

苹果皮果胶多糖的理化性质以及抑制人结肠癌细胞 HT-29 增殖活性的初步研究*

张英,段双艳,刘洋,程洋,潘丽英,王仲孚

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,
陕西省生物技术重点实验室,陕西 西安, 710069)

摘 要 用水、质量分数 0.5% 草酸铵溶液、0.05 mol/L HCl 溶液、1 mol/L KOH 溶液从苹果皮中提取得到 4 种果胶多糖,分别是水溶性果胶多糖(WSP)、盐溶性果胶多糖(CSP)、酸溶性果胶多糖(ASP)和碱溶性果胶多糖(BSP)。测定了它们的总糖、糖醛酸和蛋白含量以及相对分子质量、单糖组成及摩尔比和红外光谱;并初步研究了 4 种苹果皮果胶多糖对人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞生长的抑制作用。结果显示:WSP、CSP、ASP 和 BSP 的相对分子质量均大于 4.0×10^5 Da;气相色谱测定 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的单糖组成及摩尔比,4 种果胶多糖均含有半乳糖,而 CSP 所含的半乳糖醛酸含量最多,BSP 不含半乳糖醛酸。WSP、CSP、ASP 和 BSP 都能抑制人结肠腺癌细胞系 HT-29 细胞的增值,CSP 的抑制活性最高(35.65%),BSP 的抑制活性最低(10.30%),初步分析可能与苹果皮果胶多糖中半乳糖及半乳糖醛酸残基的含量相关。

关键词 苹果皮果胶多糖,系列提取,理化性质,HT-29 细胞,抗肿瘤

果胶多糖是种酸性杂多糖,是植物细胞壁的主要组成成分,在生物体内对细胞和组织起着支撑、固定细胞形态、软化和细胞黏合等作用;在食品工业中可用作增稠剂、胶凝剂、乳化剂和稳定剂等^[1-2];还具有抗炎、抗肿瘤(可有效抑制结肠腺瘤及腺癌)等活性^[3]。

果胶多糖的结构主要可分为半乳糖醛酸聚糖(homogalacturonans, HG)、鼠李半乳糖醛酸聚糖-I(rhamnogalacturonans, RG-I)和鼠李半乳糖醛酸聚糖-II(Rhamnogalacturonans, RG-II)三大类。这三大类多糖又可以相互共价或非共价结合,形成更为复杂的果胶多糖分子结构^[4]。果胶多糖在不同的植物、组织分布和发育阶段,其侧链中残基的种类、含量和连接方式以及其取代基的修饰情况都有一定变化,体现出果胶多糖在结构上的多样性。果胶多糖的结构变化,包括糖残基的种类和含量、酯化程度等决定了果胶多糖的生理活性和应用。因此,研究不同来源的果胶多糖的化学结构及其生物化学性质很重要^[5]。

目前,国内外提取果胶多糖的方法很多,常用的几种是:水提取法^[6]、酸提取法^[7]、碱提取法^[6]、草酸铵提取法^[8]、微波辅助提取法^[9]、离子交换树脂法^[10]

及酶法^[11-12]等。但是利用传统的方法提取果胶多糖,得到的果胶种类比较单一,很难全面评价其理化性质和生物活性,限制了果胶多糖的应用。

已有文献报道利用系列提取的方法从同一原料中提取性质和功能具有差异的果胶多糖。Prabasari 等^[13]利用 NaOAc、CDTA、Na₂CO₃、1 mol/L KOH 和 4 mol/L KOH 系列提取的方法分别从柑橘残渣中提取出几种不同的果胶多糖;Rombouts^[14]等利用水、草酸盐、酸和碱系列提取的方法从甜菜浆中分离得到 4 种不同的果胶多糖;Emaga 等^[15]利用水、草酸铵和 HCl 分别从香蕉和车前草皮中系列提取得到 3 种果胶多糖;Zhang^[6]等利用同种方法从美人蕉残渣中提取出 3 种性质有所差异的果胶多糖。但是,这种系列提取的方法至今还未应用于苹果皮果胶多糖的分离制备。为了提高苹果皮中果胶多糖的利用率及探明苹果果胶多糖结构与抗肿瘤功能之间的关系,本研究利用水、质量分数 0.5% 草酸铵溶液、0.05 mol/L HCl 溶液、1 mol/L KOH 溶液,从苹果皮中系列提取出 4 种性质和功能具有差异的苹果皮果胶多糖,分别对其部分物理化学性质和结构进行了较为系统地研究,并初步研究了这些苹果皮果胶多糖对人结肠腺癌细胞 HT-29 增殖的抑制作用。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

第一作者:博士,讲师(王仲孚教授为通讯作者,E-mail:wangzhf@nww.edu.cn)。

* 国家自然科学基金项目(31071506)

收稿日期:2013-05-09,改回日期:2013-07-12

陕西礼泉产红富士苹果;人结肠癌细胞株(HT-29,购自中国科学院上海细胞所)。

鼠李糖(*D*-Rha)、岩藻糖(*D*-Fuc)、阿拉伯糖(*D*-Ara)、木糖(*D*-Xyl)、甘露糖(*D*-Man)、葡萄糖(*D*-Glc)和半乳糖(*D*-Gal)为上海国药集团产品;葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖醛酸(GalA)、鸡蛋白蛋白(albumin)、考马斯亮蓝、胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)为Sigma产品;葡聚糖分子量标准品为Fluka产品;培养液RP-MI-1640和胎牛血清(FBS)购自Gibco BRL公司;青霉素钠、硫酸链霉素为华北制药厂产品;三氟乙酸(TFA)、二甲基亚砜(DMSO)为天津百事化工有限公司产品;PBS缓冲液为博士德生物工程公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Shimadzu GC 2010 型气相色谱仪(GC),配置FID检测器,色谱柱为rtx-50(30 m×0.32 mm×0.25 μm);Water 2996-高效液相色谱仪(HPLC),配置2414 示差折光检测器;Eppendorf centrifuge 5418 离心机;Lambda 25 UV/VIS 型(Perkin Elmer)紫外分光光度计;HF 151UV 型 CO₂ 培养箱;LL 3000 型(Heto)真空冷冻干燥;SW-CJ 净化工作台;Mode 1680 型酶标分析仪;Bruker EQUINOX 55 型傅立叶红外光谱仪;T-214 型精密电子天平;CMD-20X 型智能型电热恒温鼓风干燥箱;RE 52-A 型旋转蒸发器。

1.3 苹果皮果胶多糖的提取^[5,14-15]

新鲜的苹果皮用去离子水清洗3次,90℃水浴处理10~15 min,使果皮中的酶失去活性;过滤处理过的苹果皮,用温水漂洗几次(3次),以除去溶出的糖类、色素及其他杂质^[16],真空干燥箱中70℃恒温干燥,粉碎后制成苹果皮粉备用。

苹果皮粉20 g,加入600 mL水,在80℃下提取2次,各1 h,提取过程中不时加入1 mol/L NaOH调pH值至5。将上述提取液离心,分离上清和残渣,残渣备用;将离心所得上清液合并,后旋转蒸发器减压浓缩;Savage法除蛋白;后在1 L去离子水中透析48 h,冷冻干燥得到水溶性果胶多糖(water-soluble pectin, WSP)。在上述残渣中加入600 mL 0.5%的草酸铵溶液(pH 5.0),80℃提取2次,每次1 h;离心,合并上清液,减压浓缩,Savage法除蛋白,冷冻干燥得盐溶性果胶多糖(chelate-soluble pectin, CSP);将草酸铵处理后的残渣平均分为2份,分别加入300 mL 0.5 mol/L的HCl和300 mL 1 mol/L的KOH溶液,各自80℃提取2次(每次1 h),离心,合并上清液,浓缩,

Savage法除蛋白,冷冻干燥得酸溶性果胶多糖(acid-soluble pectin, ASP)和碱溶性果胶多糖(base-soluble pectin, BSP)。分别计算得率。

1.4 苹果皮果胶多糖总糖、糖醛酸及蛋白质含量的测定

苹果皮果胶多糖的总糖、糖醛酸及蛋白质含量分别采用苯酚-硫酸法^[17]、咔唑硫酸法^[18-19]及Bradford法^[20]进行测定。分别以Glc, GalA及Albumin作为标准。

1.5 苹果皮果胶多糖的糖组成分析

糖组成分析采用GC进行,衍生和检测条件参照文献[16-17],略作改动。

具体衍生化实验操作为:称取干燥多糖样品2 mg,置于反应瓶中,加入2 mL浓度为2 mol/L的TFA,封口密闭,于120℃条件下水解2 h,旋转蒸发器减压抽干。再加入2 mL甲醇,充分振荡,旋转蒸发器减压抽干,重复3次。后按照Lehrfeld^[21]的方法进行衍生化反应,采用GC检测样品中的单糖组成。GC色谱分析条件:毛细管色谱柱,型号为rtx-50(30.0 m×0.25 mm×0.25 μm);程序升温过程为:180℃保留2 min,以6℃/min的速度提温至210℃,然后以0.3℃/min的速度提升至215℃,最后再以6℃/min提升至240℃,保留30 min;进样口温度为270℃,检测器温度是280℃;分流比是19:1;载气为氮气/空气;柱流速为0.88 mL/min;压力为110 kPa;进样量为2.0 μL。

1.6 苹果皮果胶多糖的相对分子质量测定

苹果皮果胶多糖的相对分子质量测定采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)进行。

HPLC(Waters 2695)配有TSK-Gel G4000SW色谱柱(7.5 mm×300 mm)和2414示差折光检测器。其原理是利用高效分子排阻色谱法测定果胶的分子质量。HPGPC分析条件:标准品及样品浓度均为2 g/L,磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L, pH 6.0)作为洗脱液;进样量为20 μL;流速为0.5 mL/min;柱箱温度和检测器温度均设为30℃。先将Dextran标准品按分子质量由小到大(1 000、5 000、12 000、25 000、80 000和150 000 Da)的顺序,依次进样,测定保留时间;后对4种苹果皮果胶多糖样品依次进样,测定保留时间。以Dextran标准品的分子量对数lg *M_w*对色谱柱上的保留时间 t_R 做标准曲线,根据样品的保留时间和回归方程,计算样品的相对分子质量范围。

1.7 苹果皮果胶多糖的红外光谱(IR)分析

苹果皮果胶多糖红外光谱(IR)分析采用傅立叶红外光谱仪进行。称取干燥苹果皮果胶多糖 2 mg, 与 300 mg 干燥的溴化钾(KBr)粉末压成薄片, 上机测定, 于 $4\ 000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ 内进行扫描。

1.8 苹果皮果胶多糖对 HT-29 细胞增殖的抑制作用

运用 MTT 法测定苹果皮果胶多糖对肿瘤细胞的增殖抑制率^[23]。HT-29 细胞以 RPMI 1640 完全培养液培养, 内含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素以及 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养。收集处于对数生长期的 HT-29 细胞, 以完全培养液调整细胞悬液浓度为 1×10^4 个/mL, 每孔加入 200 μL 细胞悬液接种于 96 孔板, 孵育 24 h。实验设苹果皮果胶多糖处理组(5 个浓度梯度), 空白对照组和调零组。4 种苹果皮果胶多糖的浓度分别为: 5000、500、50、5 和 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (溶解于完全培养液中)。对照组只加完全培养液 200 μL , 调零组不加细胞只加入完全培养液 200 μL 。将苹果皮果胶多糖以不同的浓度加入 96 孔板中与细胞孵育, 每孔加入 200 μL ; 每组设置 5 个复孔。加入多糖后, 继续孵育 48 h; 后每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 继续培养 4 h。吸除培养液, 终止培养, 每孔加入 150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪测量各孔的 OD 值, 检测波长为 490 nm, 重复测定 3 次, 计算平均值。按以下公式计算细胞存活率和细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞存活率}/\% = [(\text{实验组 OD 值} - \text{调零组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{调零组 OD 值})] \times 100$$

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - \text{细胞存活率}$$

2 结果与分析

2.1 苹果皮果胶多糖的提取

粉碎干燥的苹果皮经过水、0.5% 草酸铵溶液、0.05 mol/L HCl 溶液、1.00 mol/L KOH 溶液系列提取, 得到 4 种不同的苹果皮果胶多糖: 分别为水溶性果胶多糖 WSP、盐溶性果胶多糖 CSP、酸溶性果胶多糖 ASP 和碱溶性果胶多糖 BSP。制备流程如图 1 所示。果胶多糖组分的得率分别为 3.49% (WSP)、5.23% (CSP)、2.77% (ASP)、2.35% (BSP)。

2.2 总糖、糖醛酸及蛋白含量的测定

对 WSP、CSP、ASP 和 BSP 4 种果胶多糖的总糖、糖醛酸及蛋白含量进行了测定, 其结果如表 1 所示。

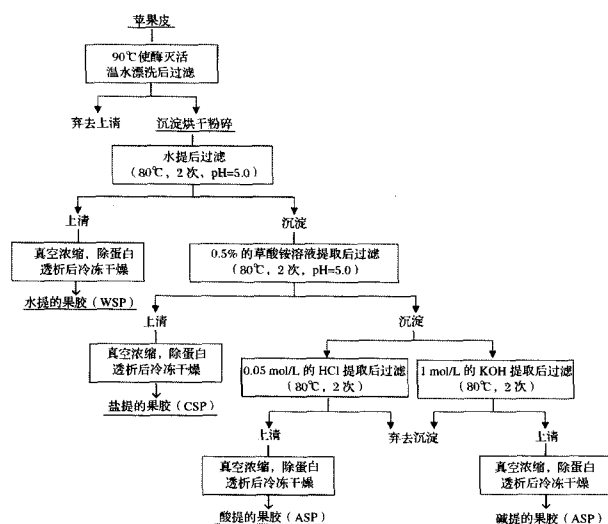


图 1 苹果皮果胶多糖系列提取流程图

Fig. 1 Scheme for serial extraction of pectic polysaccharides from apple peel

表 1 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的总糖、糖醛酸及蛋白含量分析
Table 1 Analysis of total sugar, uronic acid and protein contents in WSP, CSP, ASP and BSP

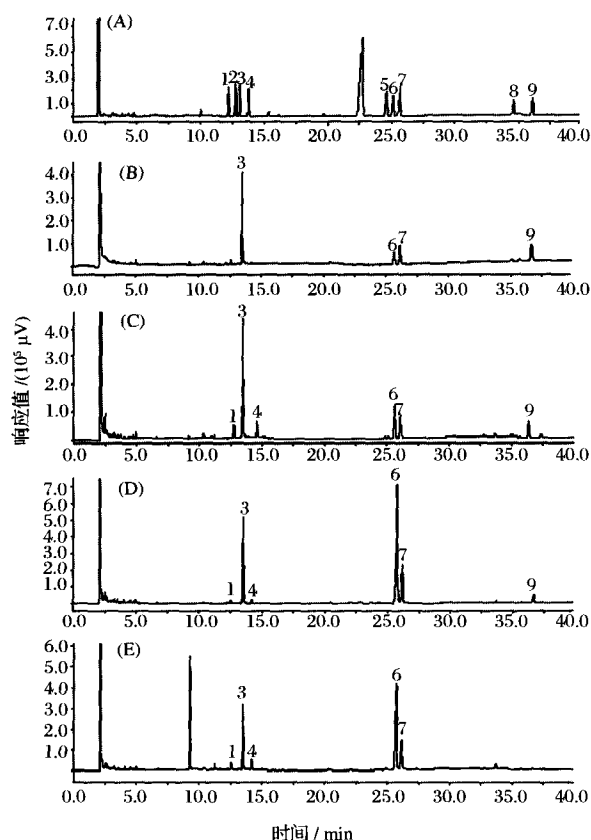
果胶多糖	WSP	CSP	ASP	BSP
总糖含量/%	85.00	96.20	83.48	80.15
糖醛酸含量/%	7.30	24.51	15.72	0
蛋白含量/%	2.58	0.41	1.48	6.45

如表 1 所示, 0.5% 草酸铵提取的 CSP 总糖和糖醛酸含量都高于 WSP、ASP 和 BSP, 主要是由于其蛋白含量最低; 而由 KOH 提取得到的 BSP 不含糖醛酸, 但蛋白质含量高于 WSP、CSP 和 ASP, 达到了 6.45%, 因而其糖含量要低于其他 3 种多糖。结果显示, 这 4 种多糖化学组成有一定差别, CSP 含有高含量的糖醛酸, 因而推测其主要是一种果胶类物质, ASP 结构类型与其类似, 但糖醛酸含量偏低; 而 WSP 则主要由中性糖组成, 含有少量糖醛酸; BSP 则全部由中性糖组成^[24]。

2.3 WSP、CSP、ASP 和 BSP 苹果皮果胶多糖的单糖组成分析

采用 GC 同时检测中性糖和糖醛酸的方法^[21], 对 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的单糖组成进行了测定, 结果如图 2 所示。

GC 结果表明, WSP 和 ASP 由 Rha、Ara、Xyl、Glc、Gal 和 GalA 6 种单糖所组成, 糖组成摩尔比分别为: 1.51:58.5:2.13:19.51:11.88:6.44 和 1.11:23.28:1.4:16.51:14.14:13.56; CSP 由 Ara、Glc、Gal 和 GalA 4 种单糖组成, 糖组成摩尔比为: 54.61:9.81



1 - 鼠李糖 (Rha); 2 - 岩藻糖 (Fuc); 3 - 阿拉伯糖 (Ara); 4 - 木糖 (Xyl); 5 - 甘露糖 (Man); 6 - 葡萄糖 (Glc); 7 - 半乳糖 (Gal); 8 - 葡萄糖醛酸 (GlcA); 9 - 半乳糖醛酸 (GalA)

图2 GC法分析4种苹果皮果胶多糖 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的单糖组成

注: (A) 9种单糖标准的 GC 图谱; (B) WSP 的单糖组成 GC 图谱; (C) CSP 的单糖组成 GC 图谱; (D) ASP 的单糖组成 GC 图谱; (E) BSP 的单糖组成 GC 图谱

Fig. 2 Monosaccharide composition analysis of four apple pectins WSP, CSP, ASP and BSP by GC

: 13.43:22.16, 所含的 GalA 在 4 种苹果皮果胶多糖中最多; BSP 的糖组成为 Rha、Ara、Xyl、Glc、Gal, Rha、Ara、Xyl、Glc、Gal, 摩尔比为 3.15:28.33:4.51:49.70:14.32, 不含 GalA, 详见表 2。

表2 WSP, CSP, ASP 和 BSP 的单糖组成分析 %

Table 2 Monosaccharide compositions of WSP, CSP, ASP and BSP %

	WSP	CSP	ASP	BSP
鼠李糖 (Rha)	1.51	0	1.11	3.15
阿拉伯糖 (Ara)	58.50	54.61	23.28	28.33
木糖 (Xyl)	2.13	0	1.40	4.51
葡萄糖 (Glc)	19.51	9.81	16.51	49.70
半乳糖 (Gal)	11.88	13.43	14.14	14.32
半乳糖醛酸 (GalA)	6.44	22.16	13.56	0

2.4 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的分子量测定

线性回归方程为: $\lg M_w = 7.35691 - 0.10046t_R$, $R^2 = 0.9995$ ($n = 4$)。4 种果胶多糖在 TSK-Gel G4000SW 柱上的保留时间分别为: WSP (16.362 min)、CSP (16.556 min)、ASP (16.278 min)、BSP (16.241 min), 都超过了线性范围, 被凝胶柱排阻, 所以 4 种果胶多糖的相对分子质量都大于 4.0×10^5 u。

2.5 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的红外光谱分析

4 种苹果皮果胶多糖 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的红外光谱图如图 3 所示。

结果表明, 4 种苹果皮果胶多糖都具有多糖的特征吸收峰, 所有样品都在 $3620 \sim 3020 \text{ cm}^{-1}$ 和 $3000 \sim 2800 \text{ cm}^{-1}$ 处有吸收峰, 分别为 -OH 的伸缩振动和糖类 -CH_2 或 -CH_3 的 C-H 伸缩振动^[25], $1620 \sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1440 \sim 1395 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1400 \sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别为 C=O 的非对称伸缩振动、 C-O 伸缩振动、 C=O 对称伸缩振动, $1320 \sim 1210 \text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 -OH 变角振动。几种苹果皮果胶多糖在 1151.64 cm^{-1} 、 1025.04 cm^{-1} 左右处都有吸收峰, 为吡喃型糖的特征吸收峰, 是其糖苷键的 C-O-C 的非对称振动峰^[26-27]。ASP、CSP 和 WSP 3 种苹果皮果胶多糖在 $1750 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 处有特征吸收峰, 为糖醛酸的特征吸收峰, 而 BSP 在此范围内没有特征吸收峰^[28], 不含糖醛酸, 该结果与单糖组成的测定结果一致。

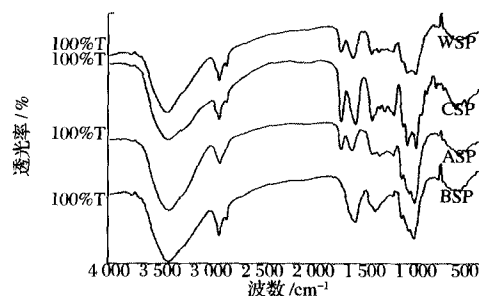


图3 四种果胶多糖 WSP、CSP、ASP 和 BSP 的红外图谱

Fig. 3 FTIR spectra of four apple pectins WSP, CSP, ASP and BSP

2.6 WSP、CSP、ASP 和 BSP 对 HT-29 细胞增值的抑制作用

MTT 法检测苹果皮果胶多糖对 HT-29 细胞的增值抑制作用, 结果如表 3 所示。

表3 WSP、CSP、ASP 和 BSP 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用

Table 3 Effects of apple pectin polysaccharides WSP, CSP, ASP and BSP on the growth of HT-29 cells

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%	存活率/%
空白	0	0	100
WSP	5 000	19.93 * *	80.07
	500	15.61 * *	84.39
	50	11.96 * *	88.04
	5	9.63 *	90.07
	0.5	2.82	97.18
CSP	5 000	35.65 * *	64.35
	500	19.63 * *	80.37
	50	9.09 *	90.91
	5	8.55 *	91.45
	0.5	5.32 *	94.68
ASP	5 000	27.11 * *	72.89
	500	19.20 * *	80.80
	50	15.49 * *	84.51
	5	6.60 *	93.40
	0.5	5.79 *	94.21
BSP	5 000	10.30 * *	89.70
	500	7.61 *	92.39
	50	6.60 *	83.40
	5	9.72 *	92.28
	0.5	5.48 *	94.52

注: * 表示与空白组比较 $P < 0.05$, * * 表示与空白组相比较 $P < 0.01$, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示 2 组间具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示 2 组间具有极显著性差异。

结果表明, WSP、CSP 和 ASP 在不同浓度下对 HT-29 细胞都有一定的抑制作用, 并且抑瘤活性都呈现出剂量依赖性。当浓度为 $5\,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CSP 的抑制率为 35.65%, ASP 为 27.11%, WSP 为 19.93%, 而 BSP 的抑制率只有 10.3%, 与对照组相比都具有显著差异 ($P < 0.01$)。已有文献报道柑橘来源的果胶多糖(含有半乳糖苷), 能够特异性的与 gal-3 相结合, 通过调节 gal-3 的表达发挥抑瘤的作用。WSP、CSP、ASP 和 BSP 对结肠癌细胞的增殖抑制作用的不同, 可能与其含有的半乳糖和半乳糖醛酸的含量有关, CSP 中包含的 Gal 及 GalA 残基最多, 其次分别是 ASP、WSP 和 BSP, 该结果符合文献报道的果胶多糖抑制肿瘤细胞生长的机制。

3 结论

通过水提、盐提、酸提、碱提等一系列提取方法从苹果皮中连续提取得到 4 种不同的苹果皮果胶多糖 WSP、CSP、ASP 和 BSP, 对它们的部分物理化学性质和抗肿瘤活性进行了较为系统的研究。结果发现,

CSP 的总糖含量和糖醛酸含量都高于其他 3 种苹果皮果胶多糖; WSP 和 ASP 由 Rha、Ara、Xyl、Glc、Gal 和 GalA 6 种单糖所组成; CSP 由 Ara、Glc、Gal 和 GalA 4 种单糖组成; CSP 中所含的 GalA 在几种苹果果胶多糖中最多, 占到了 22.16%; BSP 只由 Rha、Ara、Xyl、Glc 和 Gal 所组成, 不含 GalA。WSP、CSP、ASP 和 BSP 均具有抑制 HT-29 肿瘤细胞增值的活性, 并且呈浓度依赖性; 在高浓度作用时 ($5\,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$), CSP 的抑制活性最高 (35.65%), 而 BSP 的抑制活性最低 (10.3%)。CSP 中包含的 Gal 及 GalA 残基最多, 依次分别是 ASP、WSP 和 BSP, 这符合文献报道的果胶多糖抑制肿瘤细胞生长的机制, 富含半乳糖苷的果胶多糖可能直接影响 gal-3 的表达, 从而抑制肿瘤细胞的生长。4 种苹果皮果胶多糖对结肠癌细胞的增殖抑制作用的不同, 可能与其含有的半乳糖和半乳糖醛酸的含量有关。本研究补充和丰富了苹果皮果胶多糖的提取方法, 提高了苹果皮的利用率, 也为其他果皮或果渣中果胶多糖的提取及再利用提供了一种可靠方法。苹果皮果胶多糖的结构与其抑制结肠癌细胞 HT-29 增殖的相关性机制, 还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shen H, He L, Price R L, et al. Dietary soluble fiber lowers plasma LDL cholesterol concentrations by altering lipoprotein metabolism in female guinea pigs [J]. Journal of Nutrition. 1998, 128: 1 434 - 1 441.
- [2] Adiarov D, Pentieva K, Ivanova L, et al. Influence of dietary pectin on the hepatic levels of reduced glutathione and on lipid peroxide formation in mice [J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 1995, 18: 127 - 132.
- [3] Hayashi A, Gillen A C, Lott J R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon - 25 tumor growth in Balb-c mice [J]. Alternative Therapies in Health and Medicine, 2000, 5: 546 - 552.
- [4] O'neill M, Albersheim P, Darvilli A. The pectic polysaccharides of primary cell walls [M]. London: Academic Press, 1990: 415 - 441.
- [5] Zhang J, Wang Z W, Yu W J. Pectins from canna edulis ker residue and their physicochemical characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83: 210 - 216.
- [6] Oosterveld A, Beldman G, Schols H A, et al. Arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides extracted from sugar beet pulp [J]. Carbohydrate Research, 1996 (288): 143 - 153.
- [7] Gunter E A, Popeiko O V, Ovodov Y S. Isolation of polysaccharides from the callus culture of *Lemna minor* L [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2004 (40): 80 - 83.
- [8] Sirisomboon P, Tanaka M, Fujita S, et al. A simplified

- method for the determination of total oxalate-soluble pectin content in japanese pear [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2001, 14: 83–91.
- [9] Bagherian H, Ashtiani F Z, Fouladitajar A, et al. Comparisons between conventional, microwave-and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit [J]. Chemical Engineering and Processing, 2011, 50: 1237–1243.
- [10] 张燕, 毛桂枝, 刘蕴哲. 离子交换树脂法提取橘皮中的果胶多糖 [J]. 食品研究与开发, 2003, 8(24): 52–54.
- [11] Ptichkina N M, Markian O A, Rumyantseva G N. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22: 192–195.
- [12] Rumyantseva G N. Microbial enzymes in pectin production [J]. Vestnic Russian Academy of Agricultural Science, 1993, 3: 68–80.
- [13] Prabasari I, Pettolino F, Liao M L. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 484–494.
- [14] Rombuts F M, Thibault J F. Chemistry and functions of pectins [M]. Washington: American Chemical Society, 1986: 49–60.
- [15] Emaga T H, Robert C, Sebastien N R, et al. Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties [J]. Biore-source Technology, 2008, 99: 4346–4354.
- [16] 徐溪, 黄琳娟, 王仲孚, 等. 苹果果胶多糖活性寡聚半乳糖醛酸的分离制备及其 ESI-MS 分析研究 [J]. 化学学报, 2010, 15(68): 1 525–1 531.
- [17] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994: 324–326.
- [18] Yeoh S, Shi J, Langrish T A G. Comparisons between different techniques for water-based extracted of pectin from orange peels [J]. Desalination, 2008, 218: 229–237.
- [19] 梅新, 木泰华, 郭庆. 甘薯果胶多糖的乳化特性研究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2 759–2 766.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein using the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 48–54.
- [21] Lehrfeld J. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of aldonic acids and Aldoses [J]. Analytical Chemistry, 1985, 57: 346–347.
- [22] Cerna M, Barros A S, Nunes A, et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 51(4): 383–389.
- [23] Tomatsu M, Ohnishi-kameyama M, Shibamoto N. Aralin, a new cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells [J]. Cancer Letter, 2003, 199: 19–25.
- [24] 孙元琳. 当归多糖的制备、结构分析和抗辐射效应研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [25] 杨翠娟, 李清彪, 凌雪萍, 等. 应用微波前处理-热水浸提技术提取龙眼多糖 [J]. 化工学报, 2007, 58(8): 2004–2009.
- [26] Kumar A, Chauhan G S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82: 454–459.
- [27] Zhao G H, Kan J Q, Li Z X et al. Structural features and immunological activity of apolysaccharide from *dioscorea opposita* thunb roots [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 61: 125–131.
- [28] 宫雪, 丁黎, 司敏达, 等. 植物多糖组分中糖醛酸的分析技术及其应用 [J]. 2007, 11(31): 496–501.

Study on physicochemical properties of apple peel polysaccharides and its inhibitory activities against HT-29 cells *in vitro*

ZHANG Ying, DUAN Shuang-yan, LIU Yang, CHENG Yang,
PAN Li-ying, WANG Zhong-fu

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT In the present study, four components of apple pectins: water-soluble pectin (WSP), chelate-soluble pectin (CSP), acid-soluble pectin (ASP) and base-soluble pectin (BSP), were extracted from apple peel by water, 0.5% ammonium oxalate, 0.05 mol/L HCl and 1 mol/L KOH, respectively. Their physicochemical properties, including monosaccharide composition with corresponding molar ratio, sugar content, uronic acid content, protein content, relative molecular weight and FTIR spectra were investigated. Their *in vitro* inhibitory effects on the growth of HT-29 cells were preliminarily investigated. As a result, it was found that all the four pectin polysaccharides, WSP, CSP, ASP and BSP possessed a relative molecular weight over 4.0×10^5 Da. CSP contains the most amount of galacturonic acids, while BSP had the most glucose without galacturonic acids. Meanwhile, all four pectin polysaccharides showed inhibitory activities against the proliferation of HT-29 cells, of which CSP had the highest activity and BSP had the lowest. The difference among four pectin polysaccharides in the inhibitory activity against HT-29 cells may due to their different contents of galactose and galacturonic acid.

Key words pectin, serial extraction, physicochemical properties, HT-29 cell, antitumor