



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678030 B

(45) 授权公告日 2013.06.05

(21) 申请号 200880013520.9

(22) 申请日 2008.02.22

(30) 优先权数据

0703514.0 2007.02.23 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.10.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/001437 2008.02.22

(87) PCT申请的公布数据

W02008/101724 EN 2008.08.28

(73) 专利权人 阿尔斯特大学

地址 英国伦敦德里

专利权人 都柏林伊丽莎白女皇神学院

(72) 发明人 玛丽·沃德 海伦妮·麦克纳尔蒂

杰拉尔丁·霍里根 肖恩·斯特兰

约翰·斯科特 约翰·珀维斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

(51) Int. Cl.

A61K 31/525 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1325725 A, 2001.12.12, 全文.

左保华. 核黄素对高血压患者有关病理因素的影响. 《皖南医学院学报》. 1998, 第17卷(第2期), 109-111.

审查员 肖西祥

权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

核黄素在治疗高血压中的用途

(57) 摘要

本发明提供了核黄素在制备用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型或杂合型的受试者的血压升高的药物中的用途。本发明也提供了用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型或杂合型的受试者的血压升高的药物产品,其包含药理学有效量的抗高血压药和核黄素,且本发明进一步提供了治疗此类受试者的方法,所述方法包括给药核黄素。

1. 核黄素在制备用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型的受试者的血压升高的药物中的用途。
2. 核黄素在制备用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是杂合型的受试者的血压升高的药物中的用途。
3. 权利要求 1 或权利要求 2 的核黄素的用途,其中所述药物为适于口服或胃肠外给药的剂型。

核黄素在治疗高血压中的用途

[0001] 本发明涉及核黄素在治疗基因型特异的人群的高血压中的用途。

[0002] 高血压 (hypertension, 也通常称为 high blood pressure), 是一种其中血压升高 (通常为慢性升高) 的医学症状。任何病原的高血压是心血管疾病 (CVD) (包括心脏病和中风) 的主要风险因素之一。

[0003] 已经发现在对于酶 5,10- 亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 编码的基因中常见的 C677T 多态性是纯合型 (homozygous) 的个体, CVD 的风险增高。MTHFR 是形成 5- 甲基四氢叶酸所需要的, 而后者又参与将高半胱氨酸转化为蛋氨酸。认为 MTHFR C677T 多态性是纯合型的个体 (TT 基因型) 患有心脏病和中风的风险比野生型基因的个体 (CC 基因型) 的风险明显更高。对于该多态性是杂合型 (heterozygous) 的人们 (CT 基因型) 也具有相对较高的心脏病和中风风险。许多抗高血压药 (如 ACE 抑制剂、 β 阻断剂和利尿剂) 可用于降低那些临床认为患有高血压的人们的血压。然而, 这些药物可产生不希望的副作用, 且一些受试者尽管尝试 1 种以上的抗高血压药但仍保持高血压。

[0004] 现在出人意料地发现核黄素 (维生素 B2) 具有显著的收缩压和舒张压降低作用, 尤其是对于 MTHFR C677T 多态性是纯合型的 CVD 患者。

[0005] 根据本发明的第一方面, 提供了核黄素在制备用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型或杂合型的受试者的血压升高 (elevated blood pressure) 的药物中的用途。

[0006] 根据本发明的第二方面, 提供了药物产品, 其用于治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型或杂合型的受试者的血压升高, 其包含药学有效量的抗高血压药和核黄素, 二者同时 (simultaneous)、分开 (separate) 或依次 (sequential) 给药。

[0007] 适合的抗高血压药包括 ACE 抑制剂, 如喹那普利 (quinapril)、卡托普利 (captopril)、赖诺普利 (lisinopril)、贝那普利 (benazepril)、培哚普利 (perindopril)、马来酸依那普利 (enalapril maleate)、群多普利 (trandolapril)、雷米普利 (ramipril) 和西拉普利 (cilazapril); β 阻断剂, 如阿替洛尔 (atenolol)、特他洛尔 (terbutolol)、酒石酸美托洛尔 (metoprolol tartrate)、富马酸比索洛尔 (bisoprolol fumarate)、奈比洛尔 (nebivolol)、塞利洛尔 (celiprolol) 和吲哚洛尔 (pindolol); Ca^{++} 拮抗剂, 如硝苯地平 (nifedipine)、地尔硫卓 (diltiazem)、氨氯地平 (amlodipine)、维拉帕米 (verapamil) 和非洛地平 (felodipine); α 阻断剂, 如甲基多巴 (methyldopa)、多沙唑嗪 (doxazosin)、可乐定 (clonidine) 和哌唑嗪 (prazosin); 血管紧张素 II 拮抗剂, 如厄贝沙坦 (irbesartan)、坎地沙坦酯 (candesartan cilextil)、奥美沙坦酯 (olmesartan medoxomil)、缬沙坦 (valsartan)、氯沙坦 (losartan)、替米沙坦 (telmisartan) 和甲磺酸依普罗沙坦 (eprosartan mesylate); α/β 阻断剂, 如卡维地洛 (carvedilol) 和拉贝洛尔 (labetalol); 和利尿剂, 如苄氟噻嗪 (bendroflumethiazide)、吡咯他尼 (piretanide)、氯噻酮 (chlorthalidone) 和氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide) (HCTZ)。

[0008] 本发明的优点包括下述内容:

[0009] • 在不使用任何其它抗高血压药的情况下, 核黄素可用于降低血压。

[0010] • 当其它抗高血压药和核黄素同时、分开或依次给药时, 实现所需效果的其它抗高

血压药的量可有利地降低,即需要更少量的药物用于有效治疗或预防受试者的血压升高,由此降低了常规抗高血压药的任何不希望的副作用。

[0011] 根据本发明的第三方面,提供了一种治疗或预防 MTHFR C677T 多态性是纯合型或杂合型的受试者的血压升高的方法,该方法包括向受试者给药核黄素。

[0012] 本发明的药物或产品优选为适于口服或胃肠外给药的剂型。适合口服的剂型包括片剂、胶囊(包括缓释胶囊)、丸剂、粉末剂、颗粒剂等。胃肠外给药包括,例如,静脉内、肌内、动脉内、腹膜内、鼻内、膀胱内(如,到达膀胱)、皮内、局部或皮下给药。适合的胃肠外剂型包括无菌注射水溶液或分散剂,和用于制备无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。优选的给药途径为口服。

[0013] 核黄素可以与对于口服或胃肠外给药是药学相容的或可接受的载体一起给药,这根据所使用的具体给药类型进行选择。对于口服给药,核黄素可与一种或多种对于制备适合口服剂型为固体非活性的成分一起给药。例如,核黄素可与至少一种赋形剂一起给药,所述赋形剂如填充剂、粘合剂、保湿剂、崩解剂、溶解迟缓剂、吸收促进剂、润湿剂、吸收剂或润滑剂。对于胃肠外给药,核黄素可与适当的载体或稀释剂一起给药,所述载体或稀释剂如水、乙醇、盐水溶液、右旋糖(葡萄糖)水溶液和相关的糖溶液、甘油或二醇如丙二醇或聚乙二醇。

[0014] 在所有情况中,核黄素的剂量在饮食参考水平直到且包括认为是安全的最大水平的范围内。虽然,与许多其它营养素不同,对于核黄素没有建立法定的上限耐受水平,但是通常认为即使非常高的剂量也是安全的,证据表明高达 500mg/ 天的水平是可接受的,没有副作用。与之相比,对于成人推荐的核黄素的饮食水平的范围为 1.1-1.8mg/ 天。药物或产品最优选地配制成向受试者给予大约 1.6mg/ 天的核黄素。然而,药物或产品也可以配制成向受试者给予多于或少于 1.6mg/ 天的核黄素。例如,适合的剂量可以为约 0.5mg/ 天至 50mg/ 天,优选为约 0.75mg/ 天至 20mg/ 天,更优选为约 1mg/ 天至 10mg/ 天,更优选为约 1.2mg/ 天至 5mg/ 天,甚至更优选为约 1.4mg/ 天至约 5mg/ 天。

[0015] 本发明也用于个体化营养领域。人们越来越关注基因-营养素的相互作用,且更关注基因因素,近几年来出现了个体化营养市场。这种基于饮食需要的方法应该不仅考虑通常的因素,如年龄和性别,还应考虑对于受试者特异性的遗传因素。例如,受试者可检测它们的 MTHFR 基因型,然后进一步选择低剂量的核黄素,特别是如果他们被发现具有 TT 或 CT 基因型。

[0016] 本发明也应用于临床药物实验设计,如检测新的抗高血压药物。为了成功地进行和正确地解释这些实验,将 MTHFR C677T 多态性是 TT 基因型的那些与低剂量核黄素的组合分组且随机对待不同治疗组是重要的。

[0017] 实施例 1 :CVD 患者

[0018] 材料和方法

[0019] 招募受试者

[0020] 由 University of Ulster 和 Altnagelvin Hospital Trust, Londonderry, Northern Ireland 的研究伦理委员会都批准了本发明的伦理标准。从 Altnagelvin 医院心脏科招募早发的 CVD 患者,发病时男性年龄 ≤ 55 岁,且女性年龄 ≤ 65 岁。通过 ECG 变化诊断,表明患者先前患有心肌梗塞(MI) 或心绞痛。基于口腔拭子样本(buccal swab sample),

根据 MTHFR 基因型筛选可能的参与者 ($n = 404$)。鉴定 TT 基因型的那些参与者 ($n = 54$)；他们在年龄和性别上与相似数量的 CC 或 CT 基因型的患者匹配,得到总共 197 名患者, 它们被邀请参与到当前的干预性研究中(参见图 1)。对于所有受试者的淘汰标准是肝或肾的疾病史, B- 维生素补充剂使用者, 服用已知干扰叶酸代谢的药物的人们, 取血前至少在 MI 之后 3 个月。所有志愿者提供书面同意, 且完成健康和医药 / 生活方式问卷调查, 问卷中包括涉及 CVD 的家族史和吸烟习惯的问题。

[0021] 研究设计

[0022] 该研究为 16- 周安慰剂对照干预实验。根据在每个基因型组中患者最初筛选的血浆高半胱氨酸, 将患者分组, 且随后使每组随机接受核黄素 (1.6mg/ 天) 或安慰剂, 如图 1 所示。为了产生最大化的顺应性, 以 7- 天药丸盒, 每 4 周向患者提供核黄素, 并要回任何未使用的药丸, 做记录。在 Altnagelvin 医院、他们的工作间或家中, 收集筛选时和干预后的未禁食的血液样品。

[0023] 血压和人体测量的检测

[0024] 血压检测使用 Omcron 705CP 电子血压监测仪 (Medisave, Dorset, UK) 以 2 次检测 (间隔 15 分钟) 的平均值记录。体重 (kg) 和身高 (m) 用于计算 BMI (体重 (kg) / 身高²(m))。也测量腰围 (cm)。所有检测使用 Seca 批准的仪器 (BroschDirect, Ltd, Peterborough, UK) 进行。

[0025] 收集样品

[0026] 从每个患者收集 1 份 30ml 的血样, 1 个用于血浆和洗过的红细胞的 9ml EDTA 管, 1 个用于制备血红细胞溶产物和检测血红蛋白 (HB) 以及血细胞压积 (PCV) 的 4ml EDTA 管; 1 个用于血清提取的 8ml 血清分离管, 1 个用于脂质概况分析的 5ml 血清分离管和 1 个用于凝结筛选 (coagulation screening) 的 4ml 柠檬酸钠管。将 9ml EDTA 迅速用锡纸包起来并置于冰上。在取样的 2 小时内, 将样品于 3000rpm 离心 15 分钟。移出血浆并储存于 -80°C 以用于血浆高半胱氨酸和 PLP 分析。移出棕黄层 (buffy layer) 以用于确定 MTHFR 基因型并储存于 -20°C 。剩余血红细胞用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 3 次, 每次洗涤后弃去上清液和剩余的棕黄层。移出洗过的红细胞并储存于 -80°C 以用于 EGRac 分析 (核黄素状况的功能指示剂)。移出血清并储存于 -80°C 以用于分析血清叶酸。

[0027] 生化分析

[0028] 使用 Abbott Imx 分析仪通过免疫测定检测血浆高半胱氨酸 (Leino A., 1999, "Fully automated measurement of total homocysteine in plasma and serum on the Abbott IMx analyzer." Clin. Chem, 45, 569-71)。使用冷藏保存的, 微量滴定板方法, 通过微生物学测试检测血清叶酸和血红细胞叶酸浓度 (Molloy 等人, 1997, "Microbiological assay for serum, plasma, and red cell folate using cryopreserved, microtiter plate method." Methods Enzymol, 281, 43-53)。通过具有荧光检测的反相高压液相色谱 (HPLC) 测定血浆 PLP (Bates 等人, 1999, "Plasma pyridoxal phosphate and pyridoxic acid and their relationship to plasma homocysteine in a representative sample of British men and women aged 65 years and over." British Journal of Nutrition, 1, 191-201)。MTHFR C677T 基因型的鉴定使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增然后 HinF1 进行 (Frosst 等人, 1995, "A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation

inmethylenetetrahydrofolate reductase.”Nat Genet,10,111-113)。核黄素状况根据 EGRac 测定,所述 EGRac 为一种功能测试,其在添加和不添加 FAD 下检测谷胱甘肽还原酶的活性。然后以 FAD- 刺激与未刺激的酶活性的比计算 EGRac (Powers 等人,1983, “The relative effectiveness of iron and iron with riboflavin in correcting a microcytic anaemia in men and children in rural Gambia.”Hum Nutr Clin Nutr,37, 413-425),且通常认为值 ≥ 1.3 反应欠佳的核黄素状况。凝结筛选由 ACI Instrumentation Laboratories 检测。HB 和 PCV 使用 Sysmex XE-2100 (Sysmex, UK Ltd. Milton Keynes UK) 分析仪检测,且脂质概况使用 Abbott Architect CI 8200 分析仪 (Abbott Laboratories, USA) 检测。对于所有测试,样品进行双盲分析,一式两份,且在收集的 1 年内进行。通过重复分析各批储存的收集的洗过的血红细胞 (对于 EGRac),对于高半胱氨酸和 PLP 的血浆和对于叶酸的血清 (覆盖大范围值) 提供品质控制。

[0029] 统计学分析

[0030] 所有统计学分析使用社会科学使用的 SPSS 统计软件包进行 (version 11.0, SPSS UK Ltd., Chersey, United Kingdom)。出于标准化的目的,统计分析前视需要将变量进行 log- 转化。使用具有 Tukey’s post hoc 测试的单因素 ANOVA 检测基因型组之间基线特征的差异。使用 χ^2 分析评估分类数据。相关性分析使用双变量 Pearson 相关系数进行。每个基因型组中核黄素干预的效果使用配对 t- 检验检测。P 值 < 0.05 认为具有显著性差异。

[0031] 结果

附图说明：

[0032] 图 1 表示研究设计的流程图。

[0033] 图 2(i) 表示在健康对照中 MTHFR 基因型组的高半胱氨酸浓度 ($\mu\text{mol/l}$) ;图 2(ii) 表示在健康对照中 MTHFR 基因型组的收缩压 (mmHg) ;且图 2(iii) 表示在健康对照中 MTHFR 基因型组的舒张压 (mmHg)。图 2(i)、2(ii) 和 2(iii) 中的值为平均值 (标准误差柱)。不同的字母表示 MTHFR 基因型组之间的统计学明显差异,使用 Tukey post-hoc 测试的 ANOVA, $P < 0.05$ 具有统计学明显差异。在图 2(i)-2(iii) 中,字母“a”表示值与其它“a”值没有明显差异 ;且字母“b”表示值与其它“b”值没有明显差异,但与“a”表示的值具有差异。

[0034] 图 3(i) 表示在早发 CVD 患者中 MTHFR 基因型组的高半胱氨酸浓度 ($\mu\text{mol/l}$) ;图 3(ii) 表示在早发 CVD 患者中 MTHFR 基因型组的收缩压 (mmHg) ;且图 3(iii) 表示在早发 CVD 患者中 MTHFR 基因型组的舒张压 (mmHg)。图 3(i)、3(ii) 和 3(iii) 中的值为平均值 (标准误差柱)。不同的字母表示 MTHFR 基因型组之间的统计学明显差异,使用 Tukey post-hoc 测试的 ANOVA, $P < 0.05$ 具有统计学明显差异。在图 3(i)-3(iii) 中,字母“a”表示值与其它“a”值没有明显差异 ;且字母“b”表示值与其它“b”值没有明显差异,但与“a”表示的值具有差异。字母“ab”表示值与“a”或“b”表示的值没有明显差异。

[0035] 健康个体中的基线数据：

[0036] 参见图 2,关于血高半胱氨酸水平,与 CT 或 CC 基因型相比,对于 MTHFR C677T 多态性为纯合型的健康个体 (即,TT 基因型) 的表型观察到血高半胱氨酸浓度升高。对于相应的血压水平,发现与 CT 或 CC 基因型中的值相比,TT 基因型的健康个体的收缩压或舒张压

没有升高,如图 2 所示。

[0037] 早发 CVD 患者的基线数据:

[0038] 早发 CVD 患者通常定义为对于男性 55 岁以前,对于女性 65 岁以前发展成为 CVD 的受试者。参见图 3,与 CC 和 CT 患者相比,具有早发 CVD 且具有 TT 基因型的患者的血高半胱氨酸浓度升高。也关注到,与 CC 患者相比,发现 TT 患者的收缩压和舒张压明显升高,如图 3 所示。与 CC 和 TT 患者相比,发现 CT 个体具有中等水平的舒张压(如图 3 所示)。由于健康 TT 受试者相对于其它基因型组血压没有显示出升高,因此上述结果是意想不到。所有患者在取样时正在服用一种或多种抗高血压药,如下表 1 所示,但从图 3 中清楚地看出药物在 TT 基因型组中相对无效。

[0039] 表 1

[0040] 在取样时,患者 (n = 161) 服用的抗高血压药

[0041]

抗高血压药	%患者
β 阻断剂	38
Ace 抑制剂	18
钙通道阻断剂	6
利尿剂	3
Ace 抑制剂 + β 阻断剂	18
Ace 抑制剂 + 利尿剂	4
Ace 抑制剂 + 钙通道阻断剂	1
β 阻断剂 + 钙通道阻断剂	2
β 阻断剂 + 利尿剂	6
钙通道阻断剂 + 利尿剂	0.6
Ace 抑制剂 + 钙通道阻断剂 + 利尿剂	0.6
β 阻断剂 + 钙通道阻断剂 + 利尿剂	0.6

[0042] 根据 MTHFR 基因型 (TT、CT 或 CC) 分类的早发 CVD 患者的基线特征示于下表 2 中。参见表 2,与 CC 患者相比,观察到 TT 患者的收缩压和舒张压显著地升高。发现 CT 患者具有中等值的舒张压。也关注到,TT 患者的血压升高水平强烈地受核黄素状况的影响;出人意料地发现 TT 基因型和低核黄素状况组合的患者的血压明显升高。

[0043]

表2: 通过MTHFR 677C → T 基因型分组的早发心血管疾病患者的基线特征

	MTHFR 基因型				P
	所有 (n = 197)	CC (n = 67)	CT (n = 76)	TT (n = 54)	
大体特征					
现在年龄(y)	53.2 (5.8)	53.4 (6.1)	52.6 (5.0)	54.0 (6.4)	0.382
发病年龄(y)	46.9 (6.1)	47.1 (5.6)	46.9 (5.4)	47.1 (7.5)	0.891
男性(%)	75.1	78.1	69.7	78.2	0.303
CVD 家族史(%)	68.0	68.7	65.8	70.4	0.763
早发 CVD 家族史(%)	41.6	40.3	50.0	31.5	0.127
现在吸烟者(%)	32.0	31.3	27.6	38.9	0.209
体重指数(kg/m ²)	29.1 (4.6)	29.3 (4.8)	28.7 (4.5)	29.3 (4.5)	0.724
腰围(cm)	95.1 (12.1)	96.3 (11.9)	94.2 (11.4)	95.0 (13.4)	0.625
凝血时间(秒)	13.9 (3.1)	13.7 (2.8)	14.1 (3.4)	13.6 (2.3)	0.700
纤维蛋白原浓度(g/l)	3.93 (0.92)	3.93 (0.84)	3.97 (1.05)	3.88 (0.83)	0.853
总胆固醇(mmol/l)	4.5 (0.9)	4.4 (0.81)	4.5 (0.8)	4.5 (1.0)	0.849
B-维生素状况					
血浆高半胱氨酸(μmol/l)	10.9 (5.3)	9.8 (3.3) [*]	10.5 (3.9) ^{ab}	12.8 (8.0) ^b	0.007
EGRac	1.38 (0.20)	1.37 (0.17)	1.39 (0.22)	1.37 (0.19)	0.854
红细胞叶酸(nmol/l)	959(455)	1030(518) [*]	1011(400) [*]	796(408) ^b	0.009
磷酸吡哆醛(nmol/l) (B-6)	61.0(37.0)	68.0(35.0) [*]	63.2(40.4) ^{ab}	49.4(32.0) ^b	0.017
血压					
收缩压(mmHg)	135.0 (19.6)	131.1 (18.0) [*]	133.0 (19.7) [*]	142.8 (19.5) ^b	0.002
通过下列核黄素状况:					
低核黄素状况	137.1 (20.5)	131.2 (20.4) [*]	135.8 (19.0) [*]	147.4 (19.8) ^b	0.005
高核黄素状况	132.5 (18.5)	131.0 (14.8)	129.6 (20.4)	138.6 (19.2)	0.172
舒张压(mmHg)	83.0 (12.2)	80.3 (12.5) [*]	83.3 (11.5) ^{ab}	86.0(12.3) ^b	0.038
通过下列核黄素状况:					
低核黄素状况	84.1 (12.8)	80.8 (13.5)	84.6 (11.8)	88.1 (12.7)	0.076
高核黄素状况	81.7 (11.4)	79.6 (11.2)	81.9 (11.1)	84.1 (12.2)	0.381

值为平均值(SD)。使用具有 tukey post hoc 测试的单因素 ANOVA 比较各基因型组之间的值。

缩写: MTHFR, 亚甲基四氢叶酸还原酶; 红细胞谷胱甘肽还原酶活化因子(核黄素状况, 较高的 FGRac 值表示较低的维生素状况); “较高”和“较低”的核黄素状况使用每个基因型组中的中间 EGRac 值定点(cut-off)测定。

[0044] 早发 CVD 患者的干预数据

[0045] 参见下表 3, 在 181 名早发 CVD 患者中的安慰剂对照干预研究中, 给药低剂量的核黄素 16 周后, TT 基因型的患者的收缩压和舒张压明显降低。血压响应具有统计学意义和临床意义。对于核黄素响应观察到的血压降低(收缩压降低了 11 个单位且舒张压降低了 8 个单位)可以从荟萃分析(meta-analyses)评估, 心脏病风险降低了 29%, 且中风风险降低了 46%。结果表明核黄素实现了明显且临床上重要的血压降低, 尤其是在 TT 基因型患者中。参见表 3, 在给药核黄素的 CC 患者中没有观察到血压的显著降低(收缩压和舒张压均未降低)。

[0046]

表 3: 早发 CVD 患者中对于核黄素干预 16 周的响应

MTHFR 基因型					
CC 安慰剂 (n=32)			CC 核黄素 (n=32)		
之前	之后	P	之前	之后	P
高半胱氨酸($\mu\text{mol/l}$)	9.5(2.8)		10.1(3.9)	9.8(3.6)	0.271
EGRac	1.40(0.19)		1.34(0.16)	1.24(0.07)	<0.001
血清叶酸($\mu\text{g/l}$)	12.1(8.5)		10.5(6.5)	12.0(7.5)	0.094
红细细胞叶酸(nmol/l)	1063(589)		1021(557)	1075(526)	0.427
收缩压(mmHg)	126.6(20.4)		134.3(14.9)	133.4(15.3)	0.733
舒张压(mmHg)	79.3(14.9)		80.1(8.9)	80.4(12.0)	0.881
CT 安慰剂 (n=33)			CT 核黄素 (n=35)		
之前	之后	P	之前	之后	P
高半胱氨酸($\mu\text{mol/l}$)	11.2(4.1)		10.5(3.8)	10.6(6.3)	0.881
EGRac	1.41(0.22)		1.38(0.24)	1.25(0.13)	<0.001
血清叶酸($\mu\text{g/l}$)	7.83(4.34)		10.41(6.61)	11.80(11.01)	0.342
红细细胞叶酸(nmol/l)	991(388)		1008(400)	1022(460)	0.759
收缩压(mmHg)	133.6(21.5)		136.2(16.9)	135.4(15.4)	0.708
舒张压(mmHg)	82.0(12.1)		86.0(10.8)	84.2(9.2)	0.336
TT 安慰剂 (n=24)			TT 核黄素 (n=25)		
之前	之后	P	之前	之后	P
高半胱氨酸($\mu\text{mol/l}$)	11.8(6.7)		11.3(4.4)	10.0(3.1)	0.014
EGRac	1.32(0.12)		1.41(0.20)	1.27(0.09)	<0.001
血清叶酸($\mu\text{g/l}$)	7.7(6.6)		8.1(4.8)	9.6(8.1)	0.244
红细细胞叶酸(nmol/l)	808(488)		845(303)	889(306)	0.305
收缩压(mmHg)	143.8(18.1)		142.8(22.1)	131.6(20.9)	0.005
舒张压(mmHg)	84.5(10.7)		88.1(14.2)	80.2(14.2)	0.002

值为平均值(SD)。各治疗组中干预前和后的值使用配对 t-检验比较。

缩写: MTHFR, 亚甲基四氢叶酸还原酶; EGRac, 红细细胞谷胱甘肽还原酶活化因子(核黄素状况, 较高的值表示较低状况)

[0047] 实施例 2: 健康对照

[0048] 根据 MTHFR C677T 基因型, 研究健康个体中核黄素和血压之间的关系。根据上述

实施例 1 中所述的方法进行检测并记录。所得结果,即对于 MTHFR 基因型预筛和年龄匹配的健康受试者的基线特征 ($n = 124$),如表 4 中所示。

[0049] 表 4

[0050]

大体特征	MTHFR C677T 基因型			P
	CC (n=46)	CT (n=34)	TT (n=44)	
年龄(y)	51.4 (4.0)	51.4 (3.0)	50.8 (5.1)	0.718
男性(%)	69.6	85.3	75	0.264
BMI (kg/m ²)	28.1 (4.8)	28.0 (4.2)	28.6 (4.6)	0.791
腰围(cm)	90.4 (11.9)	90.6 (12.3)	93.6 (13.5)	0.434
收缩 BP (mmHg)	132.9 (16.5)	134.8 (15.8)	137.4 (19.8)	0.473
舒张 BP (mmHg)	84.1 (13.2)	86.4 (8.7)	88.1 (13.9)	0.315
生化检测				
血浆高半胱氨酸($\mu\text{mol/l}$)	9.3 (1.9)a	8.9 (2.1)a	14.1 (8.0)b	<0.001
核黄素状况(EGRac)	1.34 (0.17)	1.37 (0.15)	1.38 (0.16)	0.492
红细胞叶酸(nmol/l)	874 (357)	955 (433)	748 (412)	0.071
维生素 B6 状况(PLP; nmol/l)	79.1 (47.4)	79.7 (38.7)	68.3 (35.5)	0.370

[0051] 值为平均值 (SD)。使用 ANOVA 比较基因型组之间的值;总 P 值 < 0.05 表明在 3 个基因型组之间具有统计学明显的差异。字母表示存在差异;不同的字母 (a, b) 表示在任何 2 个基因型之间具有显著性差异,相反相同的字母表示任何 2 个基因型之间的值没有显著性的差异 (Tukey post hoc 测试)。因此,字母“a”表示值与其它“a”值没有显著性差异;且字母“b”表示值与其它“b”值之间没有显著性差异,但与“a”表示的值之间有显著性差异。

[0052] 如实施例 2 中所得的结果所示 (表 4),与 CC 或 CT 基因型组相比,TT 基因型个体没有表现出明显更高的收缩压或舒张压。然而,虽然它们确实证明对于该 TT 基因型的典型表型具有明显的升高的血浆高半胱氨酸和趋于降低的叶酸状况,如表 4 所示,但是叶酸状况的差异没有达到统计学意义的程度 (因为 P 值没有 < 0.05)。

[0053] 健康个体中的干预数据

[0054] 在 81 个健康个体中进行安慰剂对照干预研究。研究健康个体中 MTHFR 基因型中血压对于核黄素干预 (1.6mg/天,持续 16 周) 的响应,且结果示于表 5 中。

[0055] 参见 P 值,表 5 的结果表明核黄素在 TT 基因型健康组中没有明显降低收缩压或舒张压。因此,上述实施例 1 中讨论的具有 TT 基因型的 CVD 患者中核黄素降低收缩压和舒张压是出人意料的,且具有统计学和临床意义。

[0056] 参见表 5 中所示的 P 值, 统计学分析表明基因型中对于核黄素或安慰剂的响应, 血压没有明显升高或降低, 有 1 个例外, 即 CC 组中核黄素治疗升高了舒张压。同样, 这是出人意料的, 该结果可能是因为偶然或相对小的样本量。即使考虑在 CC 组中对于核黄素的该响应, 注意到发现核黄素升高了健康 CC 个体的舒张压, 因此实施例 1 中所讨论的核黄素降低具有 TT 基因型的 CVD 患者的收缩压和舒张压更是出人意料的。

[0057]

表 5 健康受试者 MTHFR 基因型中血压对于核黄素干预(1.6mg/天, 16 周)的响应

MTHFR 677C → T 基因型							
CC (n=25)				CT (n=30)			
	之前	之后	P-值	之前	之后	P-值	TT (n=26)
收缩压 (mmHg)							
安慰剂	中值 136.0(124.7, 140.2)	129.0(120.3, 141.0)	0.663	147.0(136.5, 151.5)	142.0(132.1, 156.1)	0.981	146.0(135.5, 157.8) 150.0(141.6, 157.8) 0.395
核黄素治疗	中值 137.0(121.9, 148.4)	143.5(129.8, 156.2)	0.077	150.0(135.5, 153.3)	150.0(137.2, 153.4)	0.797	139.5(129.9, 142.5) 145.0(133.3, 151.1) 0.970
舒张压 (mmHg)							
安慰剂	中值 83.0(77.2, 93.0)	83.0(76.6, 85.74)	0.286	87.0(83.7, 92.8)	88.0(81.3, 95.0)	0.970	90.0(82.8, 94.1) 86.0(83.6, 95.5) 0.698
核黄素治疗	中值 80.5(73.7, 88.3)	86.5(78.7, 91.9)	0.033	87.0(82.7, 94.2)	89.0(83.3, 94.7)	0.767	88.5(81.1, 91.6) 88.5(82.8, 95.1) 0.172

值为中值(95%置信区间)
干预之前和之后的血压使用配对 t-检验比较。P 值<0.05 表明干预前后具有统计学明显的差异。

根据 MTHFR 基因型¹筛选早发 CVD 患者

n = 404

所有早发 CVD 患者通
过 MTHFR 基因型检测

同意参与干涉性研究, 其它基
因型的年龄/性别与 TT 患者匹
配。患者随机(通过基因组)
接受核黄素 1.6mg/天或安慰剂

从研究中排除

完成干预

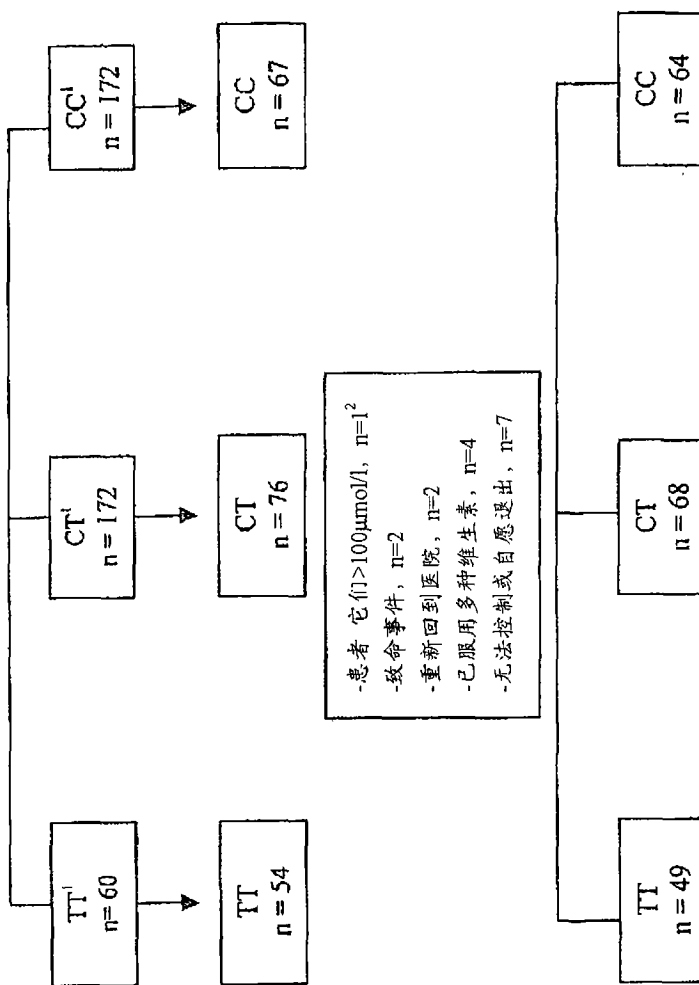


图 1: 研究设计的流程图。对于 MTHFR677C → T 多形态,¹CC (野生型), CT (杂合型) 和 TT (纯合型) 基因型。2 一个具有明显高的高半胱氨酸基线水平 (130.4 μmol/l) 的患者表明其具有代谢疾病; 通知该患者的医师, 并将该患者从当前研究中排除。

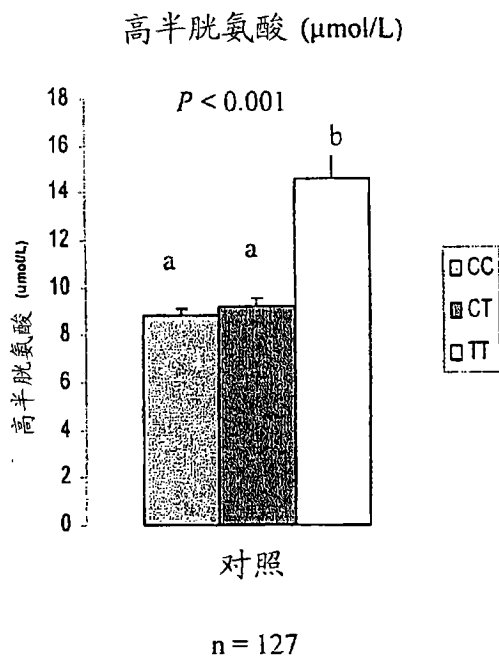


图 2(i)

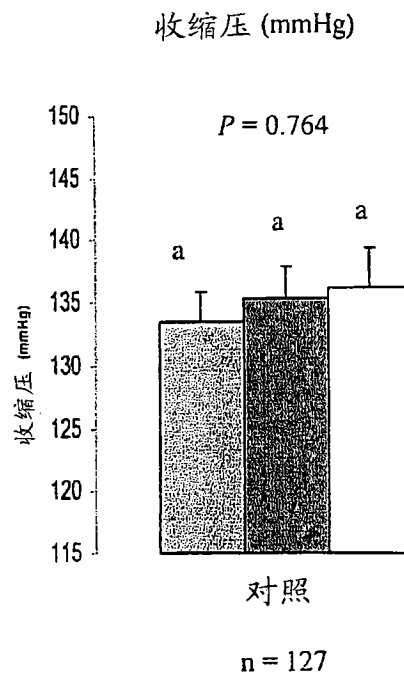


图 2(ii)

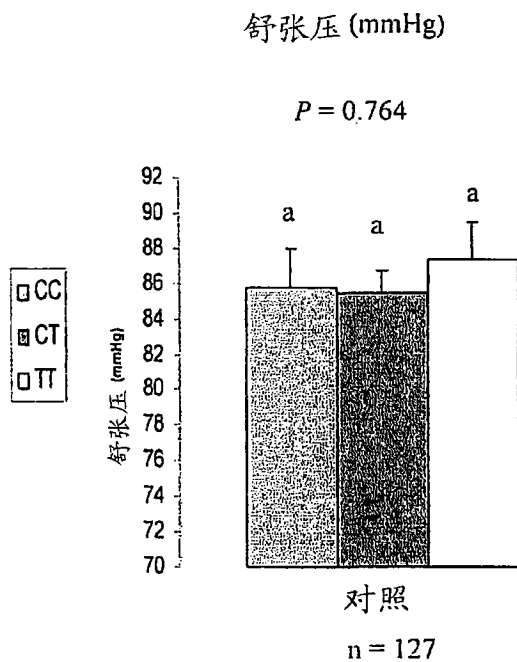


图 2(iii)

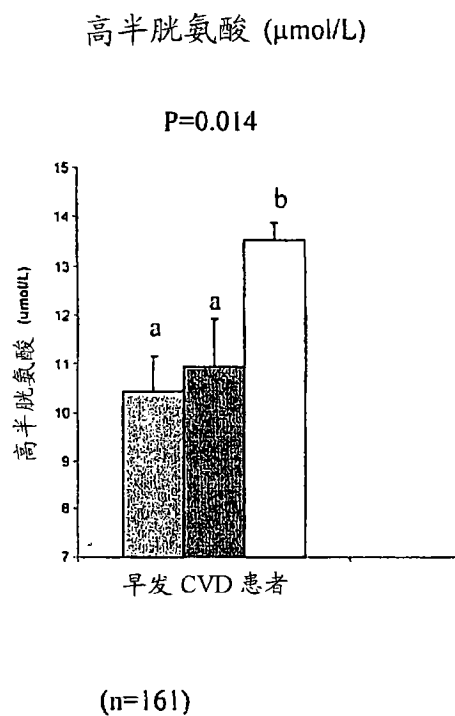


图 3(i)

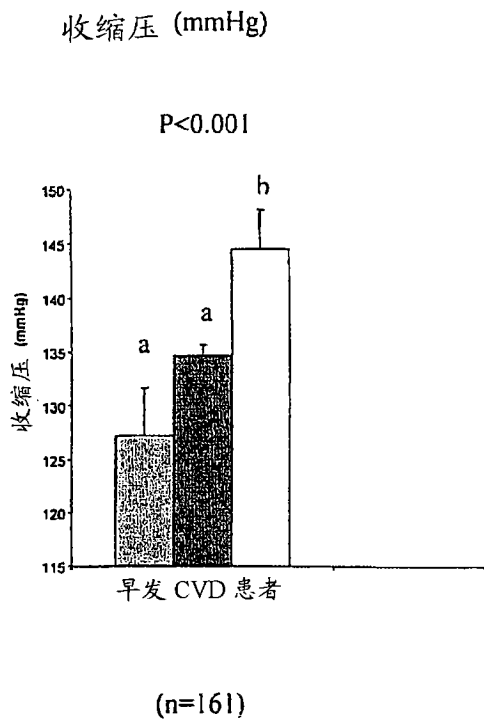


图 3(ii)

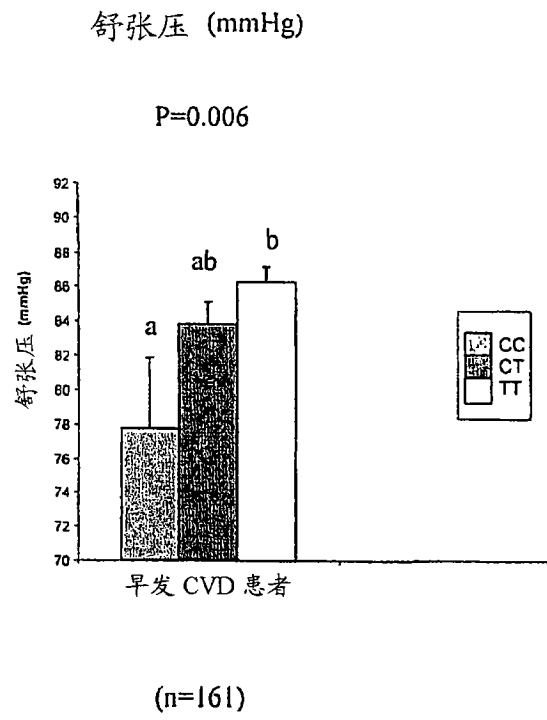


图 3(iii)