出的速率, 因此在煮制 25 min 后, 绿豆中的总酚含量呈下降趋势。为进一步提高绿豆多酚的纯度, 本研究采用 AB-8 大孔树脂对煮制加工后的绿豆多酚进行纯化。纯化结果如图 1b、c 所示, 经 AB-8 树脂纯化后, 多酚纯度较纯化前提高了约 7 倍, 表明 AB-8 树脂对绿豆多酚提取物具有良好的纯化效果。

不同煮制时间的多酚提取液对 DPPH 自由基、$ABTS^+$自由基、总抗氧化能力如图 1d~f 所示。随着煮制时间的延长, 绿豆汤中多酚的抗氧化能力逐渐升高; 而煮制绿豆中多酚的抗氧化能力则呈现先升后降的趋势, 在 25 min 时达到峰值(DPPH: 90.733%; $ABTS^+$: 89.997%; T-AOC: 90.423 U/mL)。这一结果与多酚含量的变化趋势一致。大量研究表明, 抗氧化活性与酚类物质含量呈正相关[31−32]。结合酚与细胞壁结构组分通过共价键结合, 例如阿魏酸通过酯键与木葡聚糖、果胶等多糖共价连接。加热过程可能破坏了这种共价稳定结构, 导致细胞成分和细胞壁分解, 从而释放出结合的酚类物质[33]。基于多酚含量和抗氧化活性的结果, 选择煮制 25 min 的绿豆多酚用于后续实验。

2.1.2　LC-MS 检测单体酚成分　煮制 25 min 的绿豆多酚成分鉴定结果如表 2 所示, 共鉴定出 42 种多酚物质。通过比较煮制 25 min 的绿豆和绿豆汤中多酚的成分差异, 发现煮制 25 min 绿豆多酚中含有更多的单体酚(41 种)。除反式阿魏酸外, 其他多酚类物质均在煮制 25 min 绿豆中检测到。Wang 等[34] 研究发现, 类黄酮和酚酸是影响绿豆总抗氧化活性的主要化合物, 且煮制 25 min 绿豆中含有更丰富的类黄酮和酚酸类物质。因此, 煮制 25 min 绿豆比绿豆汤具有更强的抗氧化活性。

### 2.2　煮制 25 min 绿豆提取多酚对热应激诱导的细胞凋亡的影响

2.2.1　Caco-2 细胞毒性试验分析　采用 CCK-8 法评估煮制加工后绿豆多酚本身的细胞毒性。结果表明, 绿豆多酚对 Caco-2 细胞的增殖具有浓度依赖性, 且浓度≤100 μg/mL 时细胞存活率均≥100%, 证明煮制 25 min 绿豆多酚对细胞无毒性作用。然而, 高浓度的 $V_C$ 具有较低的细胞毒性, 有研究证明较高浓度 $V_C$ 抑制细胞增殖[35]。

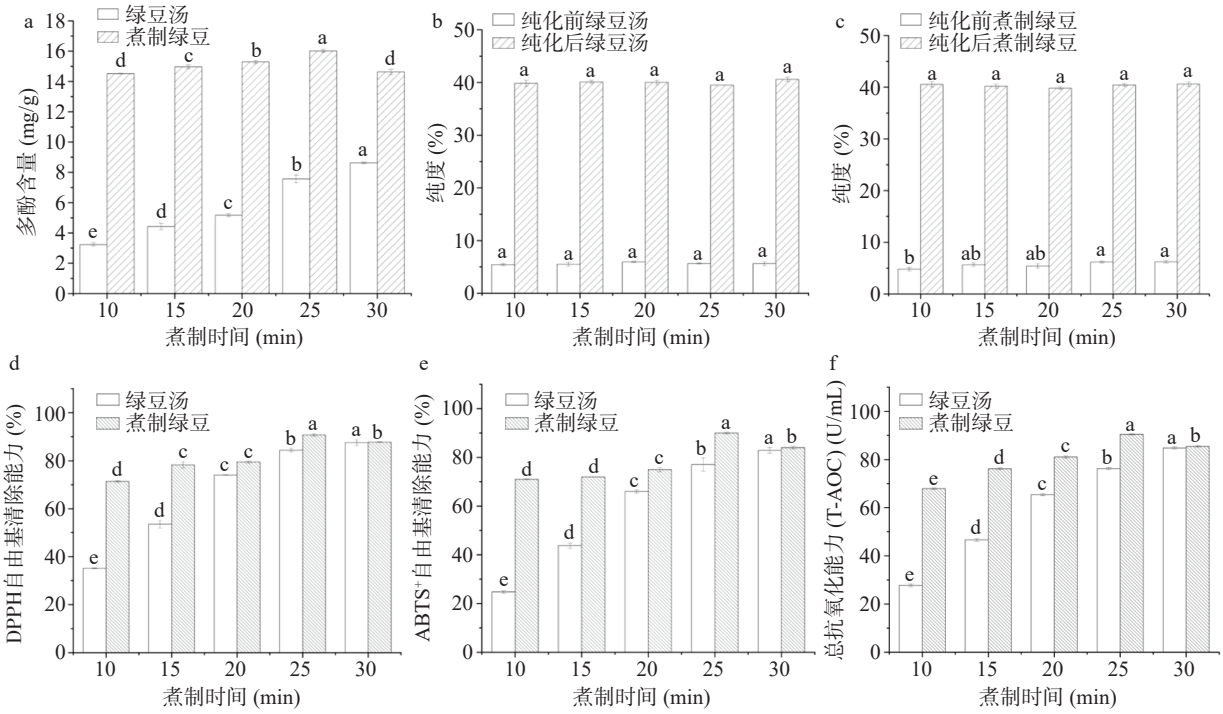



图 1　煮制时间对绿豆提取多酚含量、纯度和抗氧化能力的影响

Fig.1　Effect of cooking time on polyphenol content, purity, and antioxidant capacity of mung bean

注: a.不同煮制时间下绿豆的多酚含量; b~c.经过 AB-8 树脂纯化前后不同煮制时间下绿豆提取多酚的纯度; d~f.不同煮制时间下绿豆提取多酚的抗氧化能力; 不同字母表示显著差异, $P<0.05$; 图 2~图 6 同。

表 2　绿豆汤和煮制绿豆中多酚成分的鉴定

Table 2　Identification of polyphenols in mung bean soup and cooked mung bean

| 序号 | 多酚 | LDT | ZLD | 序号 | 多酚 | LDT | ZLD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4-羟基肉桂酸 | + | + | 22 | 芒柄花苷 | − | + |
| 2 | 番荔枝苷 | + | + | 23 | 南非醉茄素 | − | + |
| 3 | 大豆苷 | + | + | 24 | 儿茶素 | + | + |
| 4 | 牡荆素 | + | + | 25 | 甘草酚I | + | + |
| 5 | 七叶苷 | − | + | 26 | 甘草酚K | + | + |
| 6 | 咖啡酸 | + | + | 27 | 芹菜素7-O-(2"-O-乙酰基葡萄糖苷) | − | + |
| 7 | 表儿茶素 | + | + | 28 | 5,7-二羟基-2-(4-羟基苯基)-8-[3,4,5-三羟基-6-(羟甲基) 四氢吡喃-2-基]-4H - 色烯-4-酮 | − | + |
| 8 | 荭草苷 | + | + | 29 | 脱氢新橙皮苷元 | − | + |
| 9 | (2R,3S)-鱼藤酸 | + | + | 30 | 6-羟基-2-苯基-4H-色烯-4-酮 | − | + |
| 10 | 姜黄素 | + | + | 31 | 对香豆素 | − | + |
| 11 | 木犀草素-7-葡萄糖苷 | − | + | 32 | 山奈酚-7-葡萄糖苷 | + | + |
| 12 | 间香豆酸 | + | + | 33 | 柚皮素 | + | + |
| 13 | 阿魏酸 | + | + | 34 | 2-(3,4-二羟基苯基)-3,5,7-三羟基-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-4-酮 | − | + |
| 14 | 槲皮素 | + | + | 35 | 香叶木素-7-新橙皮糖苷 | − | + |
| 15 | 异牡荆素 | + | + | 36 | 根皮素 2'-O-葡萄糖醛酸苷 | − | + |
| 16 | 没食子酸 | + | + | 37 | 异荭草苷 | + | + |
| 17 | 3-(3,4-二羟基-5-甲氧基)-2-丙烯酸 | + | + | 38 | 小麦黄素阿拉伯糖苷 | − | + |
| 18 | 反式阿魏酸 | + | − | 39 | 3'- 甲氧基岩白菜酸 | − | + |
| 19 | 木犀草素 | + | + | 40 | 姜烯酮 C | − | + |
| 20 | 艾黄素 | + | + | 41 | 二氢芥子酸 | − | + |
| 21 | 大豆黄素苷 | + | + | 42 | 甘草酚 O | − | + |

注: “LDT”代表绿豆汤; “ZLD”代表煮制绿豆; “+”表示存在该物质; “−”表示不含该物质。

2.2.2　不同浓度煮制 25 min 绿豆提取多酚对 *HSP70*、*HSP90* 和 *HSP27* mRNA 相对表达的影响　热休克蛋白是一种分子伴侣, 可帮助未成熟的蛋白质加工折叠, 但本身不参与构成蛋白质的成分。当机体暴露于高温时会大量合成热休克蛋白, 从而来保护机体维持正常生理活动[36]。为选择有效浓度的煮制 25 min

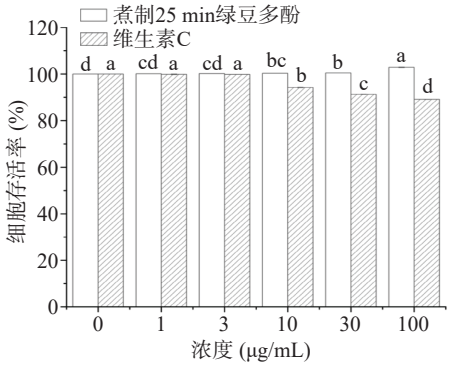



图 2　不同浓度的煮制 25 min 绿豆提取多酚和 $V_C$ 对细胞存活率的影响

Fig.2　Effects of different concentrations of polyphenols extracted from mung bean for 25 min and Vc on cell survival rate

绿豆多酚进行热应激实验, 本研究通过 RT-qPCR 检测热应激后细胞内 *HSP70*、*HSP90*、*HSP27* 的 mRNA 相对表达量。如图 3a、b 所示, 随着煮制 25 min 的绿豆多酚浓度增加, 三种热休克蛋白(HSPs)的 mRNA 表达水平呈现明显的浓度依赖性下降趋势。当煮制 25 min 绿豆多酚浓度为 100 μg/mL 时, 可以明显抑制 3 种热休克蛋白表达, 且抑制效果与 $V_C$ (10 μg/mL)组相近。因此, 选择 100 μg/mL 的煮制 25 min 绿豆多酚和 10 μg/mL 的 $V_C$ 进行后续实验。

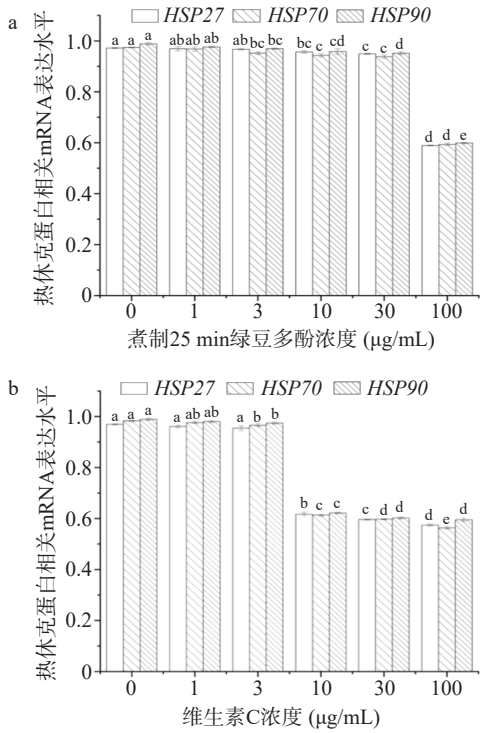



图 3　不同浓度的煮制 25 min 绿豆提取多酚和 $V_C$ 对热应激细胞中 *HSP27*、*HSP70* 和 *HSP90* mRNA 水平的影响

Fig.3　Effects of different concentrations of polyphenols extracted from mung bean for 25 min and $V_C$ on mRNA levels of *HSP27*, *HSP70* and *HSP90* in heat-stressed cells

2.2.3　抗氧化酶活性　抗氧化剂如超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等通过清除自由基和修复细胞功能, 在抵御氧化应激中发挥关键保护作用[24]。如图 4 所示, 与 CG 组相比, HS 组 SOD、GSH-Px、CAT 活性显著降低($P$<0.05), MDA 含量显著升高($P$<0.05), 说明热应激造模成功诱导了氧化应激; 与 HS 组相比, Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组 SOD、GSH-Px、CAT 活性显著升高($P$<

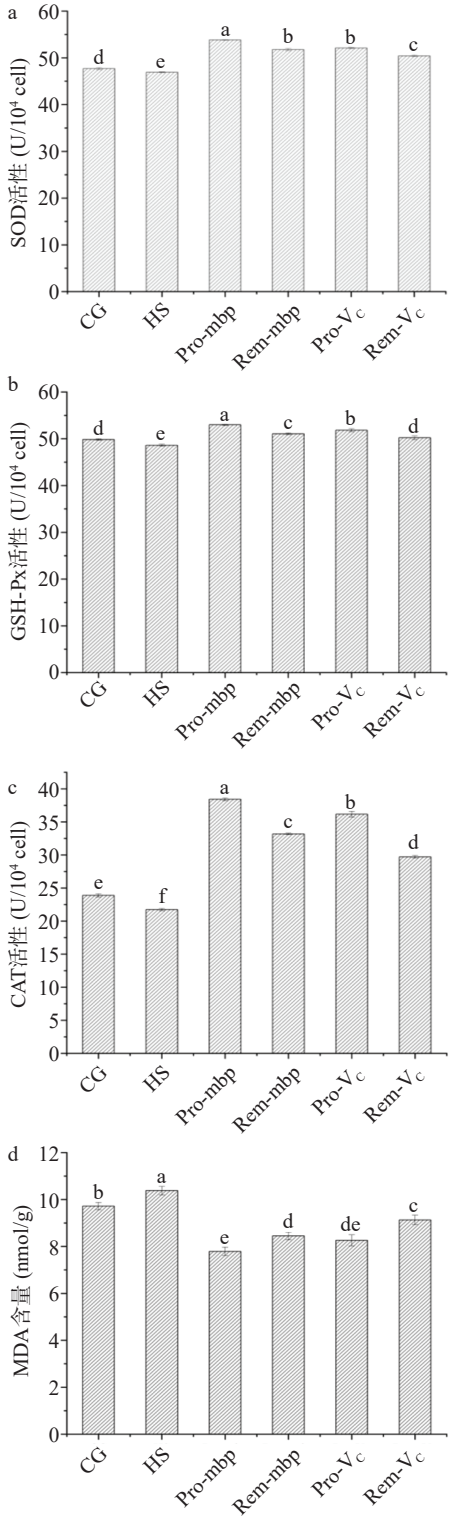



图 4　煮制 25 min 绿豆提取多酚对 Caco-2 细胞中抗氧化酶活性的影响

Fig.4　Effect of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on the activity of antioxidant enzymes in Caco-2 cells

注: a~d.各组中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量。

0.05)，MDA 含量显著降低($P$<0.05)，这可能与多酚类化合物清除羟基自由基的能力有关；Pro-mbp 组 SOD、GSH-Px、CAT 活性分别比 Pro-$V_C$ 组提高了 1.71、1.16、2.26 U/$10^4$ cell，MDA 含量降低了 0.47 nmol/g，Rem-mbp 组 SOD、GSH-Px、CAT 活性分别比 Rem-$V_C$ 组分别提高了 1.45、0.84、3.47 U/$10^4$ cell，而 MDA 含量降低了 0.68 nmol/g；此外，与 Rem-mbp 组相比，Pro-mbp 组 SOD、GSH-Px、CAT 活性分别升高了 2.05、1.93、5.24 U/$10^4$ cell，MDA 含量降低 0.66 nmol/g。实验结果表明，煮制 25 min 的绿豆多酚在提升 SOD、GSH-Px 和 CAT 等关键抗氧化酶活性方面表现出优于 $V_C$ 的效果，同时能够显著抑制热应激诱导的氧化损伤。多酚预防组在改善抗氧化指标方面优于多酚缓解组，这一差异可能与多酚类物质在氧化应激发生前的预防性调节作用有关。机制研究表明，煮制 25 min 的绿豆多酚主要通过调控抗氧化酶活性，增强细胞的抗氧化防御能力，从而有效保护细胞免受氧化应激引起的损伤。

2.2.4 ROS 含量分析 CG、HS、Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组细胞 ROS 表达情况如图 5 所示。与 CG 组相比，HS 组细胞显著($P$<0.05)提高了 ROS 荧光率(179.82%)，与 HS 组相比，Pro-mbp 组、Rem-mbp 组、Pro-$V_C$ 组和 Rem-$V_C$ 组的 ROS 荧光强度分别显著降低至 157.96%、163.48%、159.73% 和 164.51%($P$<0.05)，说明绿豆多酚和 $V_C$ 均具有显著的抗氧化作用。此外，Pro-mbp 组和 Rem-mbp 组的 ROS 荧光强度分别较 Pro-$V_C$ 组和 Rem-$V_C$ 组降低了 1.07% 和 1.03%，这表明煮制 25 min 的绿豆多酚在抑制热应激诱导的 ROS 表达方面略优于 $V_C$。Pro-mbp 组的 ROS 荧光强度较 Rem-mbp 组显著降低了 5.52%($P$<0.05)，这一结果进一步证实了多酚预防组在缓解热应激方面优于缓解组。

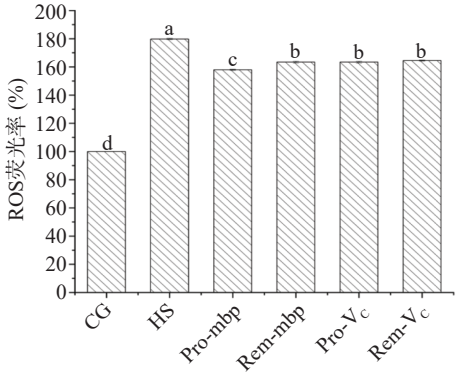



图 5 绿豆多酚在预防和缓解热应激中的细胞 ROS 表达

Fig.5 Expression of ROS in cells of mung bean polyphenols in preventing and relieving heat stress

在本研究中，用煮制 25 min 绿豆多酚处理热应激细胞，发现煮制 25 min 绿豆多酚能显著降低热应激诱导的 ROS 水平，并且 Pro-mbp 组的 ROS 水平的抑制作用高于 Rem-mbp 组。这可能是由于在 Pro-mbp 组中，热应激诱导的 ROS 首先被抑制，而在 Rem-mbp 组中，ROS 仅在 ROS 积累较高时被抑制。因此，Pro-mbp 和 Rem-mbp 组之间 ROS 抑制的效果不同。综上所述，绿豆多酚在一定程度上抑制了热应激诱导的 ROS 产生，且 Pro-mbp 组对 ROS 产生的抑制作用强于 Rem-mbp 组。

2.2.5 细胞凋亡和热休克蛋白表达分析 细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程，当细胞受到外部环境刺激时，会通过复杂的信号转导机制将刺激信号传递至细胞内，从而诱导细胞凋亡[37−38]。为探讨煮制 25 min 绿豆提取多酚抗热应激损伤的作用机制，本研究采用荧光显微镜检测其对热应激诱导的细胞凋亡的影响(图 6)。结果表明，与 CG 组相比，HS 组细胞凋亡率(41.73%)显著增加($P$<0.05)；而与 HS 组相比，Pro-mbp 组和 Rem-mbp 组的细胞凋亡率分别降低了 30.15% 和 10.77%。与 Pro-$V_C$ 组和 Rem-$V_C$ 组相比，Pro-mbp 组和 Rem-mbp 组的细胞凋亡率分别降低了 5.36% 和 4.51%，表明煮制 25 min 绿豆多酚缓解热应激诱导的细胞凋亡效果略优于 $V_C$。与 Rem-mbp 组相比，Pro-mbp 组的细胞凋亡率降低了 19.38%，结果表明，绿豆多酚预防组在缓解热应激诱导的细胞凋亡方面表现出较绿豆多酚缓解组更显著的干预效果。因此，煮制 25 min 绿豆提取多酚的预防性应用可有效降低热应激诱导的细胞凋亡。

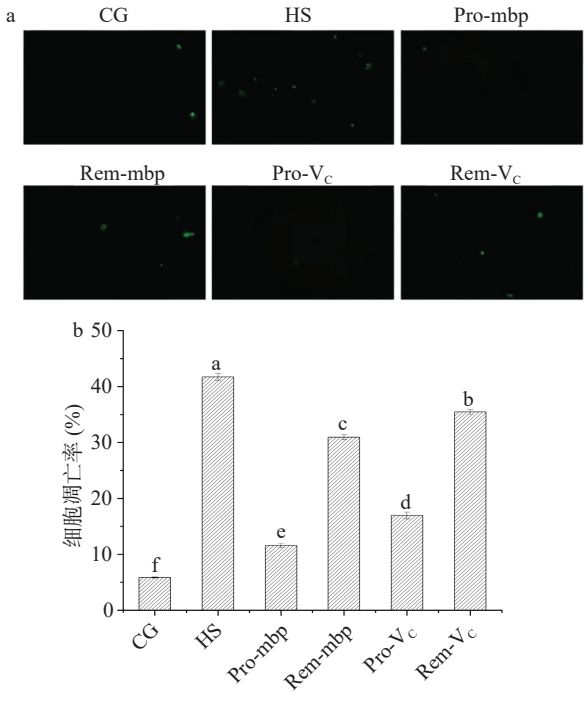



图 6 煮制 25 min 绿豆提取多酚对热应激诱导的细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on apoptosis induced by heat stress

注：a.荧光显微镜下的细胞凋亡(200 倍)；b.通过荧光显微镜定量细胞凋亡。

采用 RT-qPCR 和 Western blot 技术检测 CG、HS、Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组中热

休克蛋白及关键凋亡因子的 mRNA 和蛋白表达水平。如图 7 所示，热应激显著上调了 *HSP27*、*HSP70* 和 *HSP90* 的 mRNA 表达水平及其对应蛋白（Hsp27、Hsp70 和 Hsp90）的表达水平（$P<0.05$）；而添加煮制 25 min 绿豆多酚用于热应激预防或改善时，显著抑制了热应激诱导的 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 表达水平的上调（$P<0.05$）。此外，与 CG 组相比，HS 组中抗凋亡蛋白 *BCL-2* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。相反，*BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 及其对应蛋白（Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1）的表达水平显著上调（$P<0.05$），表明热应激通过调节凋亡相关基因的 mRNA 表达水平影响其蛋白表达，从而诱导细胞凋亡。

Caspase-3 是 Caspase 级联下游最重要的调节因子之一，其激活在很大程度上依赖于 Cytochrome C 的释放。Cytochrome C 是线粒体转运链的重要组成部分，Bcl-2 家族的凋亡蛋白 Bax 帮助 Cytochrome C 等小分子蛋白穿过线粒体膜进入细胞质触发细胞凋亡，而抗凋亡蛋白 Bcl-2 则阻止 Cytochrome C 从线粒体释放[39]。这表明热应激诱导的细胞凋亡与 Caspase 介导的线粒体通路密切相关。与 HS 组相比，添加煮制 25 min 绿豆多酚和 $V_C$ 后，Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组的 *BCL-2* mRNA

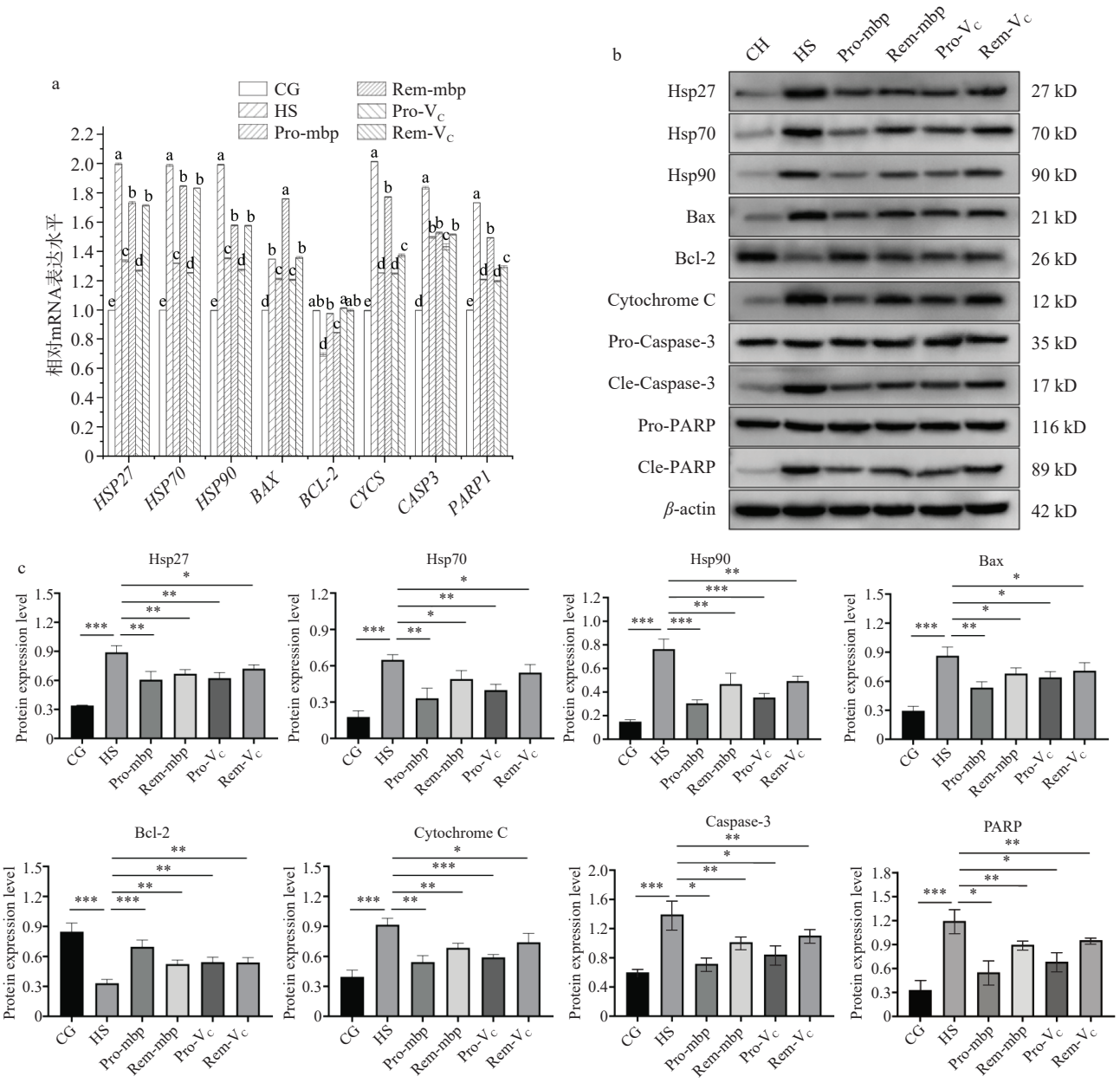



图 7　煮制 25 min 绿豆提取多酚对热休克蛋白和关键凋亡因子的 mRNA 和蛋白表达水平的影响

Fig.7　Effect of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on mRNA and protein expression levels of heat shock protein and key apoptotic factors

注：a.热应激处理下绿豆多酚的细胞中的热休克蛋白和凋亡因子 mRNA 的表达结果；b.热休克蛋白和凋亡蛋白条带结果；c.通过 Image-Pro plus V6.0 软件对蛋白条带进行定量。*$P<0.05$，**$P<0.01$，***$P<0.001$。

及其蛋白(Bcl-2)表达上调,而 *CYCS*、*CASP3*、*PARP1* mRNA 表达下调,且 Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3、Cle-PARP1 蛋白表达也显著降低($P$<0.05)。这表明煮制 25 min 绿豆多酚和 $V_C$ 可通过下调 Bax 表达和上调 Bcl-2 表达,进而抑制 Caspase-3 表达,阻止 PARP1 的裂解,从而有效缓解热应激诱导的细胞凋亡并抑制线粒体中 Cytochrome C 的释放。此外,与 Rem-mbp 和 Rem-$V_C$ 组相比,Pro-mbp 和 Pro-$V_C$ 组中 *BCL-2* mRNA 和蛋白表达上调,但无显著性差异,而 *BAX*、*CYCS*、*CASP3*、*PARP1* mRNA 表达显著下调,且 Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3、Cle-PARP1 蛋白表达也显著降低($P$<0.05),这说明 Pro-mbp 和 Pro-$V_C$ 组对热应激诱导的细胞凋亡的抑制程度略优于 Rem-mbp 和 Rem-$V_C$ 组。这种差异可能是由于预防组和缓解组作用于热应激细胞的时间点不同所致。综上所述,煮制 25 min 绿豆提取多酚对细胞具有保护作用。

2.2.6 热休克蛋白介导的煮制 25 min 绿豆提取多酚抗凋亡机制 热休克蛋白对细胞存活至关重要,并在细胞凋亡调控中发挥重要作用[40]。因此,为探究煮制 25 min 绿豆提取多酚是否通过调节热休克蛋白抑制热应激诱导的细胞凋亡,本研究通过添加 HSP27 inhibitor J2、VER-155008 和 Tanespimycin 检测了细胞凋亡关键因子的 mRNA 和蛋白表达水平。如图 8 所示,与 HS 组相比,VER-155008 组中 *HSP70*、*BCL-2* 的 mRNA 及 Hsp70 蛋白质表达水平显著降低($P$<0.05),而 Bcl-2 蛋白质表达水平、*BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平显著增加($P$<0.05),Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白质表达水平显著降低($P$<0.05);与 Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组相比,Pro-mbp+VER-155008、Rem-mbp+VER-155008、Pro-$V_C$+VER-155008 和 Rem-$V_C$+VER-155008 组 *HSP70* 和 *BCL-2* 的 mRNA 和蛋白表达水平降低;*BAX*、*CYCS*、

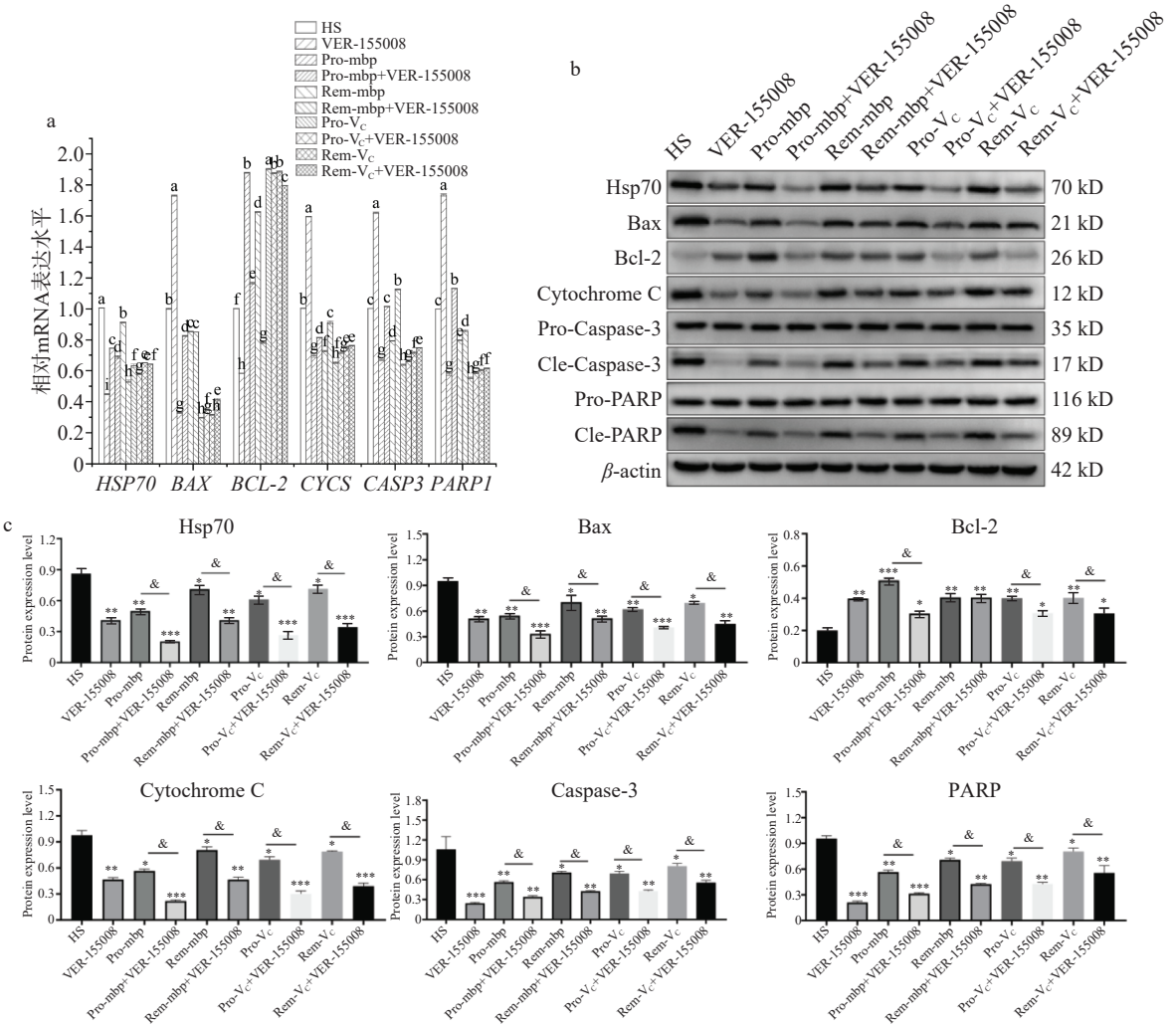



图 8 煮制 25 min 绿豆提取多酚对细胞内凋亡蛋白和 Hsp70 水平的影响

Fig.8 Effects of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on the levels of intracellular apoptotic protein and Hsp70

注:a.在添加 VER-155008 抑制剂到绿豆多酚中时,*HSP70* 和凋亡因子 mRNA 表达结果;b.Hsp70 和凋亡蛋白 Western blot 结果;c.通过 Image-Pro plus V6.0 软件对蛋白条带进行定量。与 HS 组相比,*$P$<0.05,**$P$<0.01,***$P$<0.001;&代表组间比较差异显著,$P$<0.05;图 9~图 11 同。

*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平增加; Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白表达水平显著降低($P$<0.05)。

如图 9 所示, Tanespimycin 组的 *BCL-2* 和 *HSP90* 的 mRNA 及 Hsp90 蛋白水平显著低于 HS 组($P$<0.05), Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 HS 组($P$<0.05), 而 Bax、Cytochrome C、Cle-caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白水平则显著降低($P$<0.05)。与 Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组相比, Pro-mbp+Tanespimycin、Rem-mbp+Tanespimycin、Pro-$V_C$+Tanespimycin 和 Rem-$V_C$+Tanespimycin 组的 *BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 显著升高, 蛋白表达水平显著降低($P$<0.05)。

如图 10 所示, 加入 HSP27 inhibitor J2 后, 细胞凋亡相关因子表达的趋势与加入 VER 155008、Tanespimycin 后观察到的结果一致。与 HS 组相比, HSP27 inhibitor J2 组 *HSP27*、*BCL-2* 的 mRNA 表达水平显著降低, Hsp27 蛋白表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P$<0.05), *BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平显著增加($P$<0.05), Bax、Cytochrome C、Cle-caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白表达水平显著降低($P$<0.05); 与 Pro-mbp、Rem-mbp、Pro-$V_C$ 和 Rem-$V_C$ 组相比, Pro-mbp+HSP27 inhibitor J2、Rem-mbp+HSP27 inhibitor J2、Pro-$V_C$+HSP27 inhibitor J2 和 Rem-$V_C$+HSP27 inhibitor J2 组 *HSP27*、*BCL-2* 的 mRNA 表达水平降低, *BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平升高, Hsp27、Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高。

上述结果表明, *HSP27*、*HSP70* 和 *HSP90* 的低表达(添加三种抑制剂时)会进一步促进细胞凋亡, 而

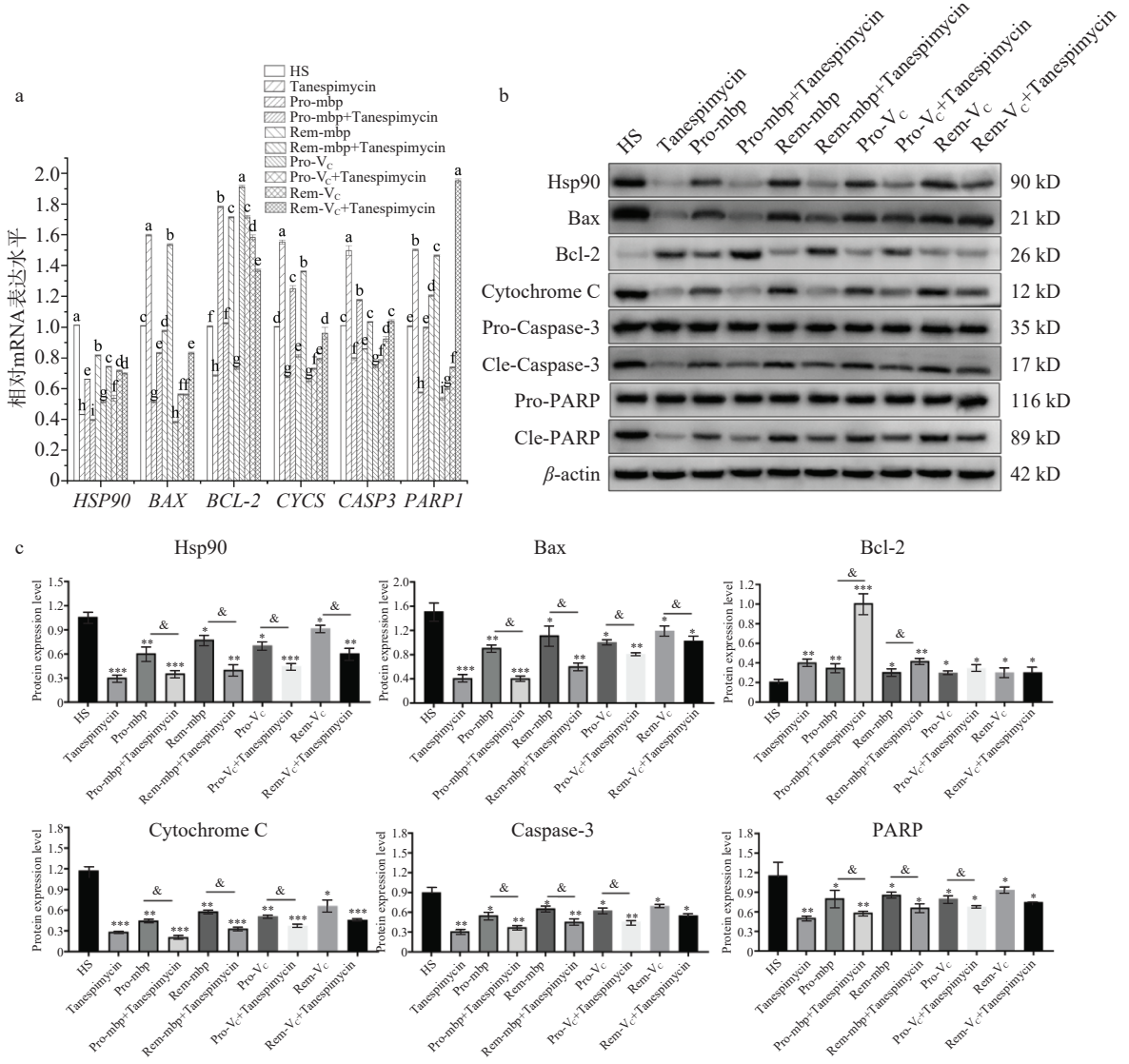



图 9　煮制 25 min 绿豆提取多酚对细胞内凋亡蛋白和 Hsp90 水平的影响

Fig.9　Effects of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on the levels of intracellular apoptotic protein and Hsp90

注: a.在添加 Tanespimycin 抑制剂到绿豆多酚中时, *HSP90* 和凋亡因子 mRNA 表达结果; b.Hsp90 和凋亡蛋白 Western blot 结果; c.通过 Image-Pro plus V6.0 软件对蛋白条带进行定量。

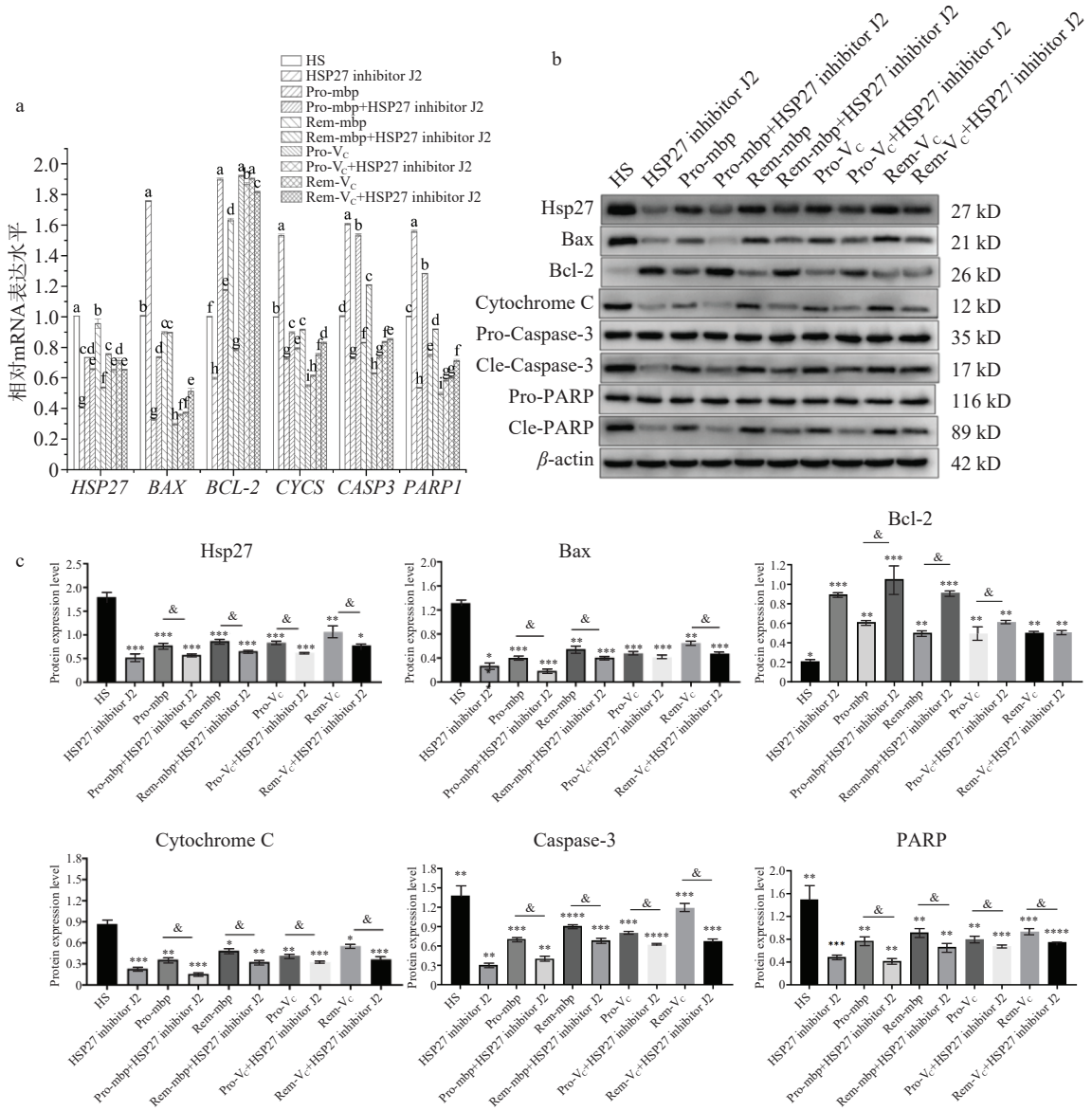



图 10 煮制 25 min 绿豆提取多酚对细胞内凋亡蛋白和 Hsp27 水平的影响

Fig.10 Effects of polyphenols extracted from mung bean after boiling for 25 min on the levels of intracellular apoptotic protein and Hsp27

注: a.在添加 HSP27 抑制剂 J2 到绿豆多酚中时, *HSP27* 和凋亡因子 mRNA 表达结果; b.Hsp27 和凋亡蛋白 Western blot 结果; c.通过 Image-Pro plus V6.0 软件对蛋白条带进行定量。

其高表达(不添加抑制剂时)则能有效抑制热应激诱导的细胞凋亡。Pro-mbp 和 Rem-mbp 组 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 表达水平低于 HS 组, 抑制热应激引起的细胞凋亡。这可能是由于煮制 25 min 绿豆多酚的干预降低了热应激对细胞的损伤, 使 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达水平维持在更适宜的范围, 从而保护细胞免受热应激诱导的凋亡。当煮制 25 min 绿豆多酚与抑制剂 VER-155008 或 Tanespimycin 或 HSP27 inhibitor J2 共同作用于热应激细胞时, 细胞内 Bax、Cytochrome C、Caspase-3 和 PARP1 的表达水平低于单独使用抑制剂时的表达水平; 而 Bcl-2 的表达水平高于单独使用, 这表明煮制 25 min 绿豆多酚通过调控 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达水平, 有效减轻了热应激诱导的细胞凋亡。此外, 本研究表明, 煮制 25 min 绿豆多酚通过下调 *HSP27*、*HSP70* 和 *HSP90* 在细胞中的 mRNA 转录水平, 进而调控其蛋白表达, 从而缓解热应激。这与 Yao 等[41]的研究结果相类似, 即抑制 Hsp90 功能能够减弱 Hsp90-Bcl-2 通路的激活, 从而加剧氧化应激和细胞损伤。综上所述, 煮制 25 min 绿豆多酚通过调节 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达水平, 能够有效缓解热应激诱导的细胞凋亡, 从而预防或改善热应激。

2.2.7 煮制 25 min 绿豆提取多酚通过降低 ROS 水平来调节热休克蛋白的表达和减轻凋亡 ROS 不仅调节细胞凋亡, 还影响热休克蛋白的表达[42]。煮制 25 min 绿豆多酚能够减轻热应激诱导的细胞凋亡, 降低细胞内 ROS 和热休克蛋白的表达, 这表明绿豆多酚可能通过改变 ROS 水平调节热休克蛋白和凋

亡蛋白的表达水平。因此，本研究通过添加 NAC 进一步研究其作用机制。如图 11a 所示，NAC 组中 *HSP27*、*HSP70*、*HSP90* 的 mRNA 及 Hsp27、Hsp70、Hsp90 蛋白表达水平分别显著低于 HS 组（$P$<0.05）。Pro-mbp+NAC 组和 Rem-mbp+NAC 组 *HSP27*、*HSP70*、*HSP90* 的 mRNA 和 Hsp27、Hsp70、Hsp90 蛋白表达水平分别低于 Pro-mbp 和 Rem-mbp 组，表明煮制 25 min 绿豆多酚不仅可以减少热应激诱导的 ROS 的产生，还可以抑制 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达。因此，煮制 25 min 绿豆多酚可通

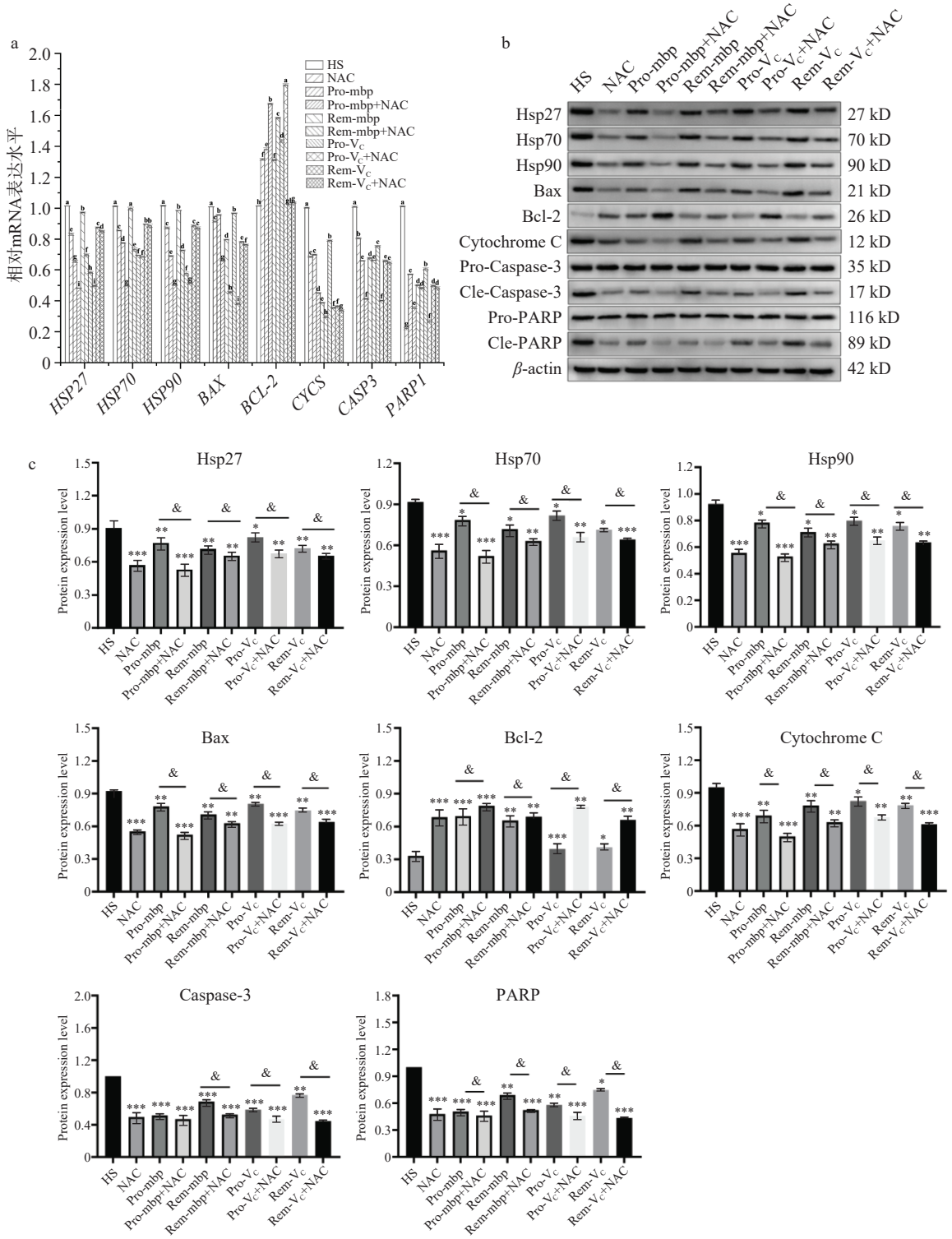



图 11　煮制 25 min 绿豆提取多酚通过降低细胞内 Hsp27、Hsp70、Hsp90 和凋亡蛋白的表达水平来预防和改善热应激

Fig.11　Polyphenols extracted from mung beans boiled for 25 min prevent and alleviate heat stress by reducing intracellular Hsp27, Hsp70, Hsp90 and apoptotic protein expression levels

注：a.使用 RT-qPCR 检测在 NAC 抑制剂处理的绿豆多酚中的 *HSP27*、*HSP70*、*HSP90* 和凋亡蛋白的表达水平；b.使用 Western blot 检测添加 NAC 抑制剂的绿豆多酚在预防和改善热应激中的 Hsp27、Hsp70、Hsp90 和凋亡蛋白条带；c.使用 Image-Pro Plus V6.0 软件定量确定添加 NAC 抑制剂后，绿豆多酚中 Hsp27、Hsp70、Hsp90 和凋亡蛋白的预防和改善效果。

过降低 ROS 水平来调节 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达。

NAC 还可以调控凋亡相关蛋白的表达。如图 11 所示，与 HS 组相比，NAC 组中 *BCL-2* mRNA 及 Bcl-2 的表达水平增加，而 *BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平以及 Bax、Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1 的蛋白质表达水平降低；与 Pro-mbp 和 Rem-mbp 组相比，Pro-mbp+NAC 和 Rem-mbp+NAC 组 *BCL-2* mRNA 及 Bcl-2 表达水平显著升高（$P<0.05$），而 *BAX*、*CYCS*、*CASP3* 和 *PARP1* 的 mRNA 表达水平以及 Cytochrome C、Cle-Caspase-3 和 Cle-PARP1 蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）。ROS 是调控细胞凋亡的重要因素，ROS 高表达可通过线粒体途径调节凋亡，而加入 NAC 则能有效抑制这一过程[43]。基于上述结果，可以推测煮制 25 min 绿豆多酚通过降低细胞内 ROS 水平来预防或改善热应激，抑制 Hsp27、Hsp70 和 Hsp90 的表达，从而减轻细胞凋亡。

## 3 结论

本研究通过对绿豆进行不同煮制时间处理，测定其多酚含量、抗氧化活性及单体酚组成，筛选出煮制 25 min 的绿豆提取多酚进行细胞实验。通过体外细胞模型，探究了煮制 25 min 绿豆提取多酚对人热应激的预防和改善作用，并阐明了其相关机制。研究发现，煮制 25 min 绿豆提取多酚（100 μg/mL）可通过降低细胞内 ROS 含量，抑制热休克蛋白（Hsp27、Hsp70 和 Hsp90）和凋亡蛋白表达，从而有效缓解热应激诱导的细胞凋亡。煮制 25 min 绿豆多酚缓解组的 ROS 荧光率和凋亡表达（163.48% 和 30.96%）高于煮制 25 min 绿豆多酚预防组（157.96% 和 11.58%）。与煮制 25 min 绿豆多酚缓解组相比，煮制 25 min 绿豆多酚预防组凋亡蛋白的表达较低。结果表明，煮制 25 min 绿豆多酚能够有效地预防和减轻热应激诱导的细胞凋亡，且其预防作用优于缓解作用。本研究为煮制加工绿豆多酚在调节热应激中的应用提供了理论依据。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

## 参考文献

[1] HU Yuan, LIN Ling, LIU Kehong, et al. L-Theanine alleviates heat stress-induced impairment of immune function by regulating the p38 MAPK signalling pathway in mice[J]. Food & Function, 2023, 14(1): 335−343.

[2] COTTLE R M, LICHTER Z S, VECELLIO D J, et al. Core temperature responses to compensable versus uncompensable heat stress in young adults (PSU HEAT Project)[J]. Journal of Applied Physiology, 2022, 133(4): 1011−1018.

[3] ARIFWIDODO S D, CHANDRASIRI O. Urban heat stress and human health in Bangkok, Thailand[J]. Environmental Research, 2020, 185: 109398.

[4] 梁雪梅. 加工方式对绿豆芽多酚抗氧化活性及理化特性的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2020. [LIANG Xuemei. Effeets of processing methods on antioxidant activity and physical and chemical properties of mung bean sprout polyphenols[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2020.]

[5] 孙菁茹, 张舒. 绿豆多酚的抗氧化特性分析[J]. 农产品加工, 2020(17): 56−59. [SUN Jingru, ZHANG Shu. Analysis of antioxidant properties of mung bean polyphenols[J]. Farm Products Processing, 2020(17): 56−59.]

[6] GIUSTI F, CAPRIOLI G, RICCIUTELLI M, et al. Analysis of 17 polyphenolic compounds in organic and conventional legumes by high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and evaluation of their antioxidant activity[J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2018, 69(5): 557−565.

[7] XIE Jianhua, DU Mengxia, SHEN Mingyue, et al. Physicochemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from mung bean (*Vigna radiate*)[J]. Food Chemistry, 2019, 270: 243−250.

[8] MEENU M, SHARMA A, GUHA P, et al. A rapid high-performance liquid chromatography photodiode array detection method to determine phenolic compounds in mung bean (*Vigna radiata* L.)[J]. International Journal of Food Properties, 2016, 19(10): 2223−2237.

[9] PAJĄK P, SOCHA R, GAŁKOWSKA D, et al. Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 300−306.

[10] HUSSAIN T, WANG Jing, MURTAZA G, et al. The role of polyphenols in regulation of heat shock proteins and gut microbiota in weaning stress[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 6676444.

[11] LI Chengmin, WANG Yiru, LI Lian, et al. Betaine protects against heat exposure-induced oxidative stress and apoptosis in bovine mammary epithelial cells via regulation of ROS production[J]. Cell Stress and Chaperones, 2019, 24(2): 453−460.

[12] LUSHCHAK V I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification[J]. Chemico-Biological Interactions, 2014, 224: 164−175.

[13] LIU Lili, FU Chenxing, YAN Mingli, et al. Resveratrol modulates intestinal morphology and HSP70/90, NF-κB and EGF expression in the jejunal mucosa of black-boned chickens on exposure to circular heat stress[J]. Food & Function, 2016, 7(3): 1329−1338.

[14] 张欢. 蒸煮方式对糙米多酚抗氧化性、淀粉酶和葡萄糖苷酶活性的影响研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2021. [ZHANG Huan. Effect of different cooking methods on antioxidant activities and amylase and glucoside activities of phenolic compounds in brown rice[D]. Shenyang: Shenyang Normal University, 2021.]

[15] 薛璐璐. 热处理方式对绿豆和奶白花芸豆抗营养因子的抑制作用研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2024. [XUE Lulu. Inhibitory effect of heat treatment on anti-nutritional factors of mung bean and milky white kidney bean[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2024.]

[16] 刘璐, 路飞, 傅靖晗, 等. 不同蒸煮条件对糙米多酚含量及抗氧化活性的影响[J]. 农业科技与装备, 2019(3): 47−49. [LIU Lu, LU Fei, FU Jinghan, et al. Effects on polyphenol contents and antioxidant activity of brown rice under different cooking conditions[J]. Agricultural Science & Technology and Equipment, 2019(3): 47−49.]

［17］ 曾子聪. 挤压加工对糙米多酚及其抗氧化性影响的研究［D］. 南昌：南昌大学, 2019. ［ZENG Zicong. Study on influence of extrusion processing on phenolic compounds and antioxidant activity of brown rice［D］. Nanchang: Nanchang University, 2019.］

［18］ SWANK G M, LU Q, XU D Z, et al. Effect of acute-phase and heat-shock stress on apoptosis in intestinal epithelial cells (Caco-2)［J］. Critical Care Medicine, 1998, 26(7): 1213−1217.

［19］ PARDO Z, SEIQUER I. Supplemental Zinc exerts a positive effect against the heat stress damage in intestinal epithelial cells: Assays in a Caco-2 model［J］. Journal of Functional Foods, 2021, 83: 104569.

［20］ FENG Yuchao, FAN Xia, SUO Dengcheng, et al. Screening of heat stress-regulating active fractions in mung beans［J］. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1102752.

［21］ ZHANG Shu, FENG Yuchao, FU Tianxin, et al. Effect of processing on the phenolics content and antioxidant properties of mung bean［J］. Cereal Chemistry, 2021, 98(2): 355−366.

［22］ 盛亚男, 王长远, 张舒, 等. 绿豆多酚提取工艺优化及抗氧化活性研究［J］. 食品与机械, 2019, 35(10): 193−196. ［SHENG Yanan, WANG Changyuan, ZHANG Shu, et al. Optimization of extraction process of mung bean polyphenols and antioxidant properties［J］. Food & Machinery, 2019, 35(10): 193−196.］

［23］ SHAO Yafang, BAO Jinsong. Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits［J］. Food Chemistry, 2015, 180: 86−97.

［24］ 吴彤, 盛亚男, 田禹, 等. 绿豆多酚的提取纯化、成分鉴定及抗氧化活性研究［J］. 中国粮油学报, 2024, 39(11): 96−104. ［WU Tong, SHENG Yanan, TIAN Yu, et al. Detection of antioxidant activity and composition identification of mung bean polyphenols after extraction and purification［J］. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(11): 96−104.］

［25］ YAP J Y, HII C L, ONG S P, et al. Effects of drying on total polyphenols content and antioxidant properties of *Carica papaya* leaves［J］. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(7): 2932−2937.

［26］ KIANI H S, AHMAD W, NAWAZ S, et al. Optimized extraction of polyphenols from unconventional edible plants: LC-MS/MS profiling of polyphenols, biological functions, molecular docking, and pharmacokinetics study［J］. Molecules, 2023, 28(18): 6703.

［27］ HE Y, PENG L, XIONG H, et al. The profiles of durian (*Durio zibethinus* Murr.) shell phenolics and their antioxidant effects on $H_2O_2$-treated HepG2 cells as well as the metabolites and organ distribution in rats［J］. Food Research International, 2023, 163: 112122.

［28］ ZHANG B, DENG Z, TANG Y, et al. Effect of domestic cooking on carotenoids, tocopherols, fatty acids, phenolics, and antioxidant activities of lentils (*Lens culinaris*)［J］. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(52): 12585-12594.

［29］ HEFNAWY T H. Effect of processing methods on nutritional composition and anti-nutritional factors in lentils (*Lens culinaris*)［J］. Annals of Agricultural Sciences, 2011, 56(2): 57−61.

［30］ 刘婷婷. 不同加工方式对杂豆酚类物质及其抗氧化性的影响［D］. 大庆：黑龙江八一农垦大学, 2019. ［LIU Tingting. Effects of different processing methods on phenolic substances and antioxidant activities of beans［D］. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019.］

［31］ 陈成, 胡端阳, 陈然, 等. 煮制用水对红小豆汤抗氧化性的影响［J］. 食品科技, 2013, 38(3): 61−66. ［CHEN Cheng, HU Duanyang, CHEN Ran, et al. Effect of different cooking water on antioxidant activity of adzuki bean soup［J］. Food Science and Technology, 2013, 38(3): 61−66.］

［32］ BOUKHANOUF S, LOUAILECHE H, PERRIN D. Phytochemical content and *in vitro* antioxidant activity of faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by maturity stage and cooking practice［J］. International Food Research Journal, 2016, 23: 954−961.

［33］ RANDHIR R, KWON Y I, SHETTY K. Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings［J］. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(3): 355−364.

［34］ WANG F, HUANG L, YUAN X, et al. Nutritional, phytochemical and antioxidant properties of 24 mung bean (*Vigna radiate* L.) genotypes［J］. Food Production, Processing and Nutrition, 2021, 3: 1−12.

［35］ QIU Jia, WU Renbo, LONG Yali, et al. Role of Fe, transferrin and transferrin receptor in anti-tumor effect of vitamin C［J］. Cancers, 2022, 14(18): 4507.

［36］ YIN Bin, LIAN Ruirui, LI Zhen, et al. Tea polyphenols enhanced the antioxidant capacity and induced hsps to relieve heat stress injury［J］. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 9615429.

［37］ CHU Qingfei, GU Xinyu, ZHENG Qiuxian, et al. Mitochondrial mechanisms of apoptosis and necroptosis in liver diseases［J］. Analytical Cellular Pathology, 2021, 2021(1): 8900122.

［38］ DENG Yuan, LI Xudan, LI Xuan, et al. Corilagin induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through the mitochondrial apoptotic and death receptor pathways［J］. Oncology Reports, 2018, 39(6): 2545−2552.

［39］ ZHAO Heng, YENARI M A, CHENG Danye, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity［J］. Journal of Neurochemistry, 2003, 85(4): 1026−1036.

［40］ SZYLLER J, BIL-LULA I. Heat shock proteins in oxidative stress and ischemia/reperfusion injury and benefits from physical exercises: A review to the current knowledge［J］. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021(1): 6678457.

［41］ YAO Xu, ZHU Jie, LI Lin, et al. Hsp90 protected chicken primary myocardial cells from heat-stress injury by inhibiting oxidative stress and calcium overload in mitochondria［J］. Biochemical Pharmacology, 2023, 209: 115434.

［42］ ABDELNOUR S A, SWELUM A A, ABD EL-HACK M E, et al. Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals［J］. Journal of Thermal Biology, 2020, 92: 102688.

［43］ ZHANG Tong, LI Shumei, LI Yannan, et al. Atractylodin induces apoptosis and inhibits the migration of A549 lung cancer cells by regulating ROS-mediated signaling pathways［J］. Molecules, 2022, 27(9): 2946.