

南京中医药大学附属医院实验动物研究
伦理审查申请表

1. 项目信息

项目负责人	刘史佳	电话	13951672230	
单位	江苏省中医院			
项目名称	基于亮氨酸代谢重编程探讨白头翁汤调控BCKDH/mTORC1信号通路治疗溃 疡性结肠炎的作用机制			
项目来源	国家自然科学基金面上项目			
预期起始时间	2022.5.25	预期结束时间	2024.12.31	
方案版本号	2.0	方案版本日期	2022.5.27	
动物实验的人员信息				
姓名	单位	电话	上岗证编号	备注
韦鹏	南京中医药大学	18851192235	220203957	
拟购动物1信息				
品种品系	C57BL/6	洁净等级	SPF级	
规格（月龄/体重）	8~12 周龄/18~21g	性别/数量	130只 雌鼠 ♂ / ♀)	
来源（供应商）	江苏集萃药康生物科技股份有限公司			
生产许可证号	SCXK（苏）2020-0004			
饲养环境（使用许可证号）	SYXK(苏)2017-0069	操作场所	南京中医药大学附属医院 实验动物中心	
拟购动物2信息				
品种品系		洁净等级		
规格（月龄/体重）		性别/数量	只（ ♂ / ♀)	
来源（供应商）				
生产许可证号				
饲养环境（使用许可证号）		操作场所	南京中医药大学附属医院 实验动物中心	

2. 实验设计和动物操作程序说明

(包括实验目的、实验方法、观测指标、实验结束后处死动物的方法等)

1. 实验目的

(1) 运用靶向代谢组学与蛋白质组学方法,明确白头翁汤治疗 UC 的差异代谢物与差异蛋白;确定亮氨酸代谢重编程与 mTORC1 信号通路在 UC 中的调控关系;

(2) 明确白头翁汤对亮氨酸分解代谢限速酶 BCKDH 的影响,阐明白头翁汤通过 BCKDH 限速酶对亮氨酸进行调控从而介导 mTORC1 信号通路,揭示该作用机制在治疗 UC 中的重要作用;

2. 实验方法

(1) 动物造模:造模用成年的 C57BL/6(8~12 周龄)雌鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。(UC 在成年男性和女性中的发病率无明显差异,但是课题组既往研究经验表明雌鼠对 DSS 更为耐受,更利于造模,且大量的文献中 DSS 造模均采用雌鼠。)实验小鼠经过 1 周饲喂后,进行 UC 的诱导。空白对照组饮用蒸馏水,模型组与给药组小鼠均饮用 3.5 % DSS (3.5%浓度在课题组前期预实验中效果较好),持续 7 d。与对照组比较,观察小鼠体质量衰减百分率、粪便性状、便血情况,计算小鼠疾病活动度指数 (DAI),进行结肠形态学及组织学评分,检测结肠组织 MPO 含量等,明确其治疗效果。

(2) 小鼠使用计算机 EXCEL 程序按体重随机分成 7 组:空白对照组 15 只、模型组 20 只、亮氨酸组 20 只、美沙拉嗪组 20 只,白头翁汤组 20 只, BT2 组 15 只,雷帕霉素组 15 只(因空白/模型/亮氨酸/美沙拉嗪/白头翁汤组小鼠后续涉及到实验较多,有 qPCR、WB、免疫组化、质谱等等,故多 5 只)。

(3) 给药:空白组: C57BL/6 雌性小鼠常规饲养;模型组:饮用 3.5 %DSS,持续 7 d,建立结肠炎小鼠模型;白头翁汤组 6.83 g/kg (方剂由白头翁 15g,黄柏 12g,黄连 6g,秦皮 12g, 60kg 为成年人体重, 9.1 为小鼠换算剂量系数,小鼠体重 20g,给药剂量= $(15+6+12+12) * 9.1 / 60 = 6.83 \text{g/kg}$),每天灌胃给药 1 次,连续 7 d;阳性药组:美沙拉嗪组 400 mg/kg;雷帕霉素组 1.5 mg/kg,每天灌胃给药 1 次,连续 7 d; BT2 组 20 mg/kg,每天给药 1 次,连续 7 d;亮氨酸组 1.5 g/kg,每天给药一次,连续 7 d。

(4) 标本采集:末次给药 24 h 后,采用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(常规剂量: 45mg/kg),眼眶静脉丛取血,随后过量麻醉(麻醉剂量: 90mg/kg)并脱颈椎法处死小鼠,全血离心后将血清储存于 -80℃超低温冰箱中用于细胞因子检测、代谢组学以及蛋白质组学的检测。摘取肛门至盲肠端的结肠肠段,测量结肠长度;将肠管沿纵轴剖开,以冷生理盐水冲洗,肉眼观察结肠粘膜的损伤情况;取结肠组织,迅速放入液氮中冷冻, -80℃冷冻保

存, 进行其它指标检测。取约 1 cm 长含有病变部位的结肠, 10 %中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 用于 HE 染色。

3. 检测指标

(1) 实验期间, 观察小鼠的精神状态、饮食饮水状况、毛发是否光亮顺滑, 每天记录小鼠体质量变化、粪便性状及便血情况, 进行疾病活动度指数 (DAI) 评分的测定。DAI 由体重减失率分数, 大便性状分数和便血分数相加而得, 分值在 0~12 之间。评分标准如下: 1) 体重减失率评分: 体重无减轻, 0 分; 减轻 5%~9%, 1 分; 减轻 10%~14%, 2 分; 减轻 15%~20%, 3 分; 减轻大于 20%, 4 分。2) 大便性状评分: 正常, 0 分; 松散, 1 分; 半成型稀, 2 分; 不成型稀, 3 分; 水样泄, 4 分。3) 便血评分: 便血阴性(-), 0 分; 便血弱阳性(+), 1 分; 便血阳性(++), 2 分; 便血强阳性(+++), 3 分; 肉眼可见血便, 4 分。

(2) ELISA 法检测细胞因子的分泌情况: 取-80℃冷冻保存的结肠组织, 用匀浆器制成组织匀浆后, 按 ELISA 试剂盒说明书方法测定不同组间各样本肠壁组织中 IL-6、IL-17、TNF- α 、IL-10、IL-1 β 等炎症因子的含量。

(3) Western-blot 检测 S6K、p-S6K、S6、P-S6、4E-BP1、P-4E-BP1、BCKDHA、P-BCKDHA、BCKDK、PP2Cm 的蛋白表达水平: 采用相应试剂盒提取肝脏和结肠标本总蛋白, 运用 BCA 试剂盒对蛋白进行定量, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳浓缩分离蛋白质, 转膜、封闭、一抗二抗依次孵育、显色、曝光。具体步骤按照试剂说明书进行。

(4) Real-Time PCR 检测给药后各组结肠组织中 S6K、S6、4E-BP1 等指标 mRNA 的表达水平

按 Trizol 试剂盒说明书进行。

反转录反应: 在 50 μ L 反应体积中进行, 成分如下: 总 RNA 16 μ L, 随机引物 10 μ L, 65℃水浴 5 min, 冰浴 2 min; 加 24 μ L 逆转录反应液(5 $\times$ buffer 10 μ L, dNTP 4 μ L, DEPC 水 8 μ L, 逆转录酶 2 μ L), -20℃保存备用。

引物扩增设计: 根据 Genbank 序列, 设计各个引物序列并合成。实时定量 PCR 实验方法: 使用 Light Cycler PCR 扩增仪 (Roche) 荧光扩增; 求出 CT 值。

(5) 免疫组织化学法检测结肠组织中 P-S6K、P-S6、P-4E-BP1、P-BCKDHA 的表达水平

1) 结肠组织切片脱蜡, 0.01M PBS 溶液漂洗 3 次, 每次 5 min; 切片用 0.3 %H₂O₂ 和 0.5 %Triton X-100 混合液于室温作用 30 min;

2) 抗原修复: 切片用 0.05M PBS 溶液, 微波炉加热 100℃20 min, 自然冷却至室温;

封闭，用正常羊血清封闭非特异性抗原，37℃水浴箱中温浴 30 min；

3) 一抗孵育，37℃水浴箱中 1 h，4℃过夜，之后 0.01M PBS 溶液漂洗 3 次，每次 5 min；
二抗孵育，生物素化二抗，37℃水浴箱中 1 h，之后 0.01M PBS 溶液漂洗 3 次，每次 5 min；
加入 ABC，37℃水浴箱中 1 h；DAB 显色；

4) 苏木素复染核 3~5 min，自来水浸泡冲洗，盐酸-酒精分色，梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。空白对照一抗用 0.01 M PBS 溶液代替。

(6) 靶向代谢组学检测白头翁汤干预后小鼠血清、肝脏和结肠组织中氨基酸等内源性代谢物的变化

4. 处死方法

末次给药 24 h 后，采用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（常规剂量：45mg/kg），眼眶静脉丛取血，随后过量麻醉（麻醉剂量：90mg/kg）并脱颈椎法处死小鼠。

2. 有毒有害试剂

实验过程中是否会使用到危险化学品、毒素、生物制品等。

有毒有害试剂	有	无	试剂名称
危险化学品或药品(传染性病原、放射性物质、致癌物，等)		无	
生物制品（病毒、血清、细胞，等）		无	
其他		无	

3. 手术操作（如果有）

简要阐述手术过程，包括手术地点、无菌方法和操作、疼痛管理以及术后观察和护理。
若实验过程中需要对动物进行麻醉，说明麻醉使用的试剂、剂量、使用频率和给药途径。

无手术操作。

4. 预期实验会对动物造成的伤害（根据实际情况填写，勿全选）：

① 肿瘤生长	
--------	--

②	体重增加或减少	体重下降，模型组可能降至15~16g
③	丧失饮食饮水能力	
④	手术感染、贫血	
⑤	药物理化刺激垂死、濒死	
⑥	死亡	可能会有1~3只在造模过程中死亡
⑦	其他异常临床症状	便血
因病患及伤害造成动物垂危时如何处理？需实施仁慈终点的标准？④		
溃疡性肠炎小鼠模型采用3.5%DSS 造模，周期7天，期间不排除有少部分模型组小鼠炎症反应剧烈，体重下降幅度大，便血严重，可适当降低DSS饮用浓度已减轻炎症症状。		

④例如：肿瘤造瘤实验要考虑肿瘤的大小、动物承受力，“虚弱（无法进食或饮水）”“实体瘤的大小超过动物体重的10%”；手术实验要考虑，“感染，在抗生素治疗无效并伴随动物全身性不适症状”“心血管系统：大失血、已给予一次输液治疗后仍贫血（低于20%）”；化学药物刺激实验要考虑“垂死/濒死：动物在没有麻醉或镇静的状态下，表现精神抑郁伴随体温过低（低于37℃）时”

5. 实验终末点（何为实验终末点？是否需要安乐死或其它处置？若有，请详细说明。）

实验终末点（指实验结束后动物如何处置）

末次给药 24 h 后，采用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（常规剂量：45mg/kg），眼眶静脉丛取血，随后过量麻醉（麻醉剂量：90mg/kg）并脱颈椎法处死小鼠，全血离心后将血清储存于-80℃超低温冰箱中用于细胞因子检测、代谢组学以及蛋白质组学的检测。摘取肛门至盲肠端的结肠肠段，测量结肠长度；将肠管沿纵轴剖开，以冷生理盐水冲洗，肉眼观察结肠粘膜的损伤情况；取结肠组织，迅速放入液氮中冷冻，-80℃冷冻保存，进行其它指标检测。取约 1 cm 长含有病变部位的结肠，10 %中性福尔马林固定，石蜡包埋，切片，用于 HE 染色。

安乐死/其它处置

	过量麻醉④	采用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉，常规剂量：45mg/kg，过量麻醉（麻醉剂量：90mg/kg）并脱颈椎法处死小鼠。		
	CO ₂ 窒息法			
	其他⑥			

④说明麻醉药物使用的试剂、剂量、使用频率和给药途径。

末次给药24 h后，采用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（常规剂量：45mg/kg），眼眶静脉丛取血，随后过量麻醉（麻醉剂量：90mg/kg）并脱颈椎法处死小鼠。

⑤说明所使用的其他安乐死方法或其它处置方式。

6. 是否保存动物尸体

是 4 °C ④			
是 -20 °C ⑤		尸体存于-20°C环境	
否 ⑥			

④指试验期间，动物非工作时间死亡，暂存于4°C以待解剖。

⑤指解剖结束后，动物尸体暂存于-20°C，委托实验动物中心集中处置。

⑥指试验期间，动物非工作时间死亡，动物尸体无需解剖取材；或试验结束后，无需处死动物，委托实验动物中心代为处置。

7. 项目负责人声明

8.1 我保证我已确认此项研究不是对已发表的研究的无谓重复。

8.2 我保证我已查阅相关文献资源和数据库，确认该项目必须用实验动物进行实验，而不能够用计算机模拟、细胞培养等非生命方法替代动物或用低等动物替代高等动物以取代此研究计划中的操作程序。保证实验方案中涉及到的实验方法、实验观测指标和动物处死方法都经过优化，善待动物。

8.3 我保证我所使用的实验动物的品种品系、质量等级及规格合适，使用数量为获得统计学有效结果的最小量。

8.4 我保证若要对研究计划进行重大的改动，将会事先申请获得南京中医药大学附属医院实验动物管理委员会和伦理委员会审查批准。

8.5 我保证文中列出的所有人员均被授权在此项研究中进行动物试验操作，且均已接受实验动物从业人员上岗培训。

8.6 我保证我熟悉并将遵守所有的校内、省市及国家相关政策法规，符合《Guide for the Care and Use of Laboratory Animals》要求。

项目负责人签（章）： 日期： 2022.5.30

实验动物使用许可证

许可证号：SYXK(苏)2017-0069

单位名称：江苏省中医院

法定代表人：方祝元

设施地址：南京市鼓楼区凤凰西街150-1号

适用范围：屏障环境（SPF级：大鼠、小鼠，药理实验室3楼，90 m²）

有效期：二〇一七年十二月八日至二〇二二年十二月七日

二〇一七年十二月八日

