

# 肝素类多糖降血脂性能的初步研究

李良玉<sup>1,2</sup>, 刘岩<sup>3</sup>, 宋大巍<sup>1</sup>, 张丽萍<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>黑龙江八一农大国家杂粮工程技术研究中心, 大庆 163319; <sup>2</sup>东北林业大学  
林学院, 哈尔滨 150040; <sup>3</sup>黑龙江省农垦建三江前进农场, 佳木斯 156331

**摘要:** 本实验以不同类型肝素化合物降血脂性能为研究目的, 采用高脂饲料喂饲小鼠成功构建高脂血症模型, 并用不同剂量的肝素类物质喂养高脂血症小鼠, 结果表明, 不同剂量的低分子肝素、未分级肝素及多硫酸化肝素都有降低高脂血症小鼠血液中胆固醇的作用, 中剂量组和高剂量组极为显著; 同时, 高剂量的低分子肝素可降低高脂血症小鼠血液中的甘油三酯, 体重减轻明显; 中剂量和高剂量组的试验小鼠肝脏中丙二醛含量显著降低, 说明肝素类多糖具有一定的抗氧化能力。通过研究发现低分子肝素、未分级肝素及多硫酸化肝素三者中降血脂能力为: 低分子肝素 > 多硫酸化肝素 > 未分级肝素。

**关键词:** 低分子肝素; 未分级肝素; 多硫酸化肝素; 降血脂性能

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.023

## Hypolipidemic Properties of Heparin Polysaccharides

LI Liang-yu<sup>1,2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, SONG Da-wei<sup>1</sup>, ZHANG Li-ping<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;

<sup>2</sup> College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040; <sup>3</sup> Heilongjiang Jiansanjiang Qianjin Farm, Jiamusi 156331, China

**Abstract:** The objective of this research was to investigate the hypolipidemic properties of heparin polysaccharides. The hyperlipidemia mice model were constructed by feeding with high fat diet. The results showed that different doses of low molecular weight heparin and poly sulfated heparin had significantly effects on cholesterol reduction in hyperlipidemia mice, especially the medium dose and high dose groups. In addition, high dose of low molecular weight heparin decreased the content of blood triglyceride in mice, with obvious weight loss. However, the level of MDA in medium dose and high dose groups was significantly decreased, which indicated that low molecular weight heparin strongly enhanced the capacity of antioxidant. It was found that the hypolipidemic properties of low molecular weight heparin was higher than poly sulfated heparin and unfractionated heparin.

**Key words:** low molecular weight heparin; unfractionated heparin; poly sulfated heparin; hypolipidemic property

肝素类物质是一类重要的功能性聚阴离子糖胺聚糖物质, 主要包括未分级肝素 (unfractionated heparin, UFH)、低分子肝素 (low molecular weight heparin, LMWH)、多硫酸化肝素 (poly sulfated heparin, PSH) 和其他衍生物<sup>[1]</sup>, 具有广泛的抗血栓, 抗炎、调整血脂等多种生物学功能, 主要分布在哺乳动物的肺、肝、肠粘膜中<sup>[2]</sup>。肝素类化合物的降血脂作用已有报道但均为早期的研究, 陶芳等研究表明低剂量肝素钙能明显降低急性心肌梗塞患者的血液粘度和血清胆固醇水平, 促进心肌供血<sup>[3]</sup>; 付学令研究

表明肝素具有降低总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 的作用<sup>[4]</sup>。刘兆平研究发现碱提类肝素对患有高胆固醇血症和高甘油三酯血症的大鼠均有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>。现在报道的研究大部分集中在 UFH、LMWH 的抗癌、抗凝血等效果, 在 UFH、LMWH、PSH 的降血脂效果研究方面还是个空白, 并且 UFH、PSH、LMWH 三者之间的降血脂效果差异机理研究方面也从未报道过, 因此, 对比这三种肝素类化合物实验性高脂血症模型的降血脂效果具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

低分子量肝素 (法安明, 25000 IU/mL), 美国

Pfizer Inc;普通肝素、多硫酸化肝素,自制;TC测定试剂盒、TG测定试剂盒、HDL-C测定试剂盒、LDL-C测定试剂盒、丙二醛,MDA检测试剂盒,南京建成生物工程研究所。超低温冰箱,日本日立公司;AEC-200型电子天平,杭州新力机械厂;Pharo300紫外可见分光光度计;高速台式离心机,日本日立公司;恒温水浴箱,上海森信实验仪器有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 食物性高脂血症模型的建立及喂养方法

健康昆明种小鼠(批准号:医动字第10-5101),体质量( $20 \pm 2$ )g,由长春生物制品研究所提供。实验室饲养温度为 $23 \pm 1$ ℃,湿度:30%~70%,噪音: $< 50$ dB。高脂饲料的配方为每1000g基础饲料添加200g奶粉、300g猪油、十个鸡蛋、100滴鱼肝油、2500g黄豆芽,喂养3w后,尾部取血,TC较对照组高出约1/3时认定为已形成高脂血症模型<sup>[6]</sup>。

### 1.2.2 实验动物的分组方法

选取70只昆明小鼠以普通饲料喂养1w,禁食2h后尾部取血,根据TC情况随机分为正常组、高脂模型对照组、LMWH高剂量组、LMWH中剂量组、LMWH低剂量组、UFH组及PSH组7组,每组10只。对照组以普通饲料喂养,其余以高脂饲料喂养。

### 1.2.3 实验动物的给药方法

高脂模型组形成后改喂普通饲料,并开始ip给药,正常对照组和高脂模型组分别ip生理盐水(NS)2mL/只,LMWH高、中、低剂量组分别ipLMWH 0.5、1、2mg/(mL·d),UFH组为1mg/(mL·d),PSH组为1mg/(mL·d),给药剂量的选择参考山东医科大学药学系生化制药教研室崔慧斐教授关于低分子肝素口服制剂的降血脂作用研究中的给药剂量<sup>[7]</sup>,以观察制剂对高脂血症的治疗作用。

### 1.2.4 小鼠体重测定方法

在喂养期间小鼠自由饮水,每天16:00称量体重并纪录,喂养2w。

### 1.2.5 TC、TG、HDL-C、LDL-C测定方法

试验小鼠给药2w后禁食,12h后取血,准确按照试剂盒操作说明测定小鼠血液中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量。

### 1.2.6 荧光比色法测定肝脏及血浆丙二醛(MDA)

取一定量的试验小鼠肝脏组织,匀浆后加入冷生理盐水,反复匀浆,制成10%组织匀浆(W/V),4000rpm离心,10min,取上层清液在532nm波长

处测定OD值。

$$\text{MDA}(\text{nmol/g 湿组织}) = (\text{测定管 OD 值} - \text{测定空白管 OD 值}) / (\text{标准管 OD 值} - \text{标准空白管 OD 值}) \times 200$$

### 1.2.7 统计学分析方法

所有实验经过至少三次重复( $n \geq 3$ ),每次重复实验都在不同时间进行,且每次重复实验都进行了三次平行实验。实验得到的数据采用SAS8.2统计软件进行分析。

## 2 实验结果

### 2.1 小鼠体重变化情况

由图1的试验结果表明,各剂量肝素类多糖组小鼠的体重普遍低于正常对照组,高脂模型组体重增长最明显,模型组次之,其他组均有降低,其中高剂量LMWH组体重减轻最为明显。

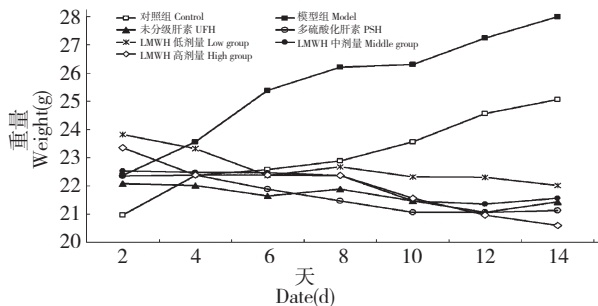


图1 小鼠体重变化曲线

Fig. 1 Changing curve of mice body weight

### 2.2 肝素类多糖对小鼠血脂指标的影响

测定各组间有无统计学差异,试验数据采用SAS8.2数据分析软件进行统计分析。数据表示格式为:均值±标准差。

表1试验数据可以看出,试验小鼠通过高脂饲料的喂养,胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇含量明显提高,高密度脂蛋白明显降低,证明本试验已经成功建立了高脂血症小鼠模型。给药后,不同剂量的肝素组胆固醇含量与模型组相比都有不同程度的下降:UFH组下降33.4%;PSH组下降40.3%;低剂量LMWH组下降39.0%;中剂量LMWH组下降48.5%;高剂量LMWH组下降64.6%。结果表明,中剂量LMWH组和高剂量LMWH组可以显著降低高脂血症小鼠的血胆固醇含量( $P < 0.01$ )。肝素各组胆固醇含量均高于正常对照组,但都低于模型组。肝素各组对甘油三酯和低密度脂蛋

表 1 肝素类多糖对高脂血症小鼠血浆 TC、TG、HDL-C、LDL-C 及 MDA 的影响

Table 1 Effect of heparin polysaccharide on the levels of TC, TG, HDL-C, LDL-C and MDA in hyperlipidemic mice plasma

组别 Group	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	MDA (nmol/g)
对照组 Control	2.240 ± 0.035	0.454 ± 0.030	0.802 ± 0.032	1.584 ± 0.036	96.58 ± 0.526
高脂模型组 High fat model	7.614 ± 0.024 <sup>b</sup>	0.838 ± 0.027 <sup>b</sup>	3.864 ± 0.039 <sup>b</sup>	1.228 ± 0.023 <sup>b</sup>	121.30 ± 0.689 <sup>b</sup>
未分级肝素 UFH	5.068 ± 0.037 <sup>ac</sup>	0.634 ± 0.026 <sup>ac</sup>	3.554 ± 0.044 <sup>ac</sup>	1.272 ± 0.040 <sup>ac</sup>	116.40 ± 0.353 <sup>ac</sup>
多硫酸化肝素 PSH	4.540 ± 0.035 <sup>ac</sup>	0.610 ± 0.057 <sup>ac</sup>	3.464 ± 0.053 <sup>ac</sup>	1.354 ± 0.025 <sup>bc</sup>	113.48 ± 0.286 <sup>bc</sup>
LMWH 低剂量 Low group	4.640 ± 0.030 <sup>ac</sup>	0.578 ± 0.031 <sup>bc</sup>	3.646 ± 0.036 <sup>bd</sup>	1.242 ± 0.028 <sup>bc</sup>	110.86 ± 0.502 <sup>bd</sup>
LMWH 中剂量 Middle group	3.916 ± 0.036 <sup>bd</sup>	0.540 ± 0.022 <sup>bd</sup>	3.110 ± 0.038 <sup>bd</sup>	1.330 ± 0.022 <sup>bd</sup>	107.46 ± 0.589 <sup>bd</sup>
LMWH 高剂量 High group	2.692 ± 0.102 <sup>bd</sup>	0.480 ± 0.015 <sup>bd</sup>	2.541 ± 0.042 <sup>bd</sup>	1.362 ± 0.048 <sup>bd</sup>	105.68 ± 0.376 <sup>bd</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>b</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>c</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>d</sup>  $P < 0.01$ 。

Note:<sup>a</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>b</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>c</sup>  $P < 0.01$ , compared with control;<sup>d</sup>  $P < 0.01$ , compared with model.

白的含量均有不同程度的降低,以高剂量 LMWH 组下降最明显。而肝素各组能够显著升高高密度脂蛋白的含量,说明大部分血脂可由动脉内膜渗入到动脉壁,再由动脉外膜的淋巴管排出,不在动脉壁上沉积。模型组小鼠体内 MDA 含量明显增高,机体抗氧化能力明显下降。各剂量肝素多糖组都低于模型组,随着剂量增加 MDA 也随之降低。

### 3 讨论

通过试验可以看出肝素类多糖具有明显的降血脂作用,这可能是由于肝素改变了载脂蛋白 A1 的构象,促进了载脂蛋白 A1 与脂类的结合,激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶,促进高密度脂蛋白成熟,增加高密度脂蛋白,降低血液粘滞度,加快血液循环使胆固醇酯化并运送至肝脏,加速清除血液中的胆固醇,从而降低血脂<sup>[8,9]</sup>,此外,肝素类化合物中多糖结构与胆固醇、胆酸结合形成复合物,抑制脂肪在肠内的吸收,促进脂肪降解和排泄。通过试验可以看出 UFH 与 LMWH 都可以显著降低高脂血症动物血脂中的 TC、TG 水平,同时提高 HDL 与 TC 的比值。自由基在人体正常及病理过程中具有重要作用,它会造成细胞永久性损伤,甚至导致细胞死亡<sup>[10,11]</sup>,MDA 是脂质过氧化的产物,MDA 含量的增减能够反应出脂质过氧化的程度。自由基可引起脂质过氧化,LDL 变形,导致泡沫细胞形成,引起脂质沉着和平滑肌细胞移植,最终形成 AS。本试验表明,肝素类多糖能够降低高脂血症小鼠的 MDA,中、高剂量 LMWH 组 MDA 含量显著降低,说明 LMWH 具有增强机体的抗氧化能力,保护血管内皮功能的作用,即对动脉粥样硬化有较好的防治作用。

本文结果显示不同类肝素多糖均有一定的降血脂性能,低分子肝素活性最强,多硫酸化肝素次之,未分级肝素最弱,低分子肝素的中剂量组和高剂量组极为显著,这可能与肝素类化合物的结构与分子量有关。多硫酸化肝素的降血脂能力强于未分级肝素主要是由于以下几个原因:硫酸基的引入会引起多糖理化性质、特别是立体构象的变化,而构象变化恰恰是活性变化的决定因素<sup>[12]</sup>。多硫酸化肝素的降血脂能力在一定程度上源于硫酸根赋予其聚阴离子的特性。首先,硫酸根聚阴离子具有很强的负电荷,能改变载脂蛋白的构象,从而起到降血脂的作用;其次,硫酸根聚阴离子可以与某些细胞表面的正电荷分子结合,干扰正常的脂肪在肠内的吸收,促进脂肪降解和排泄<sup>[13]</sup>;再次,度硫酸化肝素硫酸化后的降血脂能力较强可能与糖链空间结构有关,多糖硫酸化后,糖环构象可能扭曲或转变,且硫酸基间的排斥作用导致卷曲构象呈伸展,糖链柔性降低、刚性增强。因而表现出降血脂能力<sup>[14]</sup>。

此外,低分子肝素的降血脂能力强于多硫酸化肝素这与前人研究较为相似。Yoshida O、Nakashima H 等人研究认为尽管硫酸根与肝素的降血脂能力密切相关,但不是硫酸根数量越多活性越强,过多的硫酸根会产生抗凝血的副作用。一般认为,在平均每单位糖残基含 1.5 ~ 2.0 个硫酸根为最佳<sup>[15]</sup>。分子量较大的多糖,硫酸化后,由于分子量过大而限制了其降血脂活性的发挥,一般硫酸化多糖分子量在 5000 ~ 6000 Da 最佳<sup>[16]</sup>。低分子肝素的分子量在 4000 ~ 8000 Da 左右,且含有 1.5 ~ 2.0 个硫酸根符合上述条件,因此,可能是导致低分子肝素的降血脂能力强于多硫酸化肝素的原因。通过研究发现肝素

分子量与硫酸化程度是影响肝素类物质降血脂能力的主要原因,哪个因素起主导作用还需进行研究。

## 4 结论

本研究采用高脂血症小鼠模型为研究对象,研究不同类肝素多糖的降血脂性能,研究表明,不同剂量的低分子肝素、多硫酸化肝素和未分级肝素具有降低高脂血症小鼠胆固醇的作用,低分子肝素活性最强,多硫酸化肝素次之,未分级肝素最弱,低分子肝素的中剂量组和高剂量组极为显著。同时,高剂量的低分子肝素可降低高脂血症小鼠血液中的甘油三酯,体重减轻明显;中、高剂量肝素组小鼠的MDA含量显著降低,说明肝素类多糖具有增强机体的抗氧化能力。

## 参考文献

- Hernaiz MJ, Yang HO, Gunay NS, *et al.* Purification and characterization of heparan sulfate peptidoglycan from bovine liver. *Carbohydr Poly*, 2002, 48:153-160.
- Zhang LP(张丽萍). Study on a novel extraction and purification technology of heparin and bioactivity of degraded heparin. Changchun: Jilin University(吉林大学), PhD. 2010.
- Tao F(陶芳), Sun SM(孙胜玫), Liu YP(刘一平). Effect of low dose heparin calcium on acute myocardial infarction with high cholesterol. *J Clin Cardiol* (临床心血管病杂志), 1994, 10:156-157.
- Fu XL. Clinical observation of 36 cases of hyperlipidemia treated with heparin. *Clinical Focus*, 1990, 5:359.
- Liu ZP(刘兆平), Wu BJ(吴葆杰). Comparison of hypolipemic effect of alkali-extracted heparinoid and its two fractions. *Pharm Ind* (医药工业), 1987, 18:401-404.
- Hu HM(胡慧明), Shao F(邵峰), Zhu YC(朱彦陈). Effect of the extract of the south hawthorn on cholesterol biosynthesis in mice. *J Chin Med Mater* (中药材), 2015, 38:1036-1038.
- Cui HF(崔慧斐), Li H(李华), Cao JC(曹吉超), *et al.* Antihyperlipidemic effect of oral preparation of low molecular weight heparin. *Chin J Biochem Pharm*(中国生物制品学杂志), 1998, 19:22-24.
- Li HY(李厚勇), Wang R(王蕊), Gao XQ(高晓奇). Effect of *Laminaria japonica*-extract on peroxidation and hemorheology. *China Public Health*(中国公共卫生), 2002, 18:263-264.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:7915-7922.
- Zhang L(张琳). The relationship between structures of heparin-like glycosaminoglycans and tumor. Jinan: Shandong University(山东大学), MD. 2005.
- Alban S, Franz G. Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate. *Thromb Res*, 2000, 99:377-388.
- Liang J(梁进). Studies on chemical modification anticoagulant function *in vitro* of tea polysaccharide. Hefei: Anhui Agricultural University(安徽农业大学), MD. 2008.
- Takano R, Nagai T, Wu X, *et al.* Sulfation of polysaccharide using monomethylsulfate. *Carbohydr Chem*, 2000, 19:1185-1190.
- Yapani M. In: Polysaccharides-Syntheses. Modifications and Structure Property Relations. Amsterdam: Elsevier, 1988. 444-453.
- Yoshida O, Nakashima H, Yoshida T, *et al.* Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: A novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochem Pharm*, 1998, 37:2887-2889.
- Liao ZH(廖灶辉). Studies on the relationship between  $SO_4^{2+}$  content of polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* and anti-influenza virus activities. Shaotou: Shaotou University(汕头大学), MD. 2008.