



中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

Valsartan 合併 Aliskiren 使用可有效改善由
單側輸尿管阻塞所造成的腎臟纖維化

A reduction of unilateral ureteral obstruction
induced renal fibrosis by a therapy combined
valsartan with aliskiren

指導教授：顧正崙 教授

共同指導教授：吳明儒 教授

研究生：巫文平

中華民國九十九年六月

中文摘要:

腎臟纖維化(Renal fibrosis)在慢性腎臟病中是一個重要的病理變化。大鼠的單側輸尿管阻塞 (Unilateral Ureteric Obstruction, UUO) 是表現間質炎性細胞浸潤和腎小管擴張並造成阻塞腎臟的腎小管間質纖維化的一個動物模式。以血管張力素轉換酶抑制劑 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 、血管張力素受體阻斷劑 (angiotensin receptor blocker, ARB)或腎素直接抑制劑 (direct renin inhibitor, DRI) 阻斷腎素—血管張力素—醛固酮系統 (rennin-angiotensin-aldosterone system)或在糖尿病腎病變中已證實有保護腎臟的作用。在這項研究中，我們經由病理檢查、免疫組織化學特殊染色分析(immunohistochemical analysis)、西方墨點分析(Western blot)、反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-PCR) 和血液的檢測來評估 valsartan 與 aliskiren 合併治療對 UUO 所誘導的腎纖維化的療效。我們分別在 UUO 後第七天和第十四天做評估。在這兩個不同天數的大分組中，又細分有五個小組，分別是假性手術組、UUO 手術加安慰劑組、valsartan 治療組、aliskiren 治療組及合併治療組。我們觀察到合併治療或單獨治療都可顯著減少阻塞的腎臟的重量及長度，也就是改善水腎的程度。特別的是，合併治療具有最佳的效果。合併治療也比單獨使用 aliskiren 或 valsartan 明顯減弱 UUO 所造成

的腎小管擴張、腎間質容積、腎間質膠原蛋白沉積、 α -平滑肌肌動蛋白的增加、ERK 1/2 的活化、單核細胞／巨噬細胞的浸潤、snail-1 和 β 1 型轉化生長因子 (TGF- β 1) 的訊息核糖核酸 (m-RNA) 的表現。總結來說，合併治療明顯地減弱大鼠 UUO 所導致的腎纖維化中的腎小管間質損傷，而且比 aliskiren 或 valsartan 單一治療效果更好。



Abstract:

Renal fibrosis is an important pathologic change in chronic kidney disease. Unilateral ureteral obstruction (UUO) in the rodent is a model exhibiting interstitial inflammatory cell infiltration and tubular dilatation followed by tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney. The blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system with either angiotensin converting enzyme inhibitor, angiotensin receptor blocker or direct renin inhibitor has renoprotective effect in diabetic nephropathy. In this study, we investigate the effect of a therapy combined aliskiren with valsartan on UUO-induced renal fibrosis by the pathologic examination, Western blot and reverse transcriptase PCR. Point counting method was used for scores of interstitial volume, interstitial collagen deposition, interstitial α -SMA and tubular dilatation to evaluate degree of renal fibrosis. We observed that the combination therapy or each alone all significantly blunted the degree of hydronephrosis determined by the increase of weight and length of the obstructed kidney. Specially, the combination therapy has the best renoprotective effect. The combination therapy also attenuated UUO related increases on the scores of tubular dilatation, interstitial volume, interstitial collagen deposition, α -smooth

muscle actin, the activation of ERK 1/2, the infiltrate of monocyte/macrophage, the mRNA expression of snail-1 and transforming growth factor- β 1 to a greater extent than aliskiren or valsartan used alone. In conclusion, the combination therapy significantly attenuates tubulointerstitial damage in rat model of UUO-induced renal fibrosis and is better than a single treatment by aliskiren or valsartan alone.



誌謝

能完成這一份碩士論文，最要感謝的是吳明儒教授及顧正崙教授。一開始想讀碩士班，只是想學些東西能做一些醫學研究，於是報考了臨醫所，考上了才知道要做研究不是一件簡單的事。中國醫藥大學對我而言是一個新的環境，光是找指導教授，就因對教授們的研究方向不甚清楚，令我十分困擾。在一個偶然的聚會裡，向先前我在中榮當總醫師時指導我論文的吳明儒老師詢問是否有熟識在中國醫藥大學的老師在做腎臟方面的基礎研究。吳老師雖然在中國醫藥大學沒有教職，卻很大方的說願意指導我論文及研究。另一方面，所上的顧正崙老師，在基礎醫學也有優異的表現，同時也很熱心，同意和吳老師一起指導我論文及研究。此後在學業及研究才得以一帆風順。然而，能順利完成論文，還得要感謝很多的師長、同事和同學。首先，要感謝的是中榮徐國雄主任，在中榮期間對我的指導，也一直鼓勵我做研究。再來，要感謝連榮達院長、黃忠餘主任多年來的鼓勵。當然，還要感謝科內同仁李智威醫師的協助，使我在上課及實驗時無後顧之憂。另外，感謝中榮的研究團隊，文美卿醫師、邱雲棕博士、張其皓及洪佳芳，協助實驗室的工作。此外，更感謝藍先元所長，林清淵教授、曾昱綸教授和佘玉萍教授等許多臨醫所老師，對我的論文寫作和基礎研究的指導。

最後，僅將我的成果與喜悅獻給：最支持我的太太淑娟，我的父母、岳父母、弟妹和曾經幫助我和關心我的每一個人。



論文目錄

中文摘要	I
Abstract	III
誌謝	V
中英文對照表	X
第一章、前言	1
第一節 研究背景	2
第二節 研究目的	10
第二章、研究方法	11
第一節 研究材料	11
第二節 研究設計	12
第三節 統計方法	19
第三章、研究結果	20
第一節 合併valsartan 及 aliskiren改善因UUO所造成的阻塞腎臟 的長度及重量	20
第二節 合併治療改善因UUO所造成的阻塞腎臟的病理表現	21
第三節 合併治療降低因UUO造成的阻塞腎臟的 α 型平滑肌動蛋白 及膠原蛋白的表現	22

第四節 合併治療降低因UUO造成的阻塞腎臟的單核細胞／巨噬 細胞的浸潤及ERK 1/2的磷酸化-----	24
第五節 合併治療降低因UUO造成的阻塞腎臟的β1型轉化生長因 子(Transforming growth factor-β1) mRNA的表現-----	25
第六節 合併使用valsartan 及 aliskiren改變因UUO造成的阻塞腎 臟的血漿腎素活性-----	25
第四章、討論-----	27
第一節 結果討論-----	27
第二節 其他相關性討論-----	30
第三節 研究限制-----	32
第五章、結論與建議-----	33
第一節 結論-----	33
第二節 建議-----	33
參考文獻-----	34

附圖目錄

圖1、腎素-血管張力素-醛固酮系統-----	44
圖2、Aliskiren 分子結構式-----	46
圖3、阻斷RAS 在UUO 後7 天及14 天可改善因UUO 所造成的阻 塞腎臟的長度及重量-----	47
圖4、阻塞腎臟橫切面變化-----	48
圖5、阻斷RAS減少單側輸尿管阻塞手術後第十四天的大鼠腎臟腎 小管間質之變化-----	49
圖6、阻斷RAS減少單側輸尿管阻塞手術後第七天和第十四天的大鼠 腎臟腎小管間質損傷之嚴重度積分-----	51
圖7、西方墨點分析發現合併治療比單獨使用aliskiren 或valsartan 更能減少單側輸尿管阻塞手術後十四天第四型膠原蛋白(collagen IV) 的增加和 α -SMA 及phospho-ERK 1/2 之表現-----	53
圖8、Snail 1 及 TGF- β 1 在假性手術，UUO 手術後十四天以安慰 劑，valsartan, aliskiren 及合併治療的表現-----	54
圖9、血漿腎素活性(Plasma renin activity)在UUO手術後七天及十四 天的表現-----	55

英中文對照

α -smooth muscle actin (α -SMA)	-----	α 型平滑肌動蛋白
Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor	----	血管張力素轉化酶抑制劑
Angiotensin II	-----	第二血管張力素
Angiotensin Receptor Blockade	-----	血管張力素受體阻斷劑
Collagen	-----	膠原蛋白
Direct renin inhibitor	-----	腎素直接抑制劑
Epithelial Mesenchymal Transition	-----	上皮間質轉分化
Fibroblast	-----	纖維母細胞
Macrophage	-----	巨噬細胞
Mesangial cells	-----	腎絲球間質細胞
Monocyte	-----	單核細胞
Myofibroblasts	-----	肌纖維母細胞
Plasma renin activity	-----	血漿腎素活性
Point counting method	-----	標準點計算方式
Renal fibrosis	-----	腎臟纖維化
Renin-angiotensin-aldosterone system	----	腎素-血管張力素-醛固酮系統
Reverse-transcriptase PCR	-----	反轉錄聚合酶鏈反應

Tubular dilatation -----腎小管擴張

TGF- β 1 ----- β 1型轉化生長因子

Unilateral ureteral obstruction (UUO) -----單側輸尿管阻塞

Western blot-----西方墨點分析



第一章 前言

在很多心血管和腎臟疾病的致病機轉裡，腎素-血管張力素-醛固酮系統 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAS) 的活化是一個重要的影響因子¹⁻³。透過血管張力素轉化酶抑制劑 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)，血管張力素受體阻斷劑 (angiotensin II receptor blocker, ARB) 或腎素直接抑制劑 (direct renin inhibitor, DRI) 來阻斷 RAS 已被證實是一個對高血壓、心臟衰竭、糖尿病腎病變和非糖尿病腎病變有效的治療⁴⁻⁷。單獨使用 ACEI, ARB 或 DRI 並不能完全阻斷 RAS⁸⁻⁹。因此有許多基礎及臨床醫學的研究使用不同組合的合併治療，希望能更有效改善心血管及腎臟疾病。Aliskiren 是第一個 DRI 的口服藥，其低血鉀的風險比較低。因此，我們選擇使用 DRI 取代 ACEI 來合併 ARB 治療，希望能更有效改善腎臟纖維化。

第一節 研究背景

1.1 慢性腎衰竭治療重要性

全世界末期腎臟病的患者人數快速地增加¹⁰，而且末期腎臟病也是全球很嚴重的醫療、社會和經濟問題。在台灣，根據美國腎臟資料

系統 (USRDS, 2009 Annual Data Report) 的報告顯示¹¹，在西元2007年，台灣是全世界末期腎臟病新發生率及盛行率最高的地區。這一年，台灣透析總人數有52537人，發生率則高達415人/百萬人。依照衛生署西元2002年的三高調查資料庫計算，台灣十五歲以上人口中，第三及第四期慢性腎臟病之盛行率高達6.43%。要減少末期腎臟病的發生率，解決之道除了早期發現之外，就是要設法延緩或逆轉慢性腎衰竭的進行。

1.2 腎素-血管張力素-醛固酮系統與腎臟纖維化

腎素-血管張力素-醛固酮系統 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAS) 的活化是影響心臟血管，腎臟和腦血管疾病的一個重要的影響因子¹²。傳統的路徑是當這個系統被啟動時，腎臟會分泌腎素。腎素催化血管張力素原 (Angiotensinogen) 水解產生第一血管張力素 (Angiotensin I)。第一血管張力素再經血管張力素轉化酶 (Angiotensin Converting Emzyme, ACE) 剪切 C-末端兩個胺基酸殘基而形成第二血管張力素 (Angiotensin II)。第二血管張力素會活化第二血管張力素第一型受體 (angiotensin II receptor type 1, ATR1) 使血管收縮，從而使血壓升高；第二血管張力素也能刺激腎上腺皮質分泌醛固酮 (Aldosterone)。醛固酮能促進腎臟對水和鈉離子的重吸收，繼而

增加體液容量，升高血壓。在 RAS 系統也有一些回饋(feedback)機轉及替代路徑(Alternative routes)，因此無法使用單一藥物來抑制 RAS 系統。另外最近新發現的（前）腎素受體((pro)renin receptor)也可能媒介局部的前發炎(pro-inflammatory)和前纖維化(profibrotic)作用(圖 1)。而在腎素增強子基因剔除（renin enhancer knockout，REKO）老鼠中會大大的降低腎臟的近絲球體細胞（juxtaglomerular cells，JG cells）所分泌的腎素。REKO 老鼠的血壓會降低 9 mm Hg，但若給予高鹽飲食則可部分矯正¹³。REKO 老鼠會表現活動力的降低，正常的感壓反射敏感度（baroreflex sensitivity）¹³但對壓力的心血管反應則鈍化了¹⁴。

RAS 系統和腎臟疾病有很密切的關係，第二血管張力素會造成高血壓及腎絲球壓力過高。第二血管張力素也會引起腎內出球及入球小動脈收縮，進而降低腎臟血流量，導致缺血性傷害並產生蛋白尿¹⁵。長時間後，會造成腎絲球高過率（Hyperfiltration）加速腎絲球硬化（glomerulosclerosis）及腎功能的惡化。

第二血管張力素也可經由非血行動力(non-hemodynamic)的機轉影響腎臟疾病。第二血管張力素藉由氧化壓力 (oxidative stress)，發炎性介質(inflammatory mediators)及其它的生長因子，引發細胞外間質

(extracellular matrix)堆積及細胞增生¹⁶⁻¹⁷。第二血管張力素會引發 $\beta 1$ 型轉化生長因子(transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)的產生增加，藉以媒介細胞外間質產生。單核球趨化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 在第二血管張力素的作用下也會增加。MCP-1 在腎臟病變的機轉中是一個最要的發炎性介質。第二血管張力素也會增加第一型血纖蛋白溶酶原活化劑抑制劑(plasminogen activator inhibitor, PAI-1) 的產生，而第一型血纖蛋白溶酶原活化劑抑制劑是纖維蛋白溶解 (fibrinolysis) 的主要抑制劑因此有抗蛋白水解 (antiproteolytic) 的作用，而進一步促進間質的堆積¹⁸。

在單側輸尿管阻塞 (UUO) 模式所引發的腎臟纖維化中，第二血管張力素會刺激 Nuclear factor- κB (NF- κB)的產生，進一步招募更多的巨噬細胞並產生活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS)來造成腎小管的損傷。活化的巨噬細胞會釋放如 TGF- $\beta 1$ 及 α 型腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等的細胞激素 (cytokine) 。TGF- $\beta 1$ 會促進腎小管上皮細胞產生細胞凋亡(Apoptosis)造成腎小管萎縮或者進行上皮-間質轉化 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) ，使上皮細胞轉變成纖維母細胞 (fibroblasts) 並遷移至細胞間質。內皮細胞也會經由內皮-間質轉化作用 (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) 或細胞凋亡進一步造

成微血管的流失及腎臟缺氧。在 TGF- β 1 等細胞激素的刺激下，纖維母細胞合和成應激纖維(Stress fiber)並且進一步分化成肌纖維母細胞 (myofibroblasts)。肌纖維母細胞是有收縮性並且會提高細胞外間質的堆積，進一步導致漸近性的腎間質纖維化。這些作用會被第一型血纖維蛋白溶酶原活化劑抑制劑 (PAI-1) 及組織型血纖維蛋白溶解酶原活化劑 (tissue-type plasminogen activator, tPA) 所造成的細胞外間質分解的下降所增強¹⁹。

醛固酮 (Aldosterone) 也會造成腎損傷。醛固酮會引發一些發炎性介質 (如 MCP-1、TGF- β 1 和 PAI-1) 及活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 的產生，並向上調節血管張力素 II 第一型受體 (angiotensin II receptor type 1, ATR1)。這些作用促進了血管張力素 II 有害的作用²⁰⁻²²。

因此，腎素-血管張力素-醛固酮系統與腎臟纖維化有很密切的關係，若以 ACEI、ARB 或 DRI 等 RAS 阻斷劑來治療腎臟纖維化應是一個有效的方法。

1.3 合併 ACEI 和 ARB 治療

ACEI 或 ARB 的使用在高血壓、糖尿病、心臟衰竭、腎病變和粥狀動脈硬化已成功地降低併發症及死亡率²³⁻²⁸。到西元 2009 年為止，有四個比較大型的臨床試驗在腎臟病的病人比較合併 ACEI 和 ARB 治療是否有較佳療效，它們分別是 CALM、COOPERATE、IMPROVE 和 VALERIA 研究⁸。四個臨床試驗都是隨機控制實驗 (Randomized Control Trial, RCT)，主要療效評估的標的都是蛋白尿及血壓。其中 CALM 研究發表於西元 2000 年，研究的對象是 199 個第二型糖尿病合併有微量白蛋白尿(Microalbuminuria)的病人，合併使用的藥物是 Lisinopril 及 Candesartan，追蹤的時間有 12 週²⁷。該研究發現合併治療對於尿中白蛋白排除量(urine albumin excretion, UAE)及血壓都有較大的下降，但是血清鉀離子升高及腎功能下降的比例較高。COOPERATE 研究發表於西元 2003 年，研究的對象是 263 個非糖尿病慢性腎臟病 (non-DM CKD)合併有蛋白尿(proteinuria)的病人，合併使用的藥物是 Trandolapril 及 Losartan，追蹤的時間有 36 個月²⁴。該研究發現合併治療對於尿蛋白排除量(urine protein excretion, UPE)會下降且減緩末期腎病變(End Stage Renal Disease, ESRD)的進展，另外血清鉀離子升高及副作用與單獨治療無差異。該文章為四篇中追蹤時間最長的研究，但因研究設計及資料不一致而被 Lancet 醫學期刊撤消。IMPROVE 研究發表於西元 2007 年，研究的

對象是 405 個高血壓合併有白蛋白尿的病人，合併使用的藥物是 Ramipril 及 Irbesartan，追蹤的時間有 20 週²⁹。該研究發現合併治療在有巨量白蛋白尿(macroalbuminuria)的病人中，對於尿中白蛋白排除量(UAE)有較大的下降，且在所有的病人，血壓都有較大的下降，而在高血鉀、腎功能下降及副作用與單獨治療皆無差異。VALERIA 研究發表於西元 2008 年，研究的對象是 133 個高血壓合併有微量白蛋白尿的病人，合併使用的藥物是 Lisinopril 及 Valsartan，追蹤的時間有 30 週³⁰。該研究發現合併治療對於尿中白蛋白排除量(UAE)有較大的下降，降血壓的效果則是相近，但是在高血鉀，低血壓及副作用比例則較高。統整以上四個研究，合併 ACEI 和 ARB 治療對於降蛋白尿的效果都比較好，但是高血鉀及副作用則有一半的研究顯示發生的比例較高。

然而合併 ACEI 和 ARB 治療在心血管疾病方面的研究中，有一個大型且追蹤 56 個月的 ONTARGET 研究發現 ACEI 及 ARB 的雙重抑制在有心血管問題的病人可以降低住院率卻沒有降低死亡率。然而雙重抑制比單獨使用 ACEI 或 ARB 有較高的高血鉀及腎功能惡化的風險³¹。同時，不管 ACEI 或 ARB 單獨或合併使用，通常會造成血漿腎素活性 (plasma renin activity, PRA) 的增加³²⁻³³。因此，ACEI 和 ARB 的合併使用受到了一些限制。

1.4 腎素直接抑制劑

腎素是控制 RAS 的第一個也是速率決定的步驟，早在 1950 年代，它也是研究人員認為較有潛力的阻斷 RAS 的一個方法³⁴⁻³⁵。腎素直接抑制劑經由作用於腎素的活性位置來阻斷腎素的活性³⁶⁻³⁸。使用腎素直接抑制劑會造成血漿腎素活性降低³⁹。Aliskiren 是第一個口服的腎素直接抑制劑，它的分子量是 609.8。分子結構式如圖 2。

Aliskiren 在西元 2007 年三月已得到美國 FDA 核準可單獨或合併其它藥物來治療高血壓⁴⁰⁻⁴¹。Aliskiren 在一個糖尿病腎病變老鼠的動物實驗中，使用 perindopril 及 aliskiren 皆可降低血壓、白蛋白尿及腎臟損傷⁴²⁻⁴³。Aliskiren 和 perindopril 在降低白蛋白尿及腎絲球硬化的效果相當。但是在減少腎間質纖維化的效果，Aliskiren 則比 perindopril 好。在臨床試驗方面，目前正在進行的 ALTITUDE 臨床試驗

(Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints, ALTITUDE) 將評估 Aliskiren 長期使用的心腎保護作用⁴⁴。主要試驗指標(primary endpoint)是因心血管疾病的死亡、非致命性的心肌梗塞、因心衰竭而住院、血清肌酸肝兩倍增加或者進展到末期腎病變。

次要試驗指標也包含了很多項的心腎指標。ALITUDE 臨床試驗完成之後將提供更多 Aliskiren 在心腎保護作用的證據⁴⁵。

1.5 合併使用腎素直接抑制劑

在心血管疾病的病人合併使用腎素直接抑制劑的臨床試驗，目前只有 ALOFT 研究。ALOFT 研究發表於西元 2008 年，研究的對象是 302 個心臟衰竭的病人，合併使用的藥物是 Aliskiren 及 ACEI 或 ARB，追蹤的時間有 13 週⁴⁶。該研究發現合併治療在降低血清 BNP 及尿中醛固酮有較佳的效果，血壓的下降則相近於單獨治療，而且高血鉀、低血壓及腎功能異常與單獨治療無差異。而在腎臟疾病方面，目前只有 AVOID 研究。AVOID 研究發表於西元 2008 年，研究的對象是 599 個糖尿病合併有高血壓及蛋白尿的病人，合併使用的藥物是 Aliskiren 及 Losartan，追蹤的時間有 6 個月。他們發現合併使用 aliskiren 和 losartan 在糖尿病腎病變的病人，比單獨使用 losartan 在降低蛋白尿方面多了 20% 的效果^{3,47}。而且 AVOID 研究和 ALOFT 研究一樣合併使用皆不會增加高血鉀及副作用。因此 DRI 合併 ARB 使用比 ACEI 合併 ARB 使用有較低的高血鉀風險。所以 DRI 和 ARB 的雙重抑制可能是阻斷 RAS 的一個比較理想的組合。合併腎素直接

抑制劑在糖尿病腎病變的效果有加成的效果，而我們有興趣的是這樣的治療對非糖尿病腎病變也就是腎臟纖維化是否也有同樣的加成效果。

1.6 單側輸尿管阻塞模式

不論原發的腎臟病因為何，腎臟纖維化是大部分慢性腎病變，共同及最終的病理路徑⁴⁸⁻⁵⁰。單側輸尿管阻塞（UUO）手術的動物模式會逐漸產生腎臟纖維化而且它和高血壓及免疫疾病無關^{19, 51}。UUO後阻塞的腎臟會造成腎血流動力及代謝的變化。之後會造成腎小管損傷、細胞凋亡和細胞死亡，另外會造成間質巨噬細胞的浸潤^{19, 52-54}。之前的研究已發現ARB或ACEI可以改善UUO所造成的腎小管間質纖維化⁵⁵⁻⁵⁹。因此，我們仍假設使用DRI合併ARB治療，也能有效改善腎臟纖維化。

第二節 研究目的

本研究，我們要探討aliskiren和valsartan的合併治療在UUO所引發的腎纖維化的治療效果。

第二章、研究方法

第一節 研究材料

動物：

我們選用購自國家實驗動物中心的 Spraque-Dawley 公老鼠，購入時的成鼠體重大約兩百公克左右。實驗的計畫經過台中榮民總醫院動物實驗管理小組核準。所有的大鼠都可自由攝取飼料和飲水。

試劑：

1. Peroxidase conjugated streptavidin : DAKO ChemMate detection kite
2. TRIZol reagent : Invitrogen, Carsbad, CA, USA
3. AMV-RT : (Promega, Madison, WI, USA)
4. HotStarTaq polymerase : Qiagen, Valencia, CA, USA
5. 蛋白質萃取試劑 : T-PER Pierce Biotechnology. IL, USA

抗體：

1. α -SMA antibody : 1:200 dilution, Epos system, Dako, California, USA
2. Actin antibody : Santa Cruz, CA, USA
3. TGF- β 1 antibody : rabbit anti-human TGF- β 1, 1:50 dilution, Santa Cruz Biotechnology

4. ED-1 antibody : rabbit polyclonal antibody against ED-1, 1:200 ;
seofec. Oxford UK
5. Biotinlated secondary antibody : DAKO ChemMate detection kits

第二節 研究設計

一、 大鼠腎臟纖維化模式

單側輸尿管阻塞手術之方法是依據文獻來進行^{19, 55-56, 60}，首先以腹腔注射pentobarbitol 方式完成麻醉，隨後在腹部中線左側劃開皮膚組織及皮下肌肉層。然後將左側腎臟暴露出來，隨即辨認並分離出輸尿管。輸尿管結紮的動作是在輸尿管距離腎臟約一公分處以4-0絲線作上端結紮，接下來在往下約一公分處再以4-0絲線進行下端結紮。然後在上、下端結紮處之間以剪刀將輸尿管剪斷。在確認無出血或漏尿情形之後，再逐步將腹部皮下肌肉層傷口與皮膚組織傷口縫合。至於假性手術組的對照鼠，也是同樣接受腹部皮膚組織及皮下肌肉層剖開術，並且按照前述方法分離出左側輸尿管，但是並未真正實施結紮和剪斷輸尿管的動作，隨後也是在確認無出血或漏尿情形下，將腹部皮下肌肉層傷口與皮膚組織傷口逐步縫合。

二、 實驗之分組與進行

Aliskiren, valsartan 或合併治療對於單側輸尿管阻塞(UUO)誘發的腎臟纖維化之療效，分別是在 UUO 後第七天和第十四天做評估。在這兩個不同天數的大分組中，又細分有五個小組，分別是：

- (一) 假性手術+安慰劑：此組共有五隻大鼠，只接受假性手術，未進行結紮輸尿管，也以安慰劑 (PBS) 餵食。
- (二) UUO+安慰劑：此組共有五隻大鼠，有接受單側輸尿管結紮，但只餵食安慰劑 (PBS)。
- (三) UUO+valsartan , 30 mg/kg/day：此組共五隻大鼠，有接受單側輸尿管結紮，並每天餵食 valsartan, 30 mg/kg。
- (四) UUO+aliskiren：此組共有五隻大鼠，有接受單側輸尿管結紮，並每天餵食 aliskiren, 20 mg/kg。
- (五) UUO+Aliskiren+valsartan 合併治療：此組共五隻大鼠，有接受單側輸尿管結紮，並每天餵食 valsartan, 15 mg/kg 及 aliskiren, 10mg/kg。

所有的大鼠在 UUO 後第七天或第十四天先經由麻醉犧牲，再抽血以檢測血漿腎素活性並取腎臟組織進一步檢驗。

三、 腎臟病理組織切片及免疫組織化學特殊染色分析

(Histopathological and immunohistochemical analysis)

每隻大鼠兩側腎臟組織經過固定及包埋之後，就依照一般例行的病理切片步驟，製作成四毫米厚之切片，經過脫臘手續之後，就進行H&E染色及封片。整個腎臟橫切面圖先以掃瞄方式記錄，最後在顯微鏡下進行判讀。我們採用一種依照先前文獻記載的標準點計算方式(Point counting method)來評估腎臟組織的顯微變化⁵⁷。這種方法是在四百倍放大的視野下，利用10×10的格子在圖像上形成一百個採樣點，凡是落在腎絲球或者大血管的結構內的點均被排除不予計算，計算採樣點落在特定染色組織的總點數，最後將所得總點數除以有效的採樣點總數，結果再轉換成百分比數字即可。同一個腎臟組織會在腎皮質層找出二十個四百倍放大不重疊的隨機取樣圖像。從這二十個圖像個別的百分比數字可以計算出的特殊染色之點數平均值，也就是該組織變化的嚴重度積分。例如腎小管擴張的嚴重度積分(score of tubular dialatation)，就是標準格子點落在有擴張的腎小管的分數平均值，再轉換成的百分比數字。腎間質體積分數(score of interstitial volume)的計算方法，則是計算每一個四百倍放大圖樣下，標準格子點落在腎間質區域的總和，再取二十個非重疊圖像的分數平均值，最後轉換成百分比數字即可，後面文章中會提及之 α -SMA 分數或膠原

蛋白分數也都是應用上述的標準格子點計算方式即可。

如前所述，腎臟組織切片在脫臘後，先在磷酸鹽緩衝液（0.1mM phosphste buffer solution, PH7.2, PBS）清洗三次，每次十分鐘，然後置於3%雙氧水溶液中10分鐘，再以PBS洗3次。取出切片後，將組織周圍的水份以無塵拭紙吸乾，置於保濕盤中，在組織上滴滿10%的正常山羊或兔子血清，於室溫30分鐘，倒掉血清，在組織上滴滿一級單株抗體，置於37°C，4小時或隔夜，再以PBS洗3次，在組織上滴滿次級抗體（biotinlated secondary antibody, DAKO ChemMate detection kits），於室溫10分鐘，以PBS洗3次，在組織上滴滿受質（peroxidase conjugated streptavidin, DAKO ChemMate detection kite），置於室溫10分鐘，以PBS洗3次，再用蒸餾水洗去鹽類，在組織上滴滿呈色劑（AEC or DAB substrate, DAKO ChemMate detection kits），於室溫5分鐘，用蒸餾水洗淨。滴上蘇木精複染數秒，然後水洗，滴上封片膠，蓋上蓋玻片，置於顯微鏡下鏡檢。本研究使用的一級抗體包括： α -smooth muscle actin 抗體（ α -SMA, 1:200 dilution, Epos system, Dako, California, USA）、TGF- β 1 抗體（rabbit anti-human TGF- β 1, 1:50 dilution, Santa Cruz Biotechnology）和 ED-1 抗體（rabbit polyclonal antibody against ED-1, 1:200；seofec. Oxford UK）。ED-1 抗體主要是染單核細胞及巨噬細胞。鏡檢時，又

再以前述的標準點計算方法，換算出每一個腎臟的 α -SMA 染色積分 (Score of α -SMA)。ED1 染色陽性的細胞積分 (Score of anti-ED1 positive cell) 則是直接計算二十個 400 倍放大影像中 ED1 染色陽性的細胞總數，最後再取平均值即可⁵⁶。

我們利用實驗室曾經發表過的染色方法，Sirius staining 來評估腎間質膠原蛋白的堆積程度⁶¹⁻⁶²。這種染色法的原理是利用 sirius red F3BA 對於所有膠原蛋白的選擇性結合以及 fast green FCF 對於非膠原蛋白的蛋白質之特殊結合作用。膠原蛋白會呈現暗紅色，而非膠原蛋白則呈現蘋果綠染色。腎間質膠原蛋白的堆積分數 (score of interstitial collagen deposition) 也是利用上述的標準取樣點計算方式來評分⁶⁰⁻⁶³。

四、 膠原蛋白總量之分析

至於膠原蛋白的總量是以 sirius staining 的特殊結合原理來檢測，我們將脫臘後的病理切片分別以 sirius red F3BA 及 fast green FCF 染色後，利用 sodium hydroxide-methanol 洗提出整塊切片組織的所有蛋白質，最後分別利用 540nm 和 605nm 吸收光譜來決定 sirius red F3BA 和 Fast green FCF 結合的蛋白總量，這個吸光值提供了測定膠

原蛋白佔所有蛋白質總量的比例值，因此膠原蛋白的總量最後就是以每毫克總蛋白中膠原蛋白佔多少微克($\mu\text{g}/\text{mg}$)來表示。因為這是一個相對值，所以和組織切片的厚度無關。

五、 西方墨點分析

我們採用西方墨點分析法來檢測大鼠腎臟組織中的第四型膠原蛋白 (Type IV collagen)， α -SMA 蛋白和 ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2)的表現⁶⁴⁻⁶⁶。腎臟組織樣本先經過秤重後，加入蛋白質萃取試劑萃取其蛋白質 (T-PER Pierce Biotechnology, IL, USA)，再以研磨機將組織液研磨成均質乳劑；經過離心及 PBS 清洗後，溶入一毫升的消化緩衝液，然後置於冰浴中三十分鐘。隨後取出細胞分解液 20 微克，混合等量的 2X SDS 裝載樣本緩衝液 (loading buffer, 125mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% Glycerol 100mM DTT, 及 0.2% bromophenol blue)，再加熱到 100°C 五分鐘後即可準備跑膠。完成架設電泳膠片 (10% SDS-polyacrylamide gels) 後，就可以將電泳緩衝液加入電泳槽內。將待測樣本及對照樣本分別加在電泳膠片孔內以 200 伏特電泳約三十至四十五分鐘。隨即將電泳膠片取出，然後再以濕式轉漬器來進行轉漬 (transfer) 至 PVDF 膜上，於 4°C 150 伏特 1 小

時。然後取出 PVDF 膜進行染色和標示標記分子的大小，然後再以 PBS-T 清洗脫色。隨後加入稀釋的 α -SMA 抗體(Dako, CA, USA), 或 actin 抗體(Santa Cruz, CA, USA)等次級抗體。再於室溫下置於震盪器上反應一小時。之後將膜浸泡於緩衝液中震盪五分鐘，然後將膜上的水分吸乾，置於透明保護膜內，於暗房中放入 X 光底片上壓片，最後再沖洗底片觀察結果。所有蛋白質的表現量都經過定量，並且用 β -actin 蛋白表現量來校正。

六、 反轉錄聚合酶鏈反應(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)

RNA 是由使用 TRIzol reagent (Invitrogen, Carsbad, CA, USA)處理腎臟組織而取得，並經由 260 nm 的紫外線吸光值來定量。首先 c-DNA 的合成是使用 2 μ g RNA 於 20 μ l 緩衝液，使用 AMV-RT (Promega, Madison, WI, USA) 及隨機的引子 (random primers) 來反轉錄。PCR 是使用標準的 PCR kit 以 1 μ l aliquots of cDNA， HotStarTaq polymerase (Qiagen, Valencia, CA, USA) 及基因特異的引子。我們所利用的引子(primer)在 Snail-1 是: 5'-CAC TAT GCC GCG CTC

TTT C-3' (sense) and 5'-GGT CGT AGG GCT GCT GGA A-3' (antisense)。TGF- β 1 的引子是：5'-CCT GAG TGG CTG TCT TTT GAC G-3' (sense) and 5'-AGT GAG CGC TGA ATC GAA AGC-3'(antisense); β -actin 的引子則是：5'-CAG CTG AGA GGG AAA TCG TG-3' (sense) and 5'-CGT TGC CAA TAG TGA TGA CC-3' (antisense)。Snail-1 蛋白可以藉由扮演轉錄抑制因子的主要角色來促進 EMT 的發生，因此 Snail-1 蛋白被認為在 EMT 中扮演最重要的角色。

第三節 統計方法

所有的數據都是以平均值加減標準誤來表示，有關西方墨點分析的結果，通常是以呈色信號的強度掃描結果來定量。所有的統計算都是使用 SPSS 統計軟體來計算，各組之間的差異使用 One-way analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests 來來檢定是否有意義，P 值小於 0.05 則有統計意義。

第三章、研究結果

第一節 合併 valsartan 及 aliskiren 改善因 UUO 所造成的阻塞腎臟的長度及重量

在 UUO 之後，阻塞的腎臟的重量和長度比假性手術(Sham operation) 及沒有阻塞的腎臟有明顯的增加(圖 3a 和 3b)($P < 0.001$)。和餵食安慰劑這一組比較，餵食 valsartan 30 mg/kg/day 這組減少了阻塞腎臟的長度在阻塞 7 天的大鼠有 10.9%，在阻塞 14 天的大鼠有 13.6% (兩者皆 $P < 0.05$, 圖 3a)。而餵食 aliskiren 20 mg/kg/day 這組也有相似的結果 (7 天：10.2%, $P < 0.05$ ；14 天：13.0% , $P = 0.058$)。在合併 valsartan 15 mg/kg/day 及 aliskiren 10 mg/kg/day 治療這組(7 天：19.5%；14 天：28.6%)，在 7 天及 14 天都比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 有較好的效果($P < 0.05$)。此外，valsartan 這組也可降低腎臟重量的增加(7 天：18.5%；14 天：19.9% ，兩者皆 $P < 0.005$ ，圖 3b)。在 aliskiren 這組 (7 天：18.0%；14 天：18.8% ，兩者皆 $P < 0.005$)及合併治療這組 (7 天：34.4%；14 天：36.1% ，兩者皆 $P < 0.005$)也呈現有意義的降低。同時，合併治療這組在 7 天及 14 天都比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 有較好的效果($P < 0.05$)。而 valsartan 治療組和

aliskiren 治療組之間則無統計上的差異。更進一步，在阻塞腎臟的橫切面也可見到同樣的效果 (圖 4)

第二節 合併治療改善因 UUO 所造成的阻塞腎臟的病理表現

圖 5 呈現了在 UUO 手術且以安慰劑、valsartan、aliskiren 及合併治療 14 天後，以 HE 染色(hematoxylin-eosin staining)、 α 型平滑肌動蛋白染色(α -smooth muscle actin staining)、天狼猩紅膠原纖維染色方法(sirius red staining)和 ED1 染色 (ED1- staining)的病理表現。以安慰劑餵食組的阻塞腎臟表現嚴重的腎小管擴張、腎小管萎縮、腎間質擴張和大量的間質細胞及白血球浸潤。雖然這些變化的嚴重程度並非很均勻的分布，但在整個腎皮質皆可見到。使用 valsartan 之後，明顯地改善了 UUO 之後所造成的腎小管間質的破壞 (圖 5C)。腎小管擴張度積分在 7 天這組有意義的降低了 30.1%，在 14 天這組則降了 20.6% (分別從 26.6 降到 18.6% 及 從 36.0 降到 28.6%，兩組皆 $P<0.05$ ，圖 6a)。Aliskiren 這組(7 天組：30.1%；14 天組：20.0%)腎小管擴張度積分的降低和 valsartan 這組相近 ($P=1.0$,圖 5D)。相較之下，合併治療組(7 天組：58.6%；14 天組：38.9%， $P<0.05$ ，圖 5E)則有較佳的降低腎小管擴張度積分的效果。

使用 valsartan 鈍化了腎間質容積的增加，在 7 天組有 20.6%，在 14 天組有 19.5% (分別由 33.0% 降至 26.2% 及從 41.0% 降 33.0%，兩組皆 $P < 0.05$, 圖 6b)。Aliskiren 的效果則是和 valsartan 相似 (7 天組 19.4%，14 天組 19.5%)。令人驚喜的是合併治療的效果比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 呈現有意義且較佳的效果。

第三節 合併治療降低因 UUO 造成的阻塞腎臟的 α 型平滑肌動蛋白及膠原蛋白的表現

我們以 α 型平滑肌動蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的表現來檢視阻斷 RAS 在腎間質肌纖維母細胞 (Myofibroblast) 的作用。在 UUO 之後，在腎小管及腎絲球周邊會有大量的細胞表現 α -SMA 活性 (圖 5G)。使用 valsartan 有意義的降低了 UUO 所引發的 α -SMA 染色積分 (Score of α -SMA) 的增加，在 7 天組有 15.3%，在 14 天組是 14.1% (分別由 27.4% 降至 23.2% 及從 35.4% 降至 30.4%，兩組皆 $P < 0.05$, 圖 5H 及圖 6c)。Aliskiren 的效果則是和 valsartan 相似 (7 天組 16.8%，14 天組 13.0%，圖 5I)。合併治療的效果比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 呈現有意義且較佳的效果 (7 天組 31.4%，14 天組 27.7%， $P < 0.05$ ，圖 5J)。

腎間質膠原蛋白的沈積在 UUO 手術 7 天後的阻塞腎臟比對側正常腎臟相比呈現有意義的增加(圖 5L)。以 sirius staining 來評估的腎間質膠原蛋白的堆積分數(score of interstitial collagen deposition)在阻斷 RAS 後也呈現改善的情形(圖 6d)。使用 valsartan 有意義的降低了 UUO 所引發的腎間質膠原蛋白的堆積分數的增加，在 7 天組有 26.9%，在 14 天組是 15.4% (分別由 26.8% 降至 19.6% 及從 37.6% 降至 31.8%，兩組皆 $P < 0.05$ ，圖 5M)。Aliskiren 的效果則是和 valsartan 相似 (7 天組 27.6%，14 天組 12.8%，圖 5N)。合併治療的效果比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 呈現有意義且較佳的效果(7 天組 48.5%，14 天組 29.3%， $P < 0.05$ ，圖 5O)。

以西方墨點法分析腎臟組織也發現了第四型膠原蛋白(collagen IV)及 α -SMA 在阻塞的腎臟有顯著的增加。使用 valsartan、aliskiren 或合併治療則明顯地改善了第四型膠原蛋白及 α -SMA 的增加(圖 7)。

我們也同時測定腎臟組織中膠原蛋白和蛋白質的比值。和對照組($12.5 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{mg}$)相比，阻塞的腎臟 (7 天組： $26.2 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ；14 天組 $34.0 \pm 4.1 \mu\text{g}/\text{mg}$) 在 7 天組有顯著的升高($P < 0.005$)。使用 valsartan 有意義的降低了膠原蛋白的增加，在 7 天組有 14.7%，在 14 天組是 16.3% (分別由 $26.2 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ 降至 $22.3 \pm 1.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ 及從

34.0 ± 4.1 μg/mg 降至 28.5 ± 1.3 μg/mg，兩組皆 P<0.05，圖 6e)。

Aliskiren 的效果則是和 valsartan 相似 (7 天組 14.1%，14 天組 14.5%)。合併治療的效果比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 呈現有較佳的效果(7 天組 27.1%，14 天組 21.9%)，但沒有統計上的意義。

第四節 合併治療降低因 UUO 造成的阻塞腎臟的單核細胞／巨噬細胞的浸潤及 ERK 1/2 的磷酸化

ED-1 陽性單核細胞／巨噬細胞的浸潤以之前文獻報告的方式呈現(圖 5Q)⁶⁰。使用 valsartan 稍微降低了 ED-1 陽性細胞浸潤的數目，在 7 天組有 9.4%，在 14 天組是 6.5% (分別由 25.6 降至 23.2 及從 33.8 降至 31.6，圖 6f，圖 5R)。Aliskiren 的效果比 valsartan 好 (7 天組 18.0%，14 天組 16.6%，兩組皆 P<0.05，圖 5S)。合併治療的效果(7 天組 39.8%，14 天組 35.8%)比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 呈現有較佳的效果(P<0.05，圖 5T)。

以西方墨點法分析腎臟組織發現 ERK 1/2 在 UUO 後的腎臟有被活化的情形(圖 7)。Aliskiren 及 valsartan 皆可降低 ERK 1/2 的活化。同時，合併治療比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 在抑制 ERK 1/2 磷酸化呈現有較佳的效果

第五節 合併治療降低因 UUO 造成的阻塞腎臟的 $\beta 1$ 型轉化生長因子 (Transforming growth factor- $\beta 1$) mRNA 的表現

阻斷 RAS 可顯著地降低 UUO 所造成的腎小管間質纖維化。我們進一步檢測 UUO 所造成阻塞的腎臟的 snail-1 及 $\beta 1$ 型轉化生長因子 (TGF- $\beta 1$) mRNA 的表現。使用反轉錄酶 PCR (reverse transcriptase-PCR) 檢測，我們發現 snail-1 及 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表現在 UUO 的腎臟比假性手術的腎臟有意義地增加(圖 8)。Valsartan、aliskiren 或合併治療在 UUO 手術 7 天之後這組有意義地減弱了 snail-1 及 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表現。同樣的，合併治療的效果比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 較佳。

第六節 合併治療改變因 UUO 造成的阻塞腎臟的血漿腎素活性

血漿腎素活性(plasma rennin activity, PRA)在 UUO 這組(7 天組 10.7 ± 3.0 ng/ml/hr，14 天組 12.7 ± 1.6 ng/ml/hr)比對照組(7 天組 5.7 ± 1.5 ng/ml/hr，14 天組 5.5 ± 1.6 ng/ml/hr)更高 ($p < 0.05$)。Valsartan 治療組比 UUO 組在 7 天時 PRA 高出 34.0%，在 14 天時高出 35.4% (分別由 10.7 ± 3.0 ng/ml/hr 增至 14.3 ± 4.3 ng/ml/hr 及從 12.7 ± 1.6 ng/ml/hr 增至

17.1±3.0 ng/ml/hr，14 天組 P<0.05)。Aliskiren 的效果則是相反，血漿腎素活性則比 UUO 未治療組在 7 天時降低 83.7%，在 14 天時降低 85.8% (分別由 10.7±3.0 ng/ml/hr 降至 1.7±1.1 ng/ml/hr 及從 12.7±1.6 ng/ml/hr 降至 1.8±0.5 ng/ml/hr，兩組皆 P<0.005，圖 9)。合併治療組的血漿腎素活性也比 UUO 未治療組在 7 天時降低 50.8%，在 14 天時降低 50.6% (分別由 10.7±3.0 ng/ml/hr 降至 5.3±1.8 ng/ml/hr 及從 12.7±1.6 ng/ml/hr 降至 6.3±1.6 ng/ml/hr，兩組皆 P<0.05)。



第四章、討論

第一節 結果討論

這個研究是第一個呈現合併valsartan及aliskiren可以有效地治療UUO所引起的腎纖維化。合併valsartan及aliskiren治療的理由是以不同機轉的兩種藥來求得最佳的療效。腎纖維化的機轉牽涉了很多步驟。每一個RAS阻斷劑對於腎纖維化都有保護作用，但並不能單靠一種阻斷劑而得到完全的保護。因此，適當的RAS阻斷劑的組合理論上可能有較好的療效。合併使用ACEI和ARB的腎臟保護作用在一些動物和臨床研究已經報告過了^{28,67}。大家已經很清楚ACEI可以降低第二血管張力素(angiotension II)的合成，也因此可以減弱阻塞性腎病變所造成的腎纖維化⁵⁶。也有一些合併使用ACEI的研究在大鼠UUO引發腎纖維化的模式顯示有很好的腎臟保護作用^{68,43}。另一個UUO的研究顯示帕立骨化醇 (Paricalcitol, Zemplar,® 腎骨樂)不管有沒有合併使用群多普利(trandolapril)都可阻斷腎素的產生⁶⁹。合併兩種藥物治療在減弱UUO引發的腎纖維化有加成的效果。然而，因為高血鉀的風險，咳嗽和不完全的療效限制了ACEI的臨床使用⁷⁰。ACEI的不完全療效是因為慢性的ACEI治療不能完全阻斷血管張力素轉換酶，或因第二血管張力素的產生可經由非ACE 路徑達成，比如凝酪酵素(chymase)⁷¹⁻⁷²。另一方面，一些研究顯示使用ARB治療，在減緩腎臟

疾病進展是有效的^{5, 55, 73}。ARB有比ACEI較佳的耐受度，較少的咳嗽、血管性水腫及高血鉀^{70, 74}。此外，ARB 也可經由第阻斷第二血管張力素第一型受體(angiotensin II type 1 receptor)造成血管張力素的阻斷⁷⁵。因為RAS系統有多重回饋機轉及替代路徑，阻斷其中一種步驟可能會相對造成另一個步驟的產物增加，因此降低了治療的效果⁸。若合併兩種或者三種RAS阻斷劑理論上會有較佳的效果。有一篇合併ACEI, ARB及DRI等三種RAS阻斷劑來治療腎移植後復發的局部性腎絲球硬化症(Focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)所造成的腎病症候群的個案報告，他們發現RAS的三重抑制有不錯的降蛋白尿的效果且不會引起高血鉀⁷⁶。但是因ONTARGET研究中發現ACEI及ARB的雙重抑制有較高的高血鉀的風險，在我們的研究未使用RAS的三重抑制。

最近 DRI 已經被証實對於糖尿病及非糖尿病腎病變有幫助^{46, 77-78}。理論上，雖然 DRI 也無法藉由阻斷腎素的酵素活化中心而完全阻斷腎素的活性，但是 DRI 可以降低血管張力素的產生及血漿腎素活性(plasma renin activity)^{36, 79}。在這個研究，經由測量腎臟的重量及長度而決定的水腎嚴重程度、腎小管擴張積分、腎間質容積、腎間質膠原蛋白沈積和 α -SMA 表現，經由阻斷 valsartan、aliskiren 或合併治療全都呈現降低的情形。西方墨點分析(Western blot)也顯示阻斷

RAS 可以降低 ERK 1/2 的活性、第四型膠原蛋白(type IV collagen) 及 α -SMA 的表現。此外，反轉錄聚合酶鏈反應(reverse-transcriptase PCR)的資料也證實 valsartan 和 aliskiren 的治療可以抑制 snail-1 和 TGF- β 1 的表現。特別的是 aliskiren 和 valsartan 在抑制腎纖維化有相似的效果，而合併治療比單獨使用 valsartan 或 aliskiren 在抑制 UUO 引發的腎纖維化有較佳的效果。^{55-56, 69} 我們的研究發現在 UUO 這組 PRA 會升高，valsartan 這組甚至更高，這和之前的研究相近。相較之下，aliskiren 這組 PRA 數值會下降，當合併 valsartan 使用時可使 PRA 數值降至接近假性手術這組。在 Kelly 等作者使用糖尿病腎病變的老鼠模式研究中指出 aliskiren 在降低腎小管間質纖維化的效果比培哚普利(perindopril)還好⁴²。此外，aliskiren 降血壓的效果沒有培哚普利好，但是兩種藥物在糖尿病腎病變的老鼠降低白蛋白尿(albuminuria)及腎絲球硬化(glomerulosclerosis)的效果是一樣的。他們也觀察到這兩種藥物的不同作用可能和表現在腎小管上皮細胞的(前)腎素受體((pro)renin receptor)有關⁸⁰⁻⁸⁵。腎素和前腎素(prorenin)與(前)腎素受體結和會引發絲胺酸(serine)和酪胺酸(tyrosine)的磷酸化產生細胞內訊息傳遞，進而活化有絲分裂活化蛋白質激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK) 及 ERK 1/2。MAPK 及 ERK 1/2 與細胞肥大及增生有關⁸⁰⁻⁸⁵。然而，第二血管張力素也可以活化 ERK 1/2

路徑。在這個研究，我們發現 aliskiren 及 valsartan 都可以降低 ERK 1/2 的活化。雖然使用 DRI 可能會引起腎素及前腎素的分泌增加因此可能引起纖維化，但實際上卻沒有這樣，（前）腎素受體的負回饋機轉可能以解釋這個現象⁸⁶。最後，DRI 之所以會在 RAS 抑制劑外有加成的效果可能和這些分子和（前）腎素受體有關⁸⁰。在本實驗，aliskiren 和 valsartan 減弱腎小管間質纖維化的能力並沒有差異，但是（前）腎素受體有可能是合併 aliskiren 和 valsartan 有加成效果的原因之一。然而，DRI 和其它 RAS 抑制劑在（前）腎素受體及腎病變的不同的作用仍需進一步探討。

第二節 其他相關性討論

輸尿管阻塞後會引起單核細胞／巨噬細胞在腎臟的浸潤。腎小管間質被發炎細胞的浸潤在很多種的慢性腎臟病都已被發現。在腎臟持續的發炎反應被認為和腎小管間質纖維化及腎功能惡化有相關性⁸⁷。巨噬細胞經由釋放活性氧化物質(Reactive oxygen species; ROS)、一氧化氮(nitric oxide; NO)、補體(complement)和前發炎細胞激素(proinflammatory cytokines)所造成的組織傷害已經有文獻報告⁸⁸。我們的實驗顯示單核細胞／巨噬細胞的浸潤在阻塞的腎臟可被 DRI 有

意義的降低，但 ARB 則無。這樣的觀察和之前 ARB 在阻塞腎臟不像 ACEI 可降低 VCAM-1 mRNA 的報告相符⁸⁹。

關於（前）腎素受體與腎臟疾病的關係，目前尚非十分清楚，這也是一個值得進一步研究的課題。（前）腎素受體可在腦，心，肝，胰及腎臟表現^{80, 90}。它有兩種功能，一種是增加四到五倍的腎素催化活性，另一種則是引發訊息傳遞（signal transduction）會活化有絲分裂活化蛋白質激酶(MAPK)、ERK 1/2 及 PI3K-p85。活化 MAPK、ERK 1/2 及 PI3K-p85 可能會有前纖維化（profibrotic）及增殖(proliferation)的效果，最後造成器官的損傷，稱為第二血管張力素獨立路徑（Angiotensin II-independent pathway）。而經由增加腎素催化活性也會經由第二血管張力素的作用造成器官的損傷，稱為第二血管張力素依賴路徑（Angiotensin II-dependent pathway）。最近有學者提出腎素或前腎素和（前）腎素受體結合後會活化 PLZF 蛋白(Promyelocytic zinc-finger protein)⁸⁶。PLZF 蛋白進入細胞核後會負回饋去抑制（前）腎素受體的轉錄（transcription），同時會活化 PI3K-p85 α 的轉錄⁹¹。PI3K-p85 α 可能藉由 Akt kinase 再進一步活化 MAPK 及 ERK 1/2⁹²。Aliskiren 無法抑制（前）腎素受體，因此若能找一個藥物能阻斷（前）腎素受體同時也能抑制腎素催化血管張力素原，則將能在抑制腎纖維化，增進心臟血管的保護作用及控制血壓有最佳的療效。

第三節 研究限制

在我們的研究仍有一些限制。我們並沒有評估在 UUO 後的大鼠的血壓和白蛋白尿。高血壓和白蛋白尿在糖尿病的病人很常見並且是慢性腎疾病和腎纖維化的重要的危險因子。然而，aliskiren 在糖尿病腎病變的老鼠模式已證實可降低白蛋白尿和腎絲球硬化並且和血壓無關⁴²。另一方面，UUO 後的大鼠仍有一側腎臟是正常的，因此短時間不會有高血壓及蛋白尿的問題，且先前的研究已發現使用 RAS 抑制劑在 UUO 後的大鼠，對血壓及白蛋白尿影響很小。



第五章、結論與建議

第一節 結論

總括而言，我們的發現提供了一個活體內(in vivo)的證據證明 aliskiren、 valsartan 或合併治療在大鼠 UUO 引發的腎纖維化的模式可以減緩腎小管間質的傷害。這樣的結果強烈建議合併 DRI 及 ARB 的治療來改善慢腎性腎病變需要進一步的臨床評估。

第二節 建議

將來計畫進行合併 DRI 及 ARB 的治療來改善慢腎性腎病變臨床試驗。若能如同動物實驗一般在抑制腎臟纖維化有加成的效果，將使慢性腎臟病的治療更為有效。

另一方面，（前）腎素受體在此 UUO 引發的腎纖維化的模式所扮演的角色，以及使用 aliskiren 和 valsartan 的合併治療所造成腎素增加對腎臟纖維化的影響跟（前）腎素受體之間的關係為何，都是值得我們進一步探討的課題。

參考文獻

1. Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *Am J Med Sci* 2003; **326**: 15-24.
2. Dzau V. The cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *J Hypertens Suppl* 2005; **23**: S9-17.
3. Berl T. Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2009; **10**: 1-8.
4. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, *et al.* The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; **329**: 1456-1462.
5. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, *et al.* Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001; **345**: 861-869.
6. Oparil S, Yarows SA, Patel S, *et al.* Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial. *Lancet* 2007; **370**: 221-229.
7. Uresin Y, Taylor AA, Kilo C, *et al.* Efficacy and safety of the direct renin inhibitor aliskiren and ramipril alone or in combination in patients with diabetes and hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2007; **8**: 190-198.
8. Slagman MC, Navis G, Laverman GD. Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; **19**: 140-152.
9. Chrysant SG. Current status of dual Renin Angiotensin aldosterone system blockade for the treatment of cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2010; **105**:

849-852.

10. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005; S14-18.
11. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, *et al.* Excerpts from the US Renal Data System 2009 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 2010; **55**: S1-420, A426-427.
12. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, *et al.* Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* 2007; **369**: 1208-1219.
13. Adams DJ, Head GA, Markus MA, *et al.* Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function. *J Biol Chem* 2006; **281**: 31753-31761.
14. Jackson K, Head GA, Morris BJ, *et al.* Reduced cardiovascular reactivity to stress but not feeding in renin enhancer knockout mice. *Am J Hypertens* 2007; **20**: 893-899.
15. Long DA, Price KL, Herrera-Acosta J, *et al.* How does angiotensin II cause renal injury? *Hypertension* 2004; **43**: 722-723.
16. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; **44**: 1957-1972.
17. Karalliedde J, Viberti G. Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes. *J Hum Hypertens* 2006; **20**: 239-253.
18. Fogo AB. The role of angiotensin II and plasminogen activator inhibitor-1 in progressive glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2000; **35**: 179-188.
19. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; **75**: 1145-1152.
20. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, *et al.* Aldosterone/salt induces renal

- inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003; **63**: 1791-1800.
21. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, *et al.* Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotension system. *Am J Hypertens* 2004; **17**: 597-603.
 22. Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, *et al.* Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 336-344.
 23. Rossing K, Jacobsen P, Pietraszek L, *et al.* Renoprotective effects of adding angiotensin II receptor blocker to maximal recommended doses of ACE inhibitor in diabetic nephropathy: a randomized double-blind crossover trial. *Diabetes Care* 2003; **26**: 2268-2274.
 24. Nakao N, Yoshimura A, Morita H, *et al.* Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; **361**: 117-124.
 25. Russo D, Minutolo R, Pisani A, *et al.* Coadministration of losartan and enalapril exerts additive antiproteinuric effect in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2001; **38**: 18-25.
 26. Ruilope LM, Aldigier JC, Ponticelli C, *et al.* Safety of the combination of valsartan and benazepril in patients with chronic renal disease. European Group for the Investigation of Valsartan in Chronic Renal Disease. *J Hypertens* 2000; **18**: 89-95.
 27. Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I, *et al.* Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *BMJ* 2000; **321**: 1440-1444.
 28. Jacobsen P, Andersen S, Rossing K, *et al.* Dual blockade of the renin-angiotensin system versus maximal recommended dose of ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; **63**: 1874-1880.

29. Bakris GL, Ruilope L, Locatelli F, *et al.* Treatment of microalbuminuria in hypertensive subjects with elevated cardiovascular risk: results of the IMPROVE trial. *Kidney Int* 2007; **72**: 879-885.
30. Menne J, Farsang C, Deak L, *et al.* Valsartan in combination with lisinopril versus the respective high dose monotherapies in hypertensive patients with microalbuminuria: the VALERIA trial. *J Hypertens* 2008; **26**: 1860-1867.
31. Yusuf S, Teo KK, Pogue J, *et al.* Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; **358**: 1547-1559.
32. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet* 2006; **368**: 1449-1456.
33. Muller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 221-228.
34. Skeggs LT, Jr., Kahn JR, Lentz K, *et al.* The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med* 1957; **106**: 439-453.
35. Heerspink HJ, Perkovic V, de Zeeuw D. Renal and cardio-protective effects of direct renin inhibition: a systematic literature review. *J Hypertens* 2009.
36. Stanton A. Now that we have a direct renin inhibitor, what should we do with it? *Curr Hypertens Rep* 2008; **10**: 194-200.
37. Fisher ND, Jan Danser AH, Nussberger J, *et al.* Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. *Circulation* 2008; **117**: 3199-3205.
38. Brown MJ. Aliskiren. *Circulation* 2008; **118**: 773-784.
39. O'Brien E, Barton J, Nussberger J, *et al.* Aliskiren reduces blood pressure and suppresses plasma renin activity in combination with a thiazide diuretic, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, or an angiotensin receptor blocker. *Hypertension* 2007; **49**: 276-284.

40. Wiggins KJ, Kelly DJ. Aliskiren: a novel renoprotective agent or simply an alternative to ACE inhibitors? *Kidney Int* 2009; **76**: 23-31.
41. Dockery BK, Bisognano JD. Direct renin inhibition: an analysis of possible benefits. *Curr Hypertens Rep* 2008; **10**: 313-318.
42. Kelly DJ, Zhang Y, Moe G, *et al.* Aliskiren, a novel renin inhibitor, is renoprotective in a model of advanced diabetic nephropathy in rats. *Diabetologia* 2007; **50**: 2398-2404.
43. Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol* 1999; **276**: F39-45.
44. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, *et al.* Aliskiren Trial in Type 2 Diabetes Using Cardio-Renal Endpoints (ALTITUDE): rationale and study design. *Nephrol Dial Transplant* 2009; **24**: 1663-1671.
45. Peixoto AJ, Orias M. Is there a role for direct renin inhibitors in chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; **18**: 397-403.
46. McMurray JJ, Pitt B, Latini R, *et al.* Effects of the oral direct renin inhibitor aliskiren in patients with symptomatic heart failure. *Circ Heart Fail* 2008; **1**: 17-24.
47. Parving HH, Persson F, Lewis JB, *et al.* Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2433-2446.
48. Becker GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hyperterns* 2000; **9**: 133-138.
49. Zeisberg M, Strutz F, Müller GA. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; **10**: 315-320.
50. Gagliardini E, Benigni A. Therapeutic potential of TGF-beta inhibition in chronic renal failure. *Expert Opin Biol Ther* 2007; **7**: 293-304.
51. Kim DH, Moon SO, Jung YJ, *et al.* Mast cells decrease renal fibrosis in

- unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 2009; **75**: 1031-1038.
52. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, *et al.* Interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 1993; **44**: 774-788.
 53. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F861-875.
 54. Vaughan ED, Jr., Marion D, Poppas DP, *et al.* Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *J Urol* 2004; **172**: 2563-2569.
 55. Ishidoya S, Morrissey J, McCracken R, *et al.* Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1995; **47**: 1285-1294.
 56. Kaneto H, Morrissey J, McCracken R, *et al.* Enalapril reduces collagen type IV synthesis and expansion of the interstitium in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 1994; **45**: 1637-1647.
 57. Guo G, Morrissey J, McCracken R, *et al.* Contributions of angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha to the development of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F777-785.
 58. Kellner D, Chen J, Richardson I, *et al.* Angiotensin receptor blockade decreases fibrosis and fibroblast expression in a rat model of unilateral ureteral obstruction. *J Urol* 2006; **176**: 806-812.
 59. Jensen AM, Li C, Praetorius HA, *et al.* Angiotensin II mediates downregulation of aquaporin water channels and key renal sodium transporters in response to urinary tract obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; **291**: F1021-1032.
 60. Wu MJ, Wen MC, Chiu YT, *et al.* Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney Int* 2006; **69**: 2029-2036.
 61. Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, *et al.* Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004; **11**:

408-417.

62. Chiu YT, Liu SK, Liu M, *et al.* Characterization and quantitation of extracellular collagen matrix in myocardium of pigs with spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 1999; **8**: 169-175.
63. Chiou YY, Shieh CC, Cheng HL, *et al.* Intrinsic expression of Th2 cytokines in urothelium of congenital ureteropelvic junction obstruction. *Kidney Int* 2005; **67**: 638-646.
64. Fan JM, Ng YY, Hill PA, *et al.* Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int* 1999; **56**: 1455-1467.
65. Wu MJ, Lai LW, Lien YH. Effect of calbindin-D28K on cyclosporine toxicity in cultured renal proximal tubular cells. *J Cell Physiol* 2004; **200**: 395-399.
66. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 96-107.
67. Komine N, Khang S, Wead LM, *et al.* Effect of combining an ACE inhibitor and an angiotensin II receptor blocker on plasma and kidney tissue angiotensin II levels. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**: 159-164.
68. Goncalves RG, Biato MA, Colosimo RD, *et al.* Effects of mycophenolate mofetil and lisinopril on collagen deposition in unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Nephrol* 2004; **24**: 527-536.
69. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009.
70. Bakris GL, Siomos M, Richardson D, *et al.* ACE inhibition or angiotensin receptor blockade: impact on potassium in renal failure. VAL-K Study Group. *Kidney Int* 2000; **58**: 2084-2092.
71. Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological

- interruption of the renin system. *Hypertension* 1998; **32**: 387-392.
72. Nussberger J, Brunner DB, Waeber B, *et al.* Plasma angiotensins under sustained converting enzyme inhibition with enalapril in normal humans. *J Hypertens Suppl* 1985; **3**: S269-270.
 73. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, *et al.* Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; **345**: 851-860.
 74. Hoogwerf BJ. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. *Am J Cardiol* 2010; **105**: 30A-35A.
 75. Azizi M. Direct renin inhibition: clinical pharmacology. *J Mol Med* 2008; **86**: 647-654.
 76. Freiburger V, Amann K, Heemann U, *et al.* Effect of a triple blockade of the renin-angiotensin-system in recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation. *Transpl Int* 2009; **22**: 1110-1113.
 77. Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, *et al.* Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation* 2009; **119**: 530-537.
 78. Schmieder RE, Philipp T, Guerediaga J, *et al.* Long-term antihypertensive efficacy and safety of the oral direct renin inhibitor aliskiren: a 12-month randomized, double-blind comparator trial with hydrochlorothiazide. *Circulation* 2009; **119**: 417-425.
 79. Shafiq MM, Menon DV, Victor RG. Oral direct renin inhibition: premise, promise, and potential limitations of a new antihypertensive drug. *Am J Med* 2008; **121**: 265-271.
 80. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, *et al.* Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1417-1427.

81. Nguyen G. Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy: put the blame on the (pro)renin receptor? *Kidney Int* 2006; **70**: 618-620.
82. Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension* 2005; **46**: 1069-1076.
83. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, *et al.* Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): new therapy for CKD by a (pro)renin-receptor-blocking decoy peptide. *J Pharmacol Sci* 2009; **109**: 20-23.
84. Satofuka S, Ichihara A, Nagai N, *et al.* (Pro)renin receptor-mediated signal transduction and tissue renin-angiotensin system contribute to diabetes-induced retinal inflammation. *Diabetes* 2009; **58**: 1625-1633.
85. Nguyen G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int* 2006; **69**: 1503-1506.
86. Schefe JH, Menk M, Reinemund J, *et al.* A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res* 2006; **99**: 1355-1366.
87. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, *et al.* Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 2001; **59**: 1626-1640.
88. Sean Eardley K, Cockwell P. Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. *Kidney Int* 2005; **68**: 437-455.
89. Morrissey JJ, Klahr S. Differential effects of ACE and AT1 receptor inhibition on chemoattractant and adhesion molecule synthesis. *Am J Physiol* 1998; **274**: F580-586.
90. Nguyen G, Burckle CA, Sraer JD. Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. *Curr Hypertens Rep* 2004; **6**: 129-132.
91. Funke-Kaiser H, Zollmann FS, Schefe JH, *et al.* Signal transduction of the

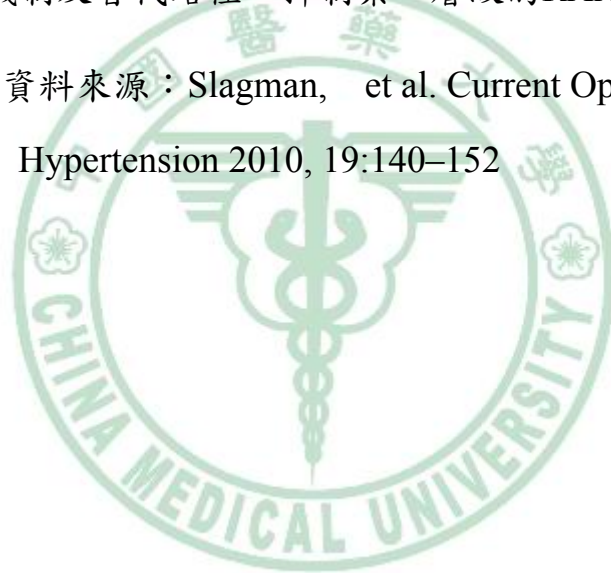
(pro)renin receptor as a novel therapeutic target for preventing end-organ damage. *Hypertens Res* 2010; **33**: 98-104.

92. Ko JH, Son W, Bae GY, *et al.* A new hepatocytic isoform of PLZF lacking the BTB domain interacts with ATP7B, the Wilson disease protein, and positively regulates ERK signal transduction. *J Cell Biochem* 2006; **99**: 719-734.



附圖：

圖1、腎素-血管張力素-醛固酮系統。(a) 全盤的概述不同種的藥物如何作用於此系統。ACE， angiotensin-converting enzyme，血管張力素轉化酶； AT1R， angiotensin II type 1 receptors，第二血管張力素第一型受體；MR， mineralocorticoid receptor，鹽皮質激素受體。(b) 阻斷腎素-血管張力素-醛固酮系統的藥物種類及其對於RAAS系統的影響。因為回饋機制及替代路徑，抑制某一層級的RAAS 會導致另一個層級的活化。資料來源：Slagman, et al. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2010, 19:140–152



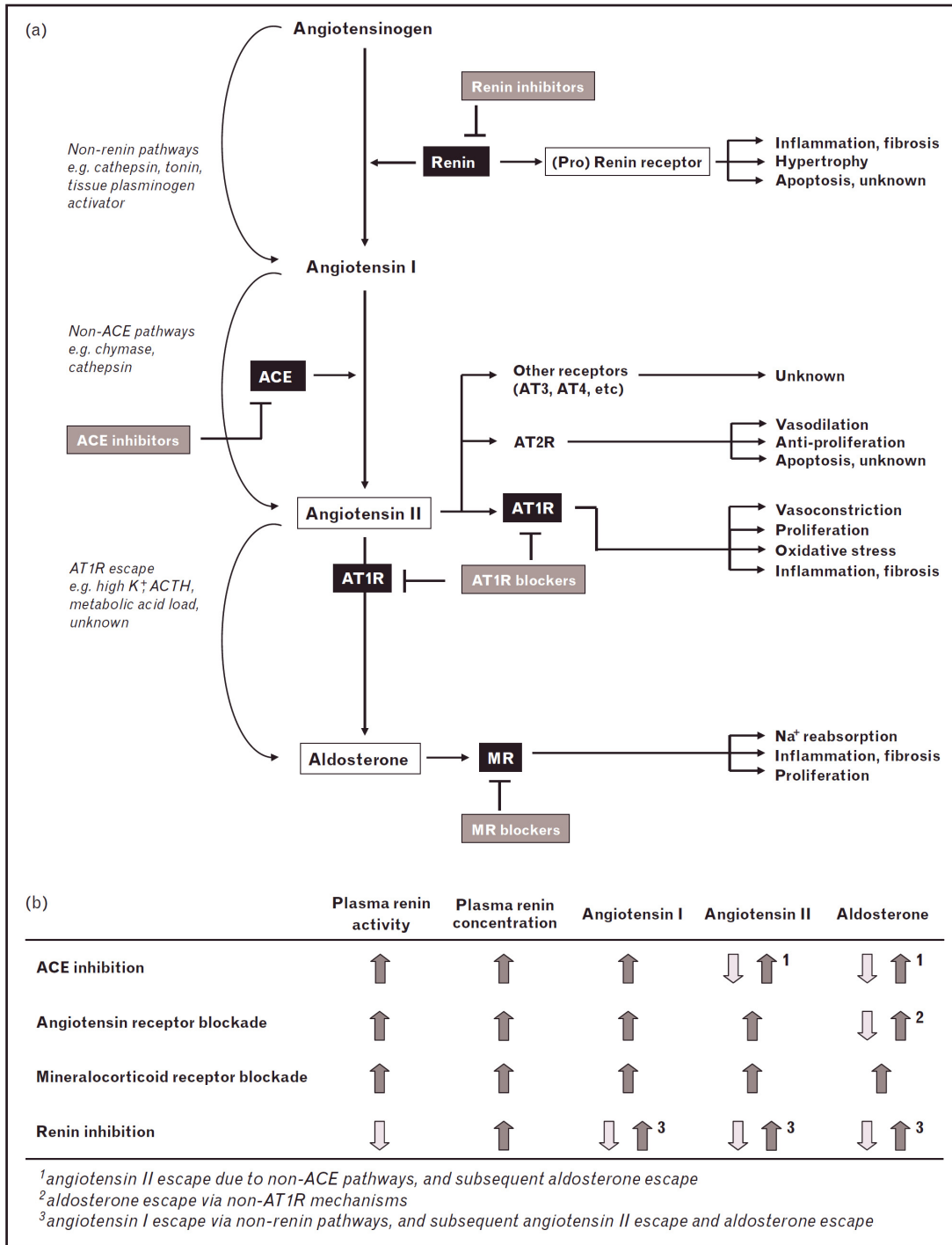


圖 2、Aliskiren 分子結構式。Aliskiren 是第一個口服的腎素直接抑制劑，它的分子量是 609.8，可經由作用於腎素的活性位置來阻斷腎素的活性。

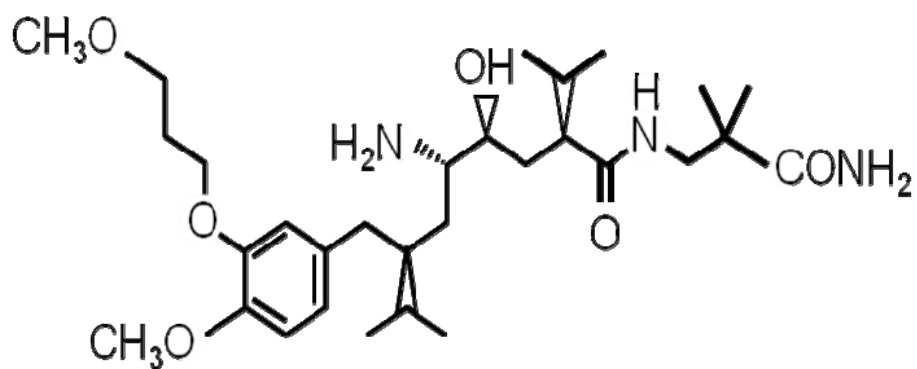


圖 3、阻斷 RAS 在 UUO 後 7 天及 14 天可改善因 UUO 所造成的阻塞腎臟的長度及重量。*代表 P 值小於 0.05 (與同天數接受 UUO 手術但未餵食藥物的大鼠比較)**代表 P 值小於 0.005(與同天數接受 UUO 手術但未餵食藥物的大鼠比較)。⁺代表 P 值小於 0.05(與同天數接受 UUO 手術又餵食 valsartan 或 aliskiren 的大鼠比較);⁺⁺代表 P 值小於 0.005 (與同天數接受 UUO 手術又餵食 valsartan 或 aliskiren 的大鼠比較)。每組有五隻老鼠；所有數值均以平均值加減標準誤表示。

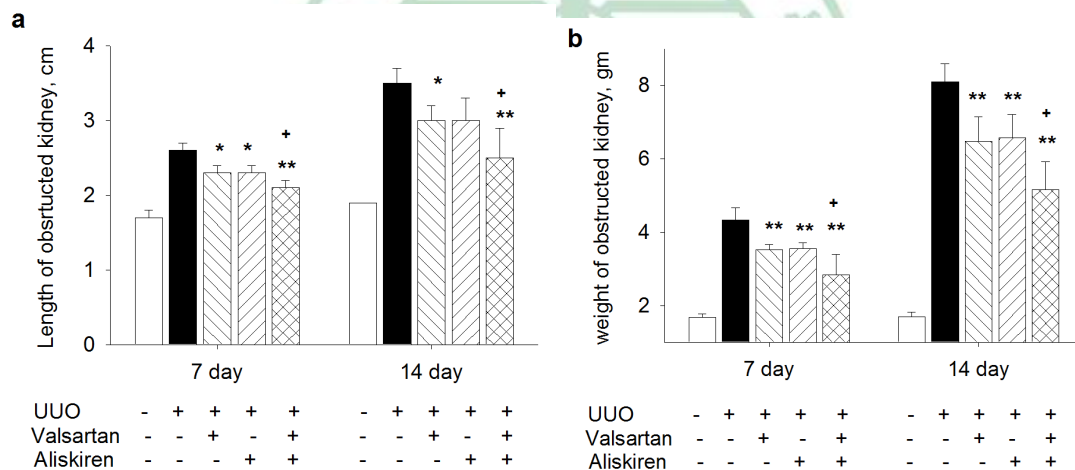


圖 4、阻塞腎臟橫切面變化。(阻斷 RAS 對於單側輸尿管阻塞手術後第七及十四天的腎臟橫切面變化之影響)

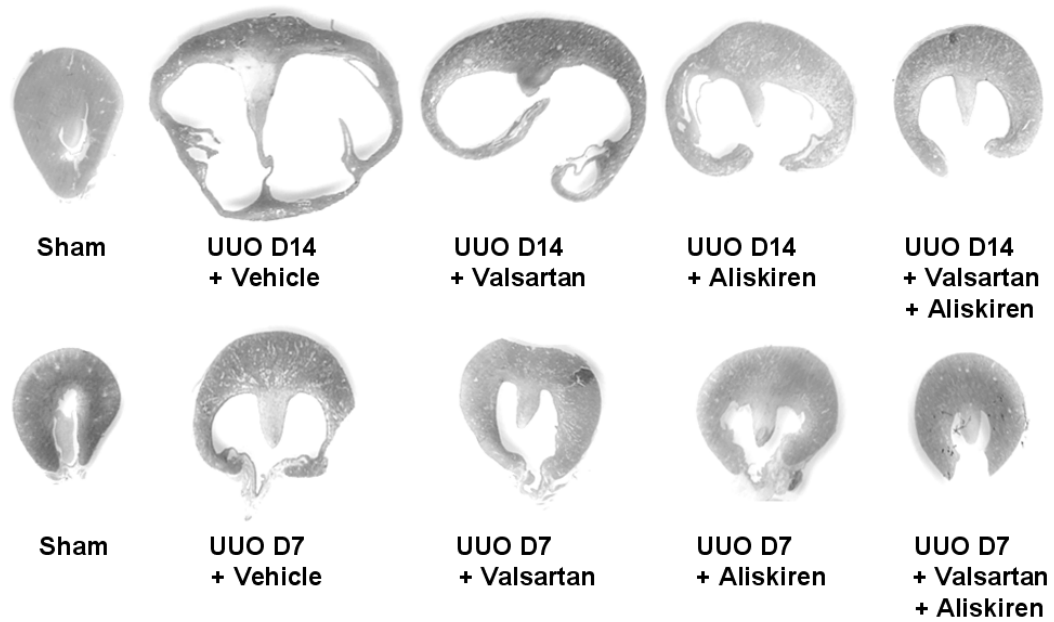


圖5、阻斷RAS減少單側輸尿管阻塞手術後第十四天的大鼠腎臟腎小管間質之變化。圖A, B, C, D, E是蘇木紫-曙紅(hematoxylin-eosin)染色，圖F, G, H, I, J是 α 型平滑肌肌動蛋白(α -smooth muscle actin)染色，圖K, L, M, N, O是sirius red 染色，圖P, Q, R, S, T 是ED1 抗體染色。圖A, F, K, P是正常腎臟的組織，圖B, G, L, Q是未餵食RAS抑制劑而接受單側輸尿管阻塞手術，手術後第十四天的大鼠腎臟組織，圖C, H, M, R是餵食valsartan而接受單側輸尿管阻塞手術的大鼠腎臟組織，圖D, I, N, S是餵食valsartan的大鼠腎臟組織，圖E, J, O, T是餵食半量的valsartan 及aliskiren的大鼠腎臟組織，Bar = 50 μ m。



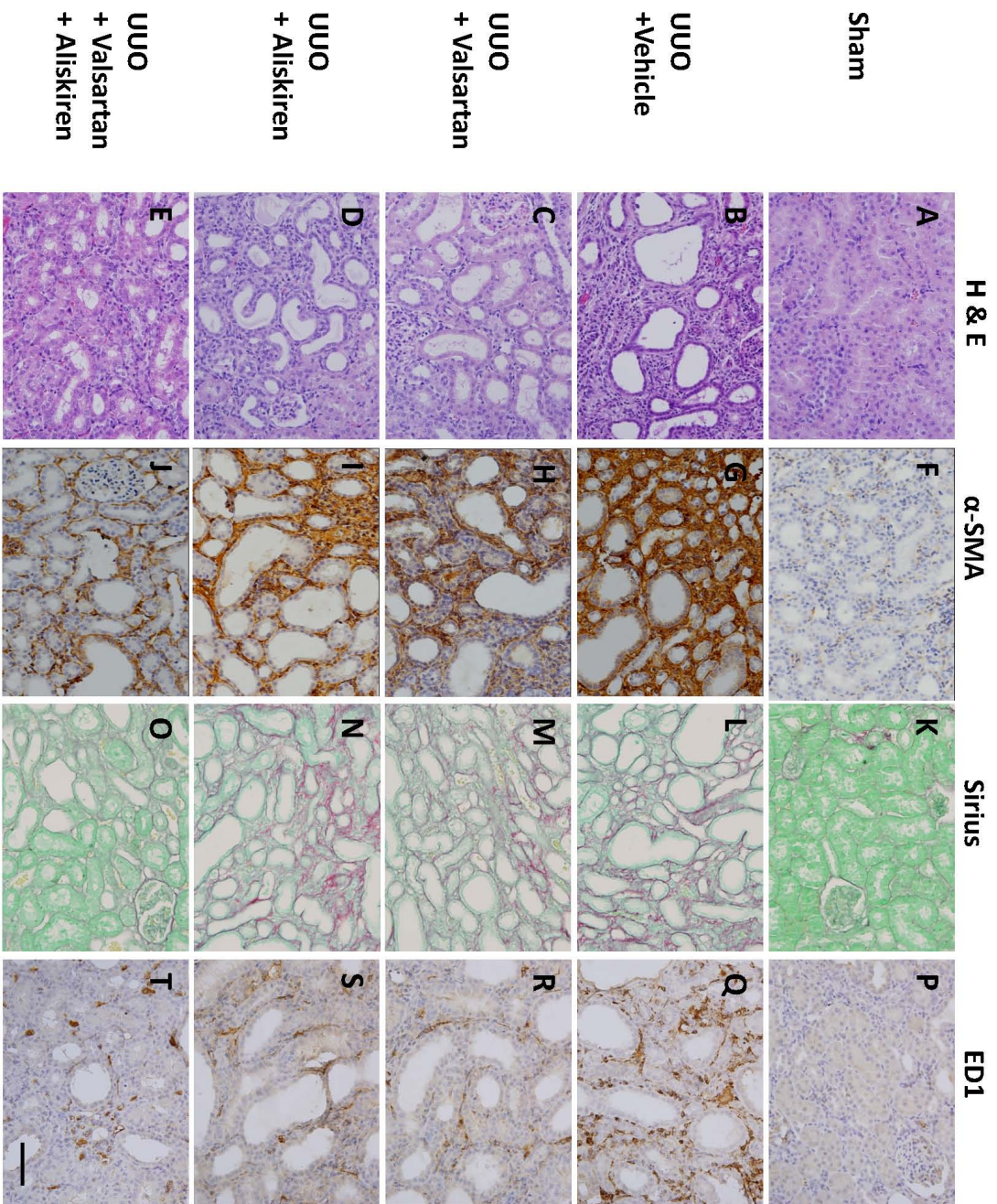


圖6、阻斷RAS減少單側輸尿管阻塞手術後第七天和第十四天的大鼠腎臟腎小管間質損傷之嚴重度積分。(a) 腎小管擴張(tubular dilatation)的嚴重度積分，(b)腎臟的間質容積(interstitial volume)增加的積分，(c) α 型平滑肌肌動蛋白(α -smooth muscle actin)染色的積分，(d) 腎間質膠原蛋白(collagen)沉積的積分，(e) 膠原蛋白的總量(collagen/total protein, $\mu\text{g}/\text{mg}$)，(f) 抗ED1 抗體染色陽性反應細胞的積分。*代表P值小於0.05 (與同天數接受UUO手術但未餵食藥物的大鼠比較)；**代表P值小於0.005(與同天數接受UUO手術但未餵食藥物的大鼠比較)。+代表P值小於0.05(與同天數接受UUO手術又餵食valsartan或aliskiren的大鼠比較)；++代表P值小於0.005 (與同天數接受UUO手術又餵食valsartan或aliskiren的大鼠比較)。每組有五隻老鼠；所有數值均以平均值加減標準誤表示。

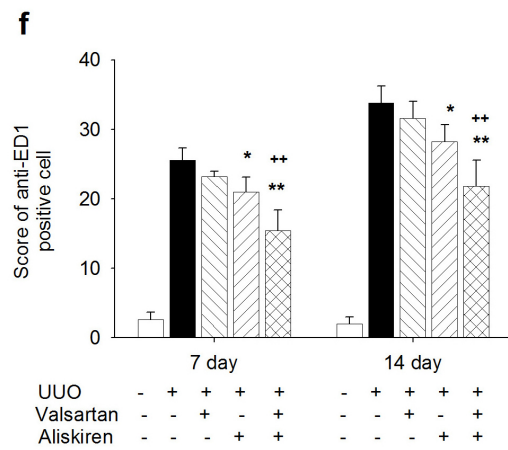
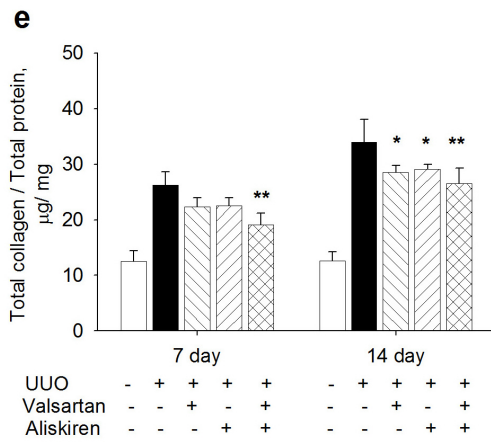
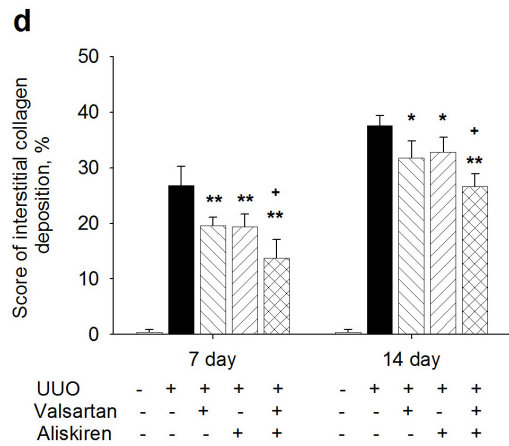
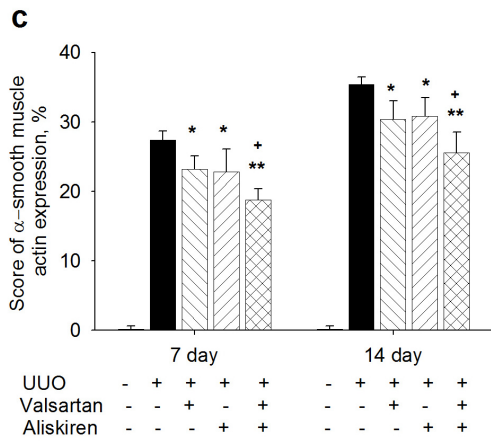
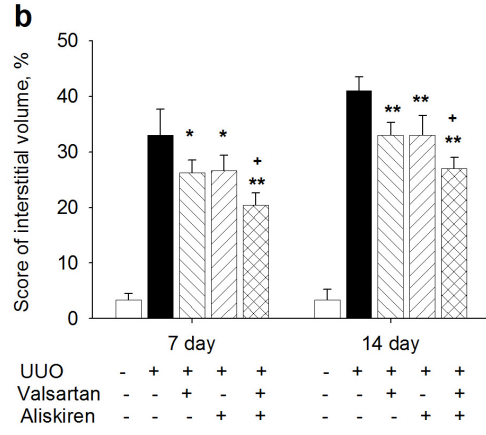
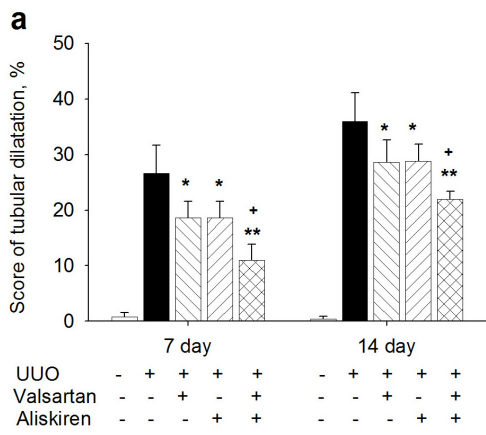


圖 7、西方墨點分析發現合併治療比單獨使用 aliskiren 或 valsartan 更能減少單側輸尿管阻塞手術後十四天第四型膠原蛋白(collagen IV) 的增加和 α -SMA 及 phospho-ERK 1/2 之表現。

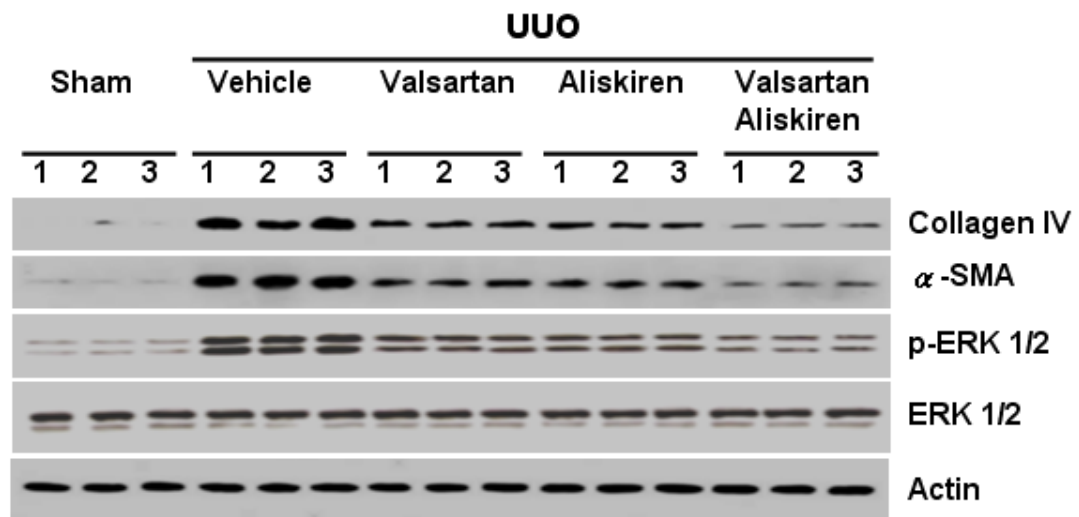


圖 8、Snail 1 及 TGF- β 1 在假性手術，UUO 手術後十四天以安慰劑，**valsartan, aliskiren** 及合併治療的表現。以反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcriptase PCR) 的方式呈現 Snail 1 and TGF- β 1 的表現。

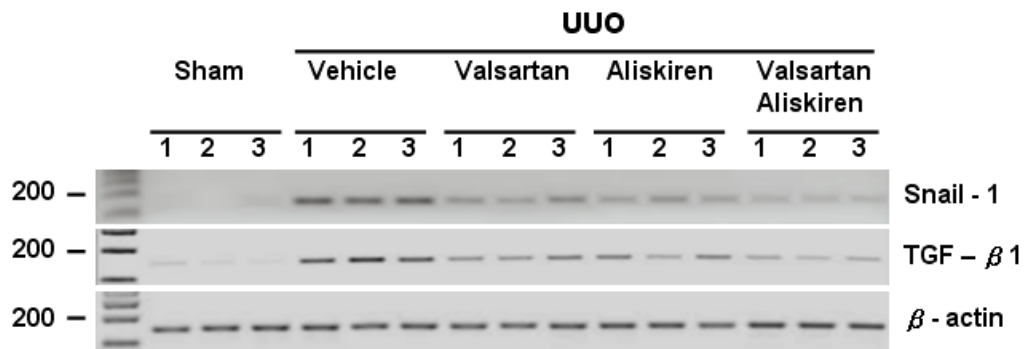


圖9、血漿腎素活性(Plasma renin activity)在UUO手術後七天及十四天的表現。*代表P值小於0.05(與同天數接受UUO手術但未餵食藥物的大鼠比較)；**代表P值小於0.005(與同天數接受UUO手術但未餵食藥物的大鼠比較)。+代表P值小於0.05(與同天數接受UUO手術又餵食valsartan或aliskiren的大鼠比較)；++代表P值小於0.005(與同天數接受UUO手術又餵食valsartan或aliskiren的大鼠比較)。每組有五隻老鼠；所有數值均以平均值加減標準誤表示。

