

# 果胶活性片段的定向制备与表征

曾繁濠<sup>1</sup>, 季杏迪<sup>2</sup>, 王兆梅<sup>2</sup>, 曹晶<sup>2</sup>, 潘振辉<sup>1</sup>, 黄灿庆<sup>1</sup>, 罗歆桐<sup>1\*</sup>

(1. 广州酒家集团利口福食品有限公司, 广东广州 511442)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 半乳凝集素-3 (Galectin-3, Gal-3) 是肿瘤治疗的新靶标, 通过与特定改性果胶片段特异性结合而产生抗肿瘤作用。该研究通过紫外光催化过氧化氢氧化法协同酸、碱对柑橘果胶进行定向降解改性, 得到 8 种果胶降解产物, 分别测定降解产物的分子量、甲基化程度和乙酰化程度等结构参数。再根据活性果胶片段与半乳凝集素-3 特异性结合的原理, 采用活性引导分离的思路, 通过红细胞凝集实验和柱层析分离筛选出果胶活性片段 UHP 4-5-0.3, 其最小抑制浓度为 0.016 mg/mL。CCK-8 细胞抗增殖活性实验表明, UHP 4-5-0.3 对三种 Gal-3 高表达肿瘤细胞人肝癌细胞 HepG2、人乳腺癌细胞 MCF-7、人宫颈癌细胞 HeLa 的增殖抑制率分别达到 72.8%、90.0%、85.7%。通过 FT-IR、<sup>1</sup>H NMR 和 HSQC 的谱图分析确定了果胶活性片段的结构是由高度分支的鼠李半乳糖醛酸-I 以及线性聚半乳糖醛酸共同组成。该研究为从果胶高效获取新型食品功能因子提供了新的思路。

**关键词:** 改性果胶; 紫外光催化过氧化氢氧化; 半乳凝集素-3; 抗肿瘤

文章编号: 1673-9078(2022)11-166-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.0001

## Directed Preparation and Characterization of An Active Fragment of Pectin

ZENG Fanhao<sup>1</sup>, JI Xingdi<sup>2</sup>, WANG Zhaomei<sup>2</sup>, CAO Jing<sup>2</sup>, PAN Zhenhui<sup>1</sup>, HUANG Canqing<sup>1</sup>, LUO Xintong<sup>1\*</sup>

(1. Guangzhou Restaurant Group Likofu Food Co. Ltd., Guangzhou 511442, China)

(2. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Galectin-3 (Gal-3) is a new target for tumor therapy, which exerts anti-tumor effects through the specific binding with the modified pectin fragments. In this study, the pectin from citrus peel was directionally degraded by ultraviolet light catalytic hydrogen peroxide oxidation in synergy with acid or alkaline, resulting in eight degraded pectin products. The structural parameters of the degraded products, including molecular weight, degree of methylation and degree of acetylation were determined. The activity-guided separation was accomplished based on the specific binding between the active pectin fragments and Gal-3. The active pectin fragment UHP 4-5-0.3, having the minimum inhibition concentration (MIC) of 0.016 mg/mL, was screened out through the hemagglutination assay and column chromatography separation. The CCK-8 anti-proliferation activity assay revealed that the proliferation inhibition rates of UHP 4-5-0.3 against the three types of Gal-3 highly-expressed tumor cells, HepG2, MCF-7 and HeLa, reached 72.8 %, 90.0 %, and 85.7 %, respectively. The structure of the active pectin fragment was determined to be composed of a highly branched rhamnogalacturonan I and a linear homogalacturonan by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR and HSQC analyses. The findings of this study provide a new idea for efficiently obtaining a novel food functional ingredient from pectin.

**Key words:** modified pectin; ultraviolet light catalytic hydrogen peroxide oxidation; galectin-3; anti-tumor

引文格式:

曾繁濠,季杏迪,王兆梅,等.果胶活性片段的定向制备与表征[J].现代食品科技,2022,38(11):166-174

ZENG Fanhao, JI Xingdi, WANG Zhaomei, et al. Directed preparation and characterization of an active fragment of pectin [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 166-174

收稿日期: 2022-01-03

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技合作重点专项 (2021YFE0190300)

作者简介: 曾繁濠 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 食品科学, E-mail: 759597705@qq.com

通讯作者: 罗歆桐 (1987-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 食品科学, E-mail: tong8229299@163.com

果胶是自然界中最为丰富的结构多糖,近年来,一类由果胶降解得到的具有突出生物活性的“改性果胶”(Modified Pectin, MP)受到广泛关注,其中以抗肿瘤活性最为引人注目<sup>[1-4]</sup>,一种改性柑橘果胶(GCS-100)处于II期的临床研究可用于免疫和抗肿瘤辅助调节<sup>[5]</sup>。然而原果胶是一种结构复杂的酸性杂多糖,包含两个主要的结构区域,即聚半乳糖醛酸(Homogalacturonan, HG)和鼠李半乳糖醛酸I(RG-I)<sup>[6]</sup>,因此需要优化果胶结构得到高活性片段。目前通过化学降解、酶法降解、超声降解<sup>[7]</sup>等获取MP,其中果胶的光催化降解是利用过氧化氢产生的自由基裂解果胶中的GalA,得到富含RG-I的果胶片段。与原果胶相比,降解修饰后的改性果胶活性更强,因此能更好地发挥其免疫调节和抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。

大量的同行研究和临床试验结果显示,MP的抗肿瘤活性与其对半乳糖凝集素-3(Galectin-3, Gal-3)显著的拮抗作用密切相关<sup>[9,10]</sup>。Gal-3能通过糖识别结构域(Carbohydrate Recognition Domain, CRD)与半乳糖残基通过受体-配体作用产生特异性结合,与癌细胞表面大量表达的Gal-3相互识别,阻断Gal-3与其他蛋白质及多肽的结合,进而抑制Gal-3介导的肿瘤细胞的吸附与迁移<sup>[11,12]</sup>。因此,Gal-3是近年来糖生物学领域倍受关注的抗癌药物新靶点,是临床检验肿瘤的重要指标之一。

鉴于果胶相关的抗肿瘤活性与其对Gal-3的多价结合而产生的拮抗作用密切相关,本文提出基于果胶与Gal-3的糖-凝集素配体特异性结合的原理,从复杂的果胶降解片段中定向分离与Gal-3结合的活性潜力片段,验证其抑制肿瘤细胞增殖的活性,为优化果胶降解方法,发掘高活性的果胶片段食品功能因子提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

柑橘果胶(P9135, ≥99%),上海Sigma Aldrich公司;人重组半乳糖凝集素-3,美国BioVison公司。

### 1.2 主要仪器设备

制备改性果胶的光催化降解设备主要由CEL-LAB500光化学反应仪、CEL-LX1000低温冷却循环水泵、500WLM5 500 W长弧汞灯泡三部分组成,均购自北京奥莱特有限公司;XSP-11C光学显微镜,上海光学仪器厂;MCO-175 CO<sub>2</sub>细胞培养箱,日本SAMYO公司;Infinite M200多功能酶标仪,瑞士Tecan公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 酸碱协同紫外光催化过氧化氢氧化法降解果胶

根据曹晶等<sup>[13]</sup>优化的紫外光催化过氧化氢氧化工艺(Ultraviolet Light Catalytic Hydrogen Peroxide Oxidation System, UHP)协同一定的酸碱微环境进行果胶降解。称取适量柑橘果胶粉末于去离子水中充分溶解至溶液浓度10 mg/mL。分别用1.0 mol/L的HCl或NaOH调节pH值至4.0和10.0,再向果胶溶液中滴加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液(30%, V/V)使其最终浓度为0.03 mol/L。取20 mL上述反应溶液置于光化学反应仪的石英试管中,在磁力搅拌与紫外光照射条件下反应不同时间(1、3、5、7 h),得到果胶降解溶液。反应结束后,立即用1.0 mol/L的NaOH或HCl调节pH值至中性,并加入4倍体积的无水乙醇,隔夜静置沉降,7 104 g离心15 min,得到的沉淀在60 °C真空干燥得到果胶降解产物,根据反应酸碱度和时间分别用编号UHP 4-1、UHP 4-3、UHP 4-5、UHP 4-7、UHP 10-1、UHP 10-3、UHP 10-5、UHP 10-7表示。准确称量果胶降解产物质量 $m_1$ ,原果胶质量 $m_0$ ,按公式计算每种降解产物的产率(C,%)。

$$C = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

#### 1.3.2 分子质量

参考Yang等<sup>[14]</sup>方法并作适当修改。用Waters凝胶渗透色谱仪(GPC)测定果胶及降解产物的分子量。4~5 mg果胶降解产物溶于2 mL 20 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲溶液中,用0.45 μm水系膜过滤。色谱条件:两根串联的TSK凝胶柱TSK(G-5000PW<sub>XL</sub>, 7.8×300 mm和G-3000PW<sub>XL</sub>, 7.8×300 mm),Waters 2414示差检测器,洗脱液为20 mmol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH值4.0),流量0.6 mL/min,柱温35 °C,运行时间45 min。用不同重均分子量( $M_w$ )葡聚糖标准品(1 400、668、410、273、148、48.6、23.8、11.6、5.2 ku)建立线性方程。

#### 1.3.3 甲氧酯化度(Degree of Methylation, DM)和乙酰酯化度(Degree of Acetylation, DA)

果胶降解产物(10 mg)在0.5 mL 6 mmol CuSO<sub>4</sub>、1.0 mL 0.5 mol NaOH和10 μL 4 mmol异丙醇的溶液中4 °C反应30 min,7 104 g离心10 min。用0.5 mol HCl调pH值2.0,用0.45 μm膜过滤后待用。标准曲线用10 μL 100 μL/mL异丙醇(IPA)、10 μL 100 μL/mL乙酸(AcOH)、6 μL甲醇(MeOH)和2 mL超纯水测定。采用Waters 1525高效液相色谱系统,C<sub>18</sub>色谱柱(SinoChrom ODS-BP, 250×4.6 mm)和示差检测器(Waters 2414)。取20 μL注入HPLC体系,柱温25 °C,运行时间20 min,洗脱液为4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,流量为0.8 mL/min。以IPA为内标得到MeOH和AcOH的响

应因子 FR, 再计算出 DM 和 DA。

$$FR = \frac{M_{MeOH \text{ or } AcOH}}{M_{IPA}} \times \frac{A_{IPA}}{A_{MeOH \text{ or } AcOH}} \quad (2)$$

$$DM = FR \times \frac{A_{MeOH}}{A_{IPA}} \times \frac{M_{IPA}}{M_{sample}} \times \frac{176 \times 10^4}{GalA\% \times 32} \quad (3)$$

$$DA = FR \times \frac{A_{AcOH}}{A_{IPA}} \times \frac{M_{IPA}}{M_{sample}} \times \frac{176 \times 10^4}{GalA\% \times 60} \quad (4)$$

式中:

$M$ ——下标物质的质量;

$A$ ——下标物质的峰面积;

GalA%——样品中半乳糖醛酸的质量百分含量。

### 1.3.4 果胶降解产物的分离纯化

取 1 mL 浓度为 10 mg/mL 果胶降解产物缓慢加入到平衡后载有 DEAE-cellulose 的层析柱 (2.6 cm×60 cm) 中, 分别用蒸馏水和三个浓度梯度的 NaCl 水溶液 (通过预实验确定浓度梯度为 0.1 mol、0.3 mol 和 1.0 mol) 洗脱, 体积流量 1.2 mL/min。收集主要洗脱馏分后, 再用 Sephadex G200 (2.6 cm×60 cm) 凝胶层析柱进一步纯化。收集峰最大的组分, 透析后冷冻干燥, 得到纯化的果胶降解片段, 根据洗脱液组分分别用 UHP 4-5-0、UHP 4-5-0.1、UHP 4-5-0.3 和 UHP 4-5-1.0 表示。

### 1.3.5 Gal-3 诱导的红细胞凝集实验

Gal-3 诱导的红细胞凝集 (Galectin-3-Mediated Hemagglutination, G3H) 实验被普遍应用于鉴定某种物质是否为 Gal-3 的抑制剂<sup>[15]</sup>。在 V 型透明的 96 孔板上, 设定第一孔作为阴性对照组加入 75  $\mu$ L PBS, 第二孔为阳性对照组加入 50  $\mu$ L PBS, 其余除第三孔外各加入 50  $\mu$ L PBS。以 PBS 为溶剂配置浓度为 1 mg/mL 的待测果胶样品溶液, 取 100  $\mu$ L 样品溶液加入到第三孔, 然后按 2 倍逐步稀释, 静置 10 min。除第一孔, 其它所有孔各加 25  $\mu$ L 20  $\mu$ g/mL Gal-3, 混匀后静置 30 min。所有孔各加 25  $\mu$ L 4% 鸡血红细胞, 25  $^{\circ}$ C 下静置 1.5 h 后观察鸡血红细胞的凝集状态。若红细胞最终沉降为一个小红点, 则判断为完全不凝集; 若红细胞在孔壁上大量凝集, 则判断为完全凝集。以乳糖 (Lac)、半乳糖 (Gal)、CP、酶改性柑橘果胶 (Pectasol-C) 作为阳性对照, 以完全抑制鸡血红细胞凝集所需样品的最小抑制浓度 (Minimum Inhibition Concentration, MIC) 表示样品的抑制活性。

### 1.3.6 肿瘤细胞增殖实验

选用 CCK-8 比色法进行果胶降解产物抑制肿瘤细胞 (HepG 2、MCF-7) 增殖的实验, 以及果胶降解片段对正常细胞毒性 (293A) 和肿瘤细胞 (HepG2、MCF-7、HeLa) 的抑制增殖实验。取对数生长期的细胞, 用 0.25wt% 胰蛋白酶制成细胞悬液, 控制细胞密度

为每毫升  $5 \times 10^4$  个。在 96 V 型孔板上每孔接种 100  $\mu$ L 细胞液, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱的 37  $^{\circ}$ C 条件下培养。当细胞密度大于 80% 时, 用 PBS 润洗孔板 3 次。加入 100  $\mu$ L 不同浓度的样品, 37  $^{\circ}$ C 继续培养 6 h。而后缓慢吸出液体, 再用 PBS 润洗孔板 3 次, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK8, 37  $^{\circ}$ C 继续培养 4 h。采用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 值, 计算细胞增殖率, 公式如下所示:

$$B = \frac{OD_1}{OD_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

$B$ ——细胞增殖率, %;

$OD_1$ ——加样组平均 OD 值;

$OD_0$ ——正常对照组 OD 值。

### 1.3.7 结构表征

#### 1.3.7.1 红外光谱

采用 FT-IR 光谱仪 Vertex 70 测定样品的 FT-IR 光谱。1 mg 样品与 200 mg KBr 混合, 压成薄片, 在 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  光谱范围内进行扫描分析。

#### 1.3.7.2 单糖组成分析

用对羟基二苯法<sup>[16]</sup>测定 GalA 含量。中性糖组成用高效阴离子交换色谱 (HPAEC) 测定<sup>[17]</sup>。总中性糖 (NS) 含量由岩藻糖 (Fuc)、鼠李糖 (Rha)、半乳糖 (Gal)、阿拉伯糖 (Ara)、葡萄糖 (Glc) 和木糖 (Xyl) 之和计算。

#### 1.3.7.3 核磁共振分析

称取约 30 mg 样品溶解于 500  $\mu$ L 的重水 (99.96%) 溶液中。在室温下用 Bruker AVIII 600M 获取 <sup>1</sup>H NMR 谱。用标准 Bruker 程序记录二维光谱 HSQC。采用 MestReNova 6.1.1 处理光谱。

#### 1.3.8 数据分析

所有实验均进行 3 次重复, 数据处理和分析采用 SPSS 25.0 和 Origin 2018 软件。同一类不同处理的数据采用沃勒-邓肯多重检验方法, 并用字母标注显著性 (显著水平  $p < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸碱协同 UHP 对果胶的降解

图 1 反映了在不同反应时间下酸碱协同 UHP 降解果胶的结果与产物结构参数的变化。随着反应进行, 果胶降解产物的产率不断下降, 但本实验范围内最低产率仍高于 50%。相比于碱协同 UHP 反应 (产率 66.5%~94.2%), UHP 4 系列产物的得率 (54.0%~75.4%) 更低, 这与酸性果胶更易发生降解有关。反应过程中果胶内部发生链裂解使分子量不断降低, 如图 1a 所示,

UHP-4 系列产物的重均分子量由原果胶的 641.2 ku 降低至 65.3 ku, 而 UHP-12 的分子量更低为 54.7 ku, 这主要是由于碱性环境中果胶发生了去酯化和 $\beta$ -消除反应<sup>[18]</sup>。图 1b 中 UHP 10 的 DM 值 (38.74%~24.39%) 相比 UHP 4 的 DM 值 (56.01%~45.52%) 显著降低, 说明相同反应时间内 UHP10 系列产物的降解程度更高, UHP 10 和 UHP 4 在 DA 值上的差异同是降解程度

导致的, 因此碱协同 UHP 可以去除更多的甲氧基和乙酰基, 而在酸性环境中更倾向于主链末端断裂的降解模式。值得注意的是, 碱协同 UHP 反应导致 DM 和 DA 较大程度地降低, 因此, 这一反应对果胶侧链小分子基团的酯化作用明显, 与酸碱改性的作用相似<sup>[6]</sup>, 而与目前通常采用的酶法降解果胶不同<sup>[19]</sup>, 这将为果胶定向修饰提供一个新途径。

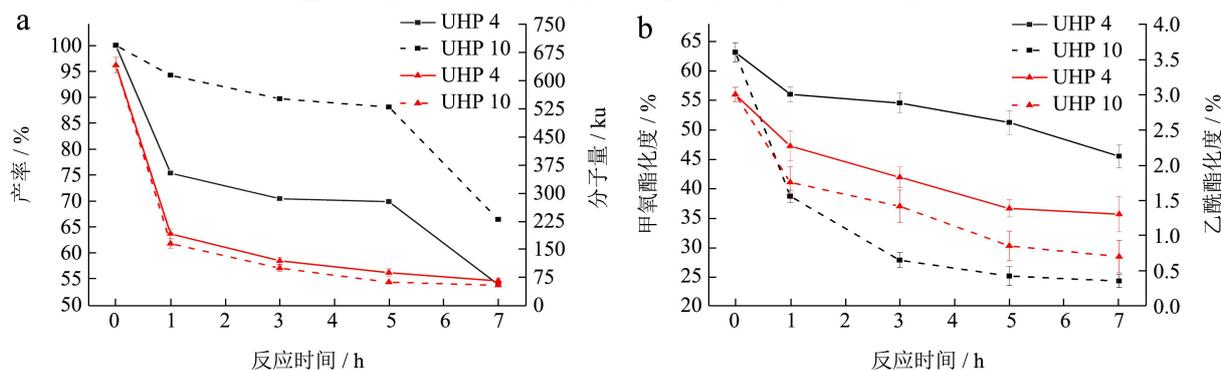


图 1 不同反应时间下降解果胶片段的结构参数

Fig.1 Structural parameters of pectin fragment prepared at different reaction time

注: a: 产率和分子量; b: 甲氧酯化度和乙酰酯化度。

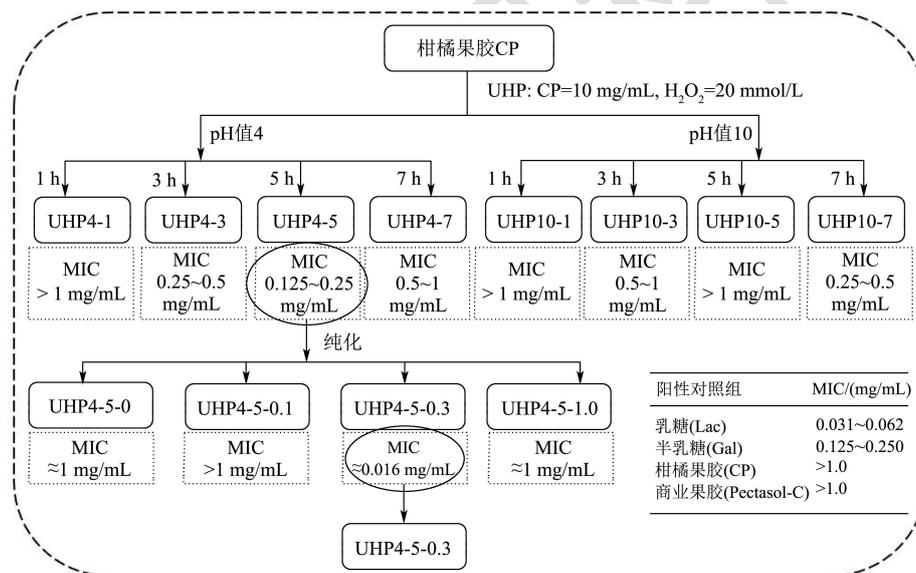


图 2 活性引导果胶片段分离示意图

Fig.2 Schematic diagram of activity-guided separation of pectin fragments

## 2.2 活性引导果胶片段的纯化分离

红细胞膜表面分布着一定量的寡糖链, 可被凝集素特异性识别并结合, 因此向鸡红细胞中加入 Gal-3 后产生细胞凝集, 而当体系中添加含有乳糖 Lac 或半乳糖 Gal 的成分则可阻断二者结合, 从而抑制红细胞凝集。图 2 为基于 Gal-3 结合的活性引导果胶片段分离示意图及分离结果, 柑橘果胶 CP 和商业改性果胶 Pectasol-C 的 MIC 都大于 1.0 mg/mL, 果胶降解产物 UHP 4-1 与 UHP 10-1 的 MIC 值均大于 1.0 mg/mL, 说

明一定时间和程度的氧化降解对组分的结合能力有促进作用。随着果胶的不断降解, 酸协同 UHP 降解产物的 MIC 值整体呈降低趋势, 其中 UHP 4-5 的 MIC 值 (0.125~0.25 mg/mL) 最小, 且与半乳糖相当, 因此, UHP 4-5 与 Gal-3 的结合能力等同于阳性对照组的半乳糖。而碱协同 UHP 降解产物的 MIC 值普遍偏高, 仅有 UHP 10-7 的 MIC 值为 0.25~0.5 mg/mL。因此对比分析, UHP 4 系列产物抑制 Gal-3 介导的鸡血红细胞凝集的程度更低, 说明其与 Gal-3 结合能力更强, 这可能是由于碱性条件下果胶甲氧基的大量去除不利于降解产物与

Gal-3 的结合。接下来, UHP 4-5 经过 DEAE 纤维素柱层析和葡聚糖凝胶柱层析分离, 得到 4 种纯化组分 UHP 4-5-0、UHP 4-5-0.1、UHP 4-5-0.3 和 UHP 4-5-1.0, 经红细胞凝集实验筛选, 确定了其中的主要纯化组分 UHP 4-5-0.3 为活性片段, MIC 值为 0.016 mg/mL, 约为乳糖的 1/3、半乳糖的 1/12, 这一结果优于 pH 改性的柑橘果胶<sup>[20]</sup>, 与人参花蕾果胶<sup>[21]</sup>、人参果胶<sup>[22]</sup>等果胶片段活性相当, 因此具备进一步开发为 Gal-3 抑制剂的潜力。在本文后面的研究中, 所述的果胶片段如无特别说明, 均指活性引导纯化后得到的果胶片段 UHP 4-5-0.3。

### 2.3 果胶降解产物对肿瘤细胞增殖的抑制作用

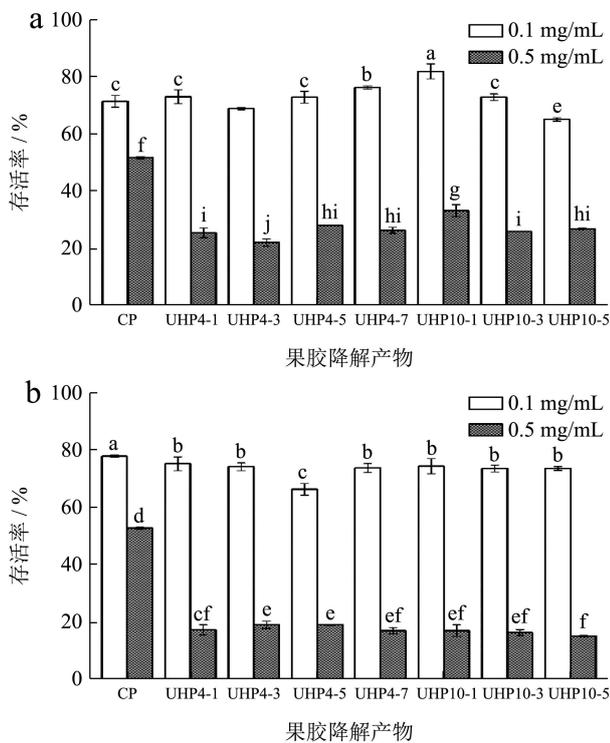


图3 果胶降解产物对肿瘤细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of pectin degradation products on the proliferation of tumor cells

注: a: HepG2; b: MCF-7。

采用 CCK-8 法分析不同浓度的果胶降解产物对 Gal-3 高表达的肿瘤细胞存活率的影响, 结果如图 3 所示。所有果胶降解产物在 0.5 mg/mL 浓度下对应肿瘤细胞的存活率明显低于浓度 0.1mg/mL 的相应组分, 表明果胶降解产物对肿瘤细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性。图 3a 中, 在 0.5 mg/mL 浓度下 UHP 4 对 HepG 2 肿瘤细胞的抑制作用 (细胞存活率 71.9%~77.9%) 低于 UHP 10 对其的抑制作用 (细胞存活率 66.8%~74.0%), 这与 G3H 的结果一致。而在 UHP 4 的系列产物中 UHP 4-3 对 HepG2 的抗增殖作用最大 (77.9%), 同时在 G3H 实验中也表明 UHP 4-3 与 Gal-3 的结合活

性最强。与 CP (存活率 47.4%) 相比, 高浓度的果胶降解产物对 MCF-7 的增殖抑制作用明显增强 (81.2%~85.1%)。而 0.1 mg/mL 浓度下的抑制作用与 CP (22.3%) 相近, 其中在低浓度下 UHP 4-5 的抗增殖作用最强 (33.9%), 这也与 G3H 实验的结果一致。因此, 可通过果胶片段与 Gal-3 的结合活性判断其抗肿瘤增殖的能力。

果胶片段对 293A、HepG2、MCF-7 和 HeLa 细胞存活率的影响如图 4 所示。未纯化的果胶片段 UHP 4-5 对人正常肾细胞 293A 的增殖活性无显著影响, 而纯化后的 UHP 4-5-0.3 在高浓度 (0.5 mg/mL) 下 293A 细胞存活率降至 72.1%, 表明在此浓度下 UHP 4-5-0.3 对正常细胞产生一定的毒性, 这可能与高浓度下的高渗透压对细胞壁的机械损伤有关。纯化可以显著提高果胶片段的体外抗肿瘤活性, 与 UHP 4-5 相比, 添加纯化后的 UHP 4-5-0.3 所对应的肿瘤细胞的存活率加大幅度降低, 在 0.1 mg/mL 浓度下, 添加 UHP 4-5 后 HepG 2 和 MCF-7 的细胞存活率分别为 72.9%和 66.1%, 而添加 UHP 4-5-0.3 组的相应细胞存活率分别下降到 27.2%和 10.0%, 这一现象与 G3H 实验结果一致。而对于 HeLa 细胞, 低浓度的果胶片段展现出更强的增殖抑制作用, 这可能是由于 HeLa 细胞对果胶活性片段的敏感性更强, 后续需降低浓度进行试验。但整体上, G3H 的实验结果可以反映果胶片段的抗肿瘤活性, 说明 UHP 4-5-0.3 可能通过与肿瘤细胞表面的寡糖链结合从而拮抗促转移蛋白 Gal-3, 最终抑制肿瘤细胞的增殖、聚集、粘附和转移<sup>[23,24]</sup>。然而, 这一设想的详细机制还有待后续研究。

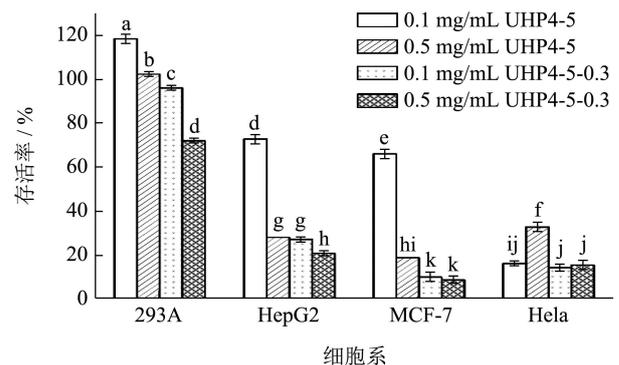


图4 果胶片段对四种细胞增殖活性的影响

Fig.4 Effect of pectin fragment on the proliferation of four cells

### 2.4 结构表征

表 1 列出了纯化前后果胶片段的理化性质与单糖组成。在所有样品的单糖组成中, GalA 均是主要成分, 平均摩尔百分比超过 50%。经降解纯化后, Gal 的百分比含量由 CP 的 12.7%增加到 17.3%, 同时研究表明富含半乳糖残基的多糖和果胶对糖-凝集素的结合起促进作

用<sup>[25]</sup>。中性糖摩尔百分含量由 CP 的 22.41% 增加到 37.52%，这主要是由于 UHP 反应过程中对果胶结构中的 HG 部分产生定向降解从而去除了部分 GalA<sup>[26]</sup>。中性糖如 Xyl、Glc 和 Rha 在降解处理后也显著增加，导致鼠李半乳糖醛酸 (RG) 结构域在最终产物中比例提高。此外，UHP 4-5 与 UHP 4-5-0.3 的 Rha/GalA 比值分别为 0.14 和 0.11，根据 RG-I 型结构模型，Rha/GalA 比值一般在 0.05~1.0 之间<sup>[27]</sup>，因此，推测酸协同 UHP

氧化降解得到的果胶片段是一种高度支化的 RG-I 富集型果胶片段。此外，代表果胶线性度的指标 GalA 与 NS 摩尔比 GalA/NS 从 CP 的 3.46 显著降低到 1.08 (UHP 4-5) 和 1.67 (UHP 4-5-0.3)，表明 CP 由线性主导结构转变为分支结构。综上所述，原果胶的降解主要是通过破坏主要化学成分 GalA，产生高度分支的 RG-I 型果胶片段。

表 1 果胶片段的单糖组成与结构

Table 1 Monosaccharide composition and structure of the pectin fragments

	CP	UHP 4-5	UHP 4-5-0.3	
Mw/ku	641.2±19.4	87.2±9.3	327.0±10.2	
DM/%	60.5±1.9	51.2±2.1	48.5±1.6	
DA/%	3.0±0.2	1.4±0.1	1.3±0.3	
-----				
Monosaccharides/ mol%	GalA	77.59±1.61	51.96±1.57	62.48±1.38
	Fuc	0.38±0.06	0.35±0.07	0.32±0.04
	Rha	3.43±0.11	7.08±0.23	7.13±0.19
	Ara	1.63±0.08	3.35±0.12	2.28±0.11
	Gal	12.67±0.10	27.30±0.07	17.30±0.08
	Glc	2.29±0.05	5.40±0.03	6.62±0.06
	Xyl	2.02±0.06	4.56±0.07	3.87±0.04
	NS	22.41±0.46	48.04±0.59	37.52±0.52
	GalA/NS	3.46±0.14	1.08±0.05	1.67±0.06
	Rha/GalA	0.04±0.01	0.14±0.01	0.11±0.01

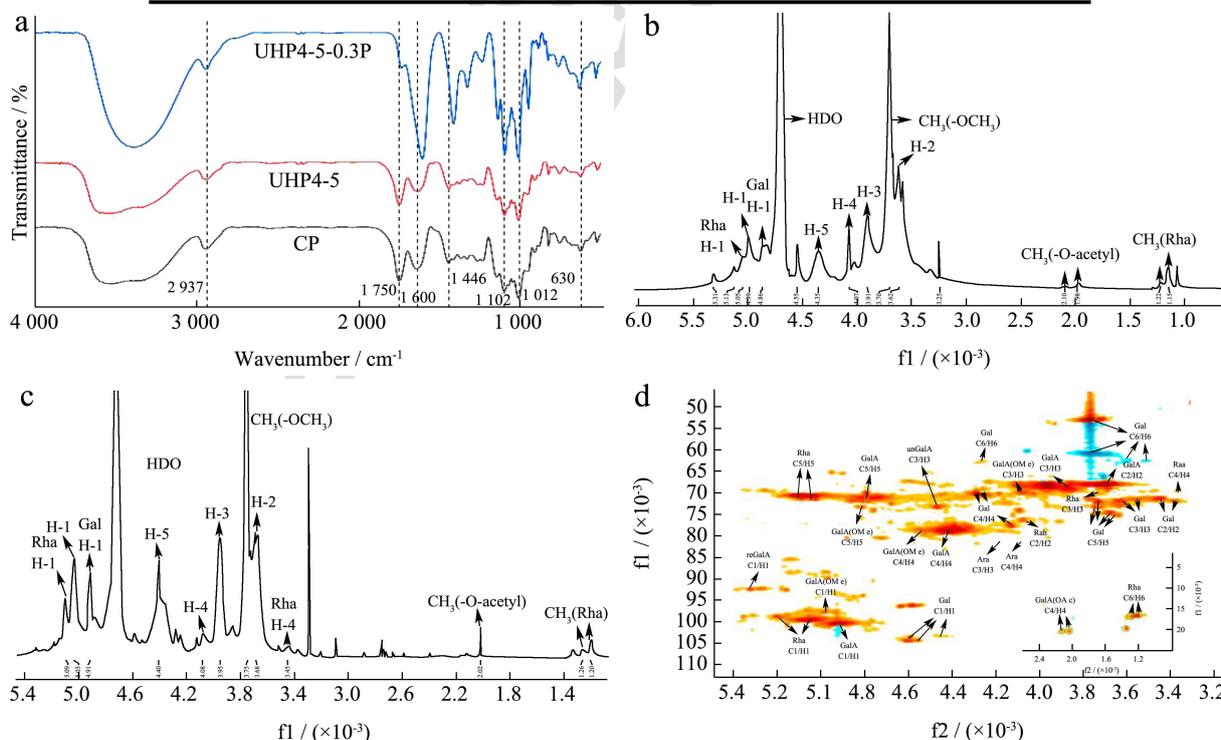


图 5 果胶片段的结构表征图

Fig.5 Structure spectra of the pectin fragment

注：a: FT-IR; b: CP 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图; c: UHP 4-5-0.3 的 <sup>1</sup>H NMR 谱图; d: UHP 4-5-0.3 的 HSQC 谱图。

果胶片段 UHP 4-5-0.3 的红外光谱如图 5a 所示，与 CP 相比，UHP 4-5-0.3 在  $1750\text{ cm}^{-1}$  处（酯化羰基特征峰）的峰强度明显减弱，而在  $1640\text{ cm}^{-1}$  和  $1446\text{ cm}^{-1}$  处（游离羧基团特征峰）的峰强度增强，说明 CP 降解过程中酯化度降低，这与图 1 中 DM 值的变化趋势相同。 $1200\text{ cm}^{-1}$  至  $800\text{ cm}^{-1}$  之间的光谱区域普遍被认为是多糖类化合物的特殊指纹区，与 CP 和 UHP 4-5 相比，UHP 4-5-0.3 在  $1102\text{ cm}^{-1}$  和  $1012\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰（阿拉伯半乳糖的特征峰）明显增强<sup>[28]</sup>，而阿拉伯半乳糖常作为中性侧链与 RG-I 相连接，表明纯化过程中富集了含有中性糖分支的果胶结构域。

利用  $^1\text{H NMR}$  和 HSQC 谱图分析了 UHP 4-5-0.3 的分子结构。为了便于结构推测，本研究根据 Mohnen<sup>[29]</sup> 提出的果胶典型结构模型，将果胶片段结构简化为 HG+RG-I，其中 RG-I 由重复的双糖单元  $[\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-}]_n$  组成主链，大部分鼠李糖（Rha）残基被半乳糖等中性糖取代形成侧链。Rha 是 RG-I 主链中唯一连接到分支的糖残基，因此根据 1,2-Rha 和 O-2,4-Rha 的摩尔数量和两者的数量比例推测分支数量。如图 5 所示  $^1\text{H NMR}$  和 HSQC 谱图所提供的信息，1,2-Rha 和 O-2,4-Rha 所对应的峰面积比分别为 67.4% 和 32.6%，故 UHP 4-5-0.3 中 Rha 分支的数量约为 46。根据单糖组成分析（表 1），Gal 和 Ara 是 RG-I 侧链上除 Rha 以外的主要中性糖，通过 Ara/Gal 的峰面积及两者与 O-2,4-Rha 的数量比例，推测 UHP

4-5-0.3 中 RG-I 侧链平均由 8 个糖残基组成。根据 HSQC 谱图分析，RG-I 区域具有多种 Ara 和 Gal 类型（图 5d），1 $\rightarrow$ 5 和 1 $\rightarrow$ t 连接的  $\alpha\text{-Ara}$  残基且面积比分别为 56.4% 和 43.6%，说明 UHP 4-5-0.3 存在一定量的  $\alpha\text{-1,5-Arab}$  伴随着  $\alpha\text{-1,t-Arab}$  侧链，故 UHP 4-5-0.3 中存在四种连接形式（1 $\rightarrow$ 4、1 $\rightarrow$ 6、1 $\rightarrow$ 3,6 与 1 $\rightarrow$ 3）的 Gal 残基，且  $28\times 10^{-6}/92.23\times 10^{-6}$  的 H-1/C-1 信号为糖残基中的还原端。 $3.70\times 10^{-6}$  归属于酯化 GalA 基团羧基部分的甲氧基，与 CP 相比 UHP 4-5-0.3 的信号强度弱，表明降解后的产物 DM 值降低。GalA 上 O-6 取代的甲酯残基的相关峰在  $4.55\times 10^{-6}$  处的信号也在减弱，进一步证实了 DM 的变化。

### 2.5 果胶片段的结构模型

通过化学和谱图信息分析，推测出 UHP 4-5-0.3 的分子结构如图 6 所示。果胶片段中的活性区域是具有中性糖侧链的 RG-I 结构域，含有  $[\alpha\text{-D-GalA-1,2-}\alpha\text{-L-Rha-}]_n$  的双糖重复主链，分支度达到 32.6%。通过谱图计算得到更详细的信息，RG-I 约有 46 条由 Rha 连接的侧链，且平均侧链长达 8 个糖残基。果胶片段的高活性与其半乳糖侧链的数目和长度紧密相关，高支化度的分子结构更有利于与 Gal-3 的多价结合作用<sup>[30]</sup>。而线性 HG 结构域是由  $\alpha\text{-1,4-GalA}$  组成，C-6 羧基处部分甲基化，O-2 和 O-3 处轻度乙酰化，它的存在可以增强 RG-I 结构域的生物活性<sup>[10]</sup>。

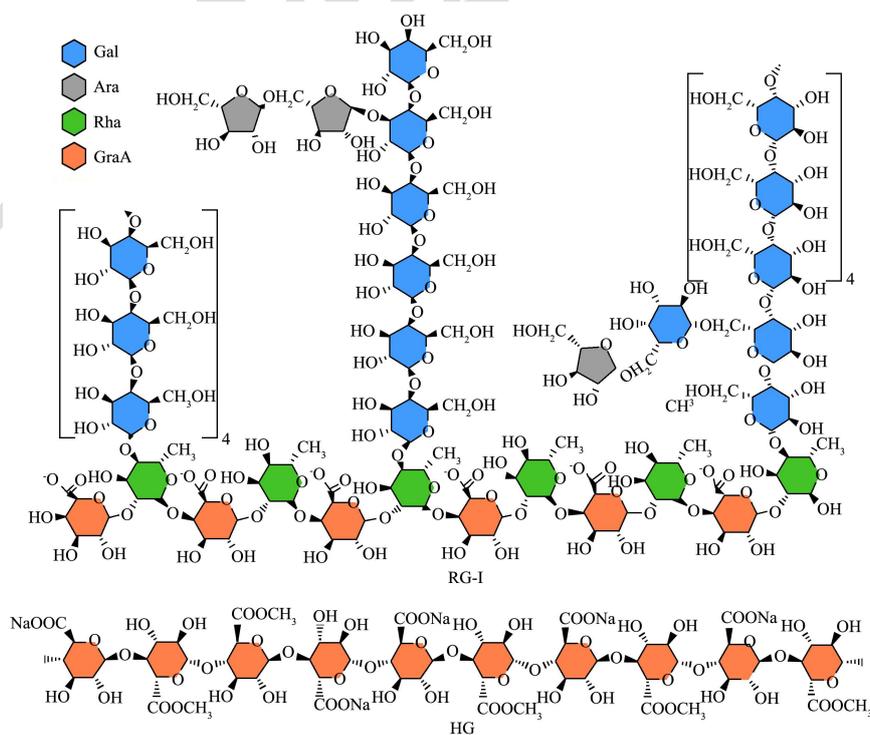


图 6 果胶片段 UHP 4-5-0.3 的结构模型

Fig.6 A proposed structural model of the pectin fragment UHP 4-5-0.3

### 3 结论

采用酸碱协同紫外光催化氧化工艺降解柑橘果胶,生成低分子量、低酯化度、RG-I 富集的果胶片段。不同的分子特征的果胶片段结构的差异导致其与 Gal-3 多价结合能力不同。基于此,提出活性引导分离的思路,通过果胶活性片段与 Gal-3 特异性结合的 G3H 实验模型,筛选出结合能力强的果胶片段 UHP 4-5。通过 CCK-8 细胞增殖实验,验证了所选片段对多株肿瘤细胞显著的增殖抑制作用,证实果胶片段通过对 Gal-3 的拮抗作用而产生抗肿瘤的潜力。结构分析确定了果胶片段主要是由具有中性糖侧链的 RG-I 结构域和线性 HG 结构域组成。本研究获得一种结构明确的高抗肿瘤活性的果胶片段,也为探寻高活性的 Gal-3 多糖拮抗剂提供了新的思路。

### 参考文献

- [1] WU Xiaoqian, FU Jiaying, MEI Ruyi, et al. Inhibition of liver cancer HepG2 cell proliferation by enzymatically prepared low-molecular citrus pectin [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2021
- [2] Maxwell Ellen-G, Belshaw Nigel-J, Waldron Keith-W, et al. Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 24(2): 64-73
- [3] Alvaro Ferreira-Lazarte, Javier Fernández, Pablo Gallego-Lobillo, et al. Behaviour of citrus pectin and modified citrus pectin in an azoxymethane/dextran sodium sulfate (AOM/DSS)-induced rat colorectal carcinogenesis model [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 167: 1349-1360
- [4] Do Prado Samira-Bernardino-Ramos, Shiga Tânia-Misuzu, Harazono Yosuke, et al. Migration and proliferation of cancer cells in culture are differentially affected by molecular size of modified citrus pectin [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 211: 141-151
- [5] Stegmayr John, Lepur Adriana, Kahl-Knutson Barbro, et al. Low or no inhibitory potency of the canonical galectin carbohydrate-binding site by pectins and galactomannans [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(25): 13318-13334
- [6] Maxwell Ellen-G, Colquhoun Ian-J, Chau Hoa-K, et al. Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 136: 923-929
- [7] YAN Jingkun, WANG Chun, QIU Wenyi, et al. Ultrasonic treatment at different pH values affects the macromolecular, structural, and rheological characteristics of citrus pectin [J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128216
- [8] 刘成梅,刘琪,陈军,等.果胶功能性质新进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(21): 344-351
- [9] Hayashi Yumiko, JIA Weizhen, Kidoya Hiroyasu, et al. Galectin-3 inhibits cancer metastasis by negatively regulating integrin  $\beta 3$  expression [J]. *The American Journal of Pathology*, 2019, 189(4): 900-910
- [10] WU Dongmei, ZHENG Jiaqi, HU Weiwei, et al. Structure-activity relationship of citrus segment membrane RG-I pectin against Galectin-3: The galactan is not the only important factor [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 245: 116526
- [11] Minzanova Salima-T, Mironov Vladimir-F, Arkhipova Daria-M, et al. Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review [J]. *Polymers*, 2018, 10(12): 1407
- [12] ZHANG Wenbo, XU Ping, ZHANG Han. Pectin in cancer therapy: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2015, 44(2): 258-271
- [13] CAO Jing, YANG Jian, WANG Zhaomei, et al. Modified citrus pectins by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation at acidic and basic conditions: Structures and *in vitro* anti-inflammatory, anti-proliferative activities [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 247: 116742-1-116742-10
- [14] YANG Yishuo, WANG Zhaomei, HU Die, et al. Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 189-196
- [15] ZHANG Tao, ZHENG Yi, ZHAO Dongyang, et al. Multiple approaches to assess pectin binding to galectin-3 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 91: 994-1001
- [16] Blumenkrantz Nelly. New method for quantitative determination of uronic acids [J]. *Analytical Biochemistry*, 1973, 54(2): 484-489
- [17] Garna H, Mabon N, Wathélet Bernard, et al. New method for a two-step hydrolysis and chromatographic analysis of pectin neutral sugar chains [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(15): 4652-4659
- [18] Fraeye Ilse, De Roeck Ans, Duvetter Thomas, et al. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(2): 555-563
- [19] MA Xiaobin, WANG Danli, CHEN Weijun, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymolysis of pectin: Kinetic

- study, structural characteristics and anti-cancer activity of the hydrolysates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 79: 90-99
- [20] ZHANG Tao, LAN Yu, ZHENG Yi, et al. Identification of the bioactive components from pH-modified citrus pectin and their inhibitory effects on galectin-3 function [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 58: 113-119
- [21] CUI Liangnan, WANG Jiayi, HUANG Rui, et al. Analysis of pectin from *Panax ginseng* flower buds and their binding activities to galectin-3 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 128: 459-467
- [22] SHI Huimin, YU Li, SHI Yun, et al. Structural characterization of a rhamnogalacturonan I domain from ginseng and its inhibitory effect on galectin-3 [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 1016
- [23] 李仪晴,李小玉,白晶晶,等.改良的橘皮果胶抑制半乳糖凝集素-3与肿瘤相关功能的研究进展[J].*化学通报*,2021,84(9): 895-899
- [24] Clark Mary-C, Pang Mabel, Hsu Daniel-K, et al. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death [J]. *Blood*, 2012, 120(23): 4635-4644
- [25] Gunning A-Patrick, Bongaerts Roy-J-M, Morris Victor-J. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3 [J]. *The FASEB Journal*, 2008, 23(2): 415-424
- [26] CAO Jing, YANG Jian, YUE Kaiting, et al. Preparation of modified citrus pectin (MCP) using an advanced oxidation process with hydroxyl radicals generated by UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 102: 105587
- [27] SUN Lin, WU Di, NING Xin, et al.  $\alpha$ -Amylase-assisted extraction of polysaccharides from *Panax ginseng* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, 75: 152-157
- [28] Kačuráková M, Capek P, Sasinková V, et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2000, 43(2): 195-203
- [29] Mohnen Debra. Pectin structure and biosynthesis [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 266-277
- [30] GAO Xiaoge, ZHI Yuan, SUN Lin, et al. The inhibitory effects of a rhamnogalacturonan I (RG-I) domain from ginseng pectin on galectin-3 and its structure-activity relationship [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(47): 33953-33965