



南方医科大学珠江医院实验动物伦理委员会

Laboratory Animal Ethics Committee, ZhuJiang Hospital of SMU

实验动物伦理审查证明

项目名称	急性肝损伤和修复过程中免疫细胞浸润研究		
项目负责人	谢源	部门科室	肝胆二科
电话	13928864496	邮箱	601244092@qq.com
拟使用实验动物情况	动物品种品系: <u>C57BL/6J</u> ; 等级: <u>SPF</u> ; 数量: <u>100</u> 只 动物品种品系: <u>LECT2-KO</u> ; 等级: <u>SPF</u> ; 数量: <u>10</u> 只		
审查声明	<p>该申报项目经实验动物伦理委员会初审, 符合动物保护、动物福利和伦理原则, 符合国家实验动物福利伦理的相关规定。此证明仅供科研项目申报使用, 项目批准后需重新递交详细的研究方案供伦理委员会审查方可开展动物实验。</p> <p style="text-align: right;">南方医科大学珠江医院 实验动物伦理委员会 2022年2月17日</p> 		

南方医科大学 Southern Medical University (SMU) 实验动物研究方案 ANIMAL STUDY PROTOCOL

研究课题 Title : 急性肝损伤和修复过程中免疫细胞浸润研究

课题来源 Sponsor: 国家自然科学基金

Section A. 人员及培训 PERSONNEL AND TRAINING

A1. 课题组负责人 (PI) Principal Investigator (Co-Investigators may follow)

姓名 Name	职称 Titles	单位 Unit	邮址 E-mail	电话 Phone
周俊杰	教授	基础医学院病理学系	weijiezhouum@163.com	13925005634

A2. 课题组负责人是否亲自操作? Does the PI have direct contact with animals?

是 Yes

不 No

A3. 动物实验操作人员? Who will perform the experimental manipulations on animals?

姓名 Name	职称 Title	上岗证号 Animal User Permit No.	联系电话/邮箱 Telephone No./ E-mail
谢源	博后	201905011	13928864496
胡洋	博士	201905005	13533528011

A4. 操作者是否有相关的操作经验? Are the persons performing the experiments or surgeries with animals experienced with the specific procedures involved?

是 Yes

不 No, 说明他们在进行实验之前如何受到相关培训 Indicate how they will receive training before the experiments begin.

由 PI 培训 Training by PI

由其它单位或个人培训 (姓名) Training by other (Name)

Section B. 实验概要 EXPERIMENTAL SUMMARY

实验动物管理和使用委员会将确保实验动物品系的适当性及所需最小量来保证实验操作的可靠性。The IACUC is mandated to certify that investigators are using the appropriate species and the minimal number of animals necessary, and that alternative approaches have been considered. This is only possible when the committee is provided with sufficient insight into the goals and strategies for the experiment.

B1. 实验目的或预期目标是什么? What are the objectives or underlying hypotheses of the experiments?

探索各种免疫细胞在急性肝损伤和修复过程中的定量改变, 以及 LECT2 表达与炎细胞浸润之间的关系。

B2. 你的实验最终如何让患者 (人或动物) 受益? How might a patient population (human or animal) ultimately benefit from your experiments?

急性肝损伤可由多种因素诱导发生, 包括病毒感染、自身免疫性疾病、酒精或药物滥用、毒素摄入等, 肝脏急性损伤, 严重者可导致肝功能衰竭甚至死亡。体内的各种免疫细胞, 包括中性粒细胞、自

然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、巨噬细胞和T细胞，在急性损伤后被定向招募到受损和病变部位。既往研究表明，这些免疫细胞可能参与到肝脏损伤和修复的进程中。完整描述肝脏损伤和修复过程中各种免疫细胞定量改变，可以揭示这些免疫细胞的潜在作用，未来或许通过在不同时间点调节不同的免疫细胞，可以帮助治疗急性肝损伤。目前为止，这些不同的免疫细胞从最初肝脏受损到随后肝脏自我修复的这一完整过程，尚未系统描述和研究。

LECT2(白细胞来源的趋化因子2)是一种主要由肝细胞产生，分子量约为16kda的分泌蛋白，它于1996年首次在人T细胞白血病SKW-3细胞中成功分离。既往研究表明LECT2是一种多效蛋白，它不仅可以作为细胞因子发挥趋化作用，而且在一些生理条件和病理异常中，也扮演重要角色，如神经元发育、肝脏再生、造血干细胞稳态维持、肝纤维化、胰岛素抵抗和肾淀粉样变性等。我们团队前期发表的论文表明，慢性肝纤维化时，LECT2水平表达增加，LECT2可以通过促进肝血窦毛细血管瘤化，加重慢性肝纤维化。LECT2-KO的小鼠，肝血窦毛细血管瘤化进程明显减弱，慢性肝纤维化程度明显缓解。但是，LECT2在急性肝损伤和修复时如何变化，LECT2的变化与免疫细胞变化是否相关，LECT2是否可能像慢性肝纤维化那样，成为急性炎症过程中的一个治疗靶点，有待于进一步研究。

本研究采用CCl4(四氯化碳)诱导和ConA(刀豆蛋白A)诱导的急性肝损伤模型，分别模拟毒素诱导和免疫介导的肝损伤，并通过血清学和组织学分析，定量监测肝脏浸润的各种免疫细胞改变以及LECT2的表达水平变化。

B3. 请详述所采用的动物实验程序（涉及动物的实验方法及操作顺序，药物的剂量/给药途径/药物剂型、取样方法和次数等）Provide a complete description of the procedure(s) to be performed using animals (i.e., nature and time sequence of animal related procedures, dose/route/regimen of drug administration, sampling methods and frequencies, etc.):

实验方案：按下列实验1-4顺序，先做描述性、观察性研究，再做对比性、差异性研究。

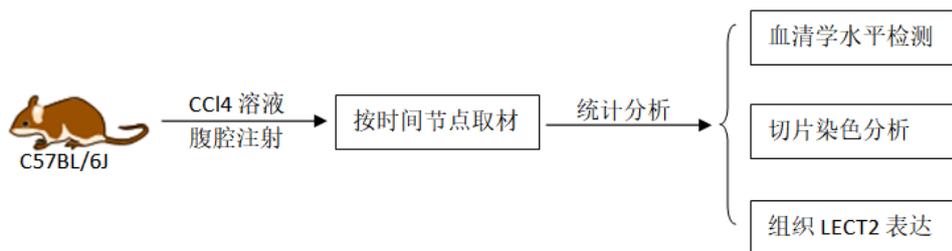
CCl4诱导的急性肝损伤模型建立：四氯化碳与橄榄油按1:4体积比混合，配制成四氯化碳溶液，剂量为10ml/Kg，单次腹腔内注射。

ConA诱导的急性肝损伤模型建立：刀豆蛋白A溶解于PBS溶液，配制成浓度为2mg/mL的溶液，剂量为10mg/Kg，单次尾静脉注射。

实验取材方法：小鼠麻醉后，摘取眼球取血，取完血后，打开腹腔，迅速取出肝脏，一部分肝组织冻存于-80℃冰箱，另一部分肝组织用甲醛固定，做成石蜡样本，进行组织学切片染色分析等检查。获得的全血，37℃静置1小时后，5000转/分钟离心10分钟，提取血清，冻存于-80℃冰箱，留做血清学分析等检查。

小鼠尸体处理：交给学校实验动物中心，统一处理。

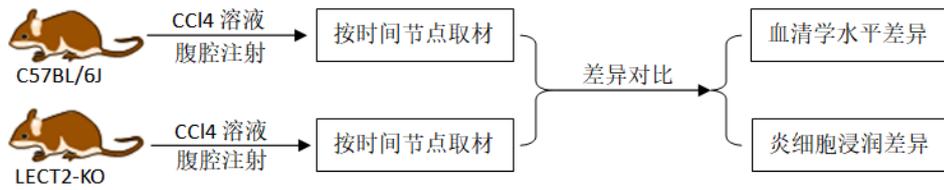
实验1：CCl4诱导的急性肝损伤和修复过程中免疫细胞浸润研究



本批次小鼠为45只，其中5只为不做处理的0h对照组，剩下40只小鼠根据体重，腹腔内注射CCl4溶液，按照注射后6h、1d、2d、3d、5d、7d、10d、14d时间节点，依次取材（全血、肝脏），每个时间点需5只鼠。同理，对照组0h的5只鼠按照上述方式取材。血清学检测肝功能（ALT、AST等）、LECT2水平。石蜡切片做中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT细胞、巨噬细胞和T细胞等细胞免疫组化染色，显微镜拍照，进行细胞计数。冰冻组织提取RNA，通过qPCR做LECT2 mRNA水平检

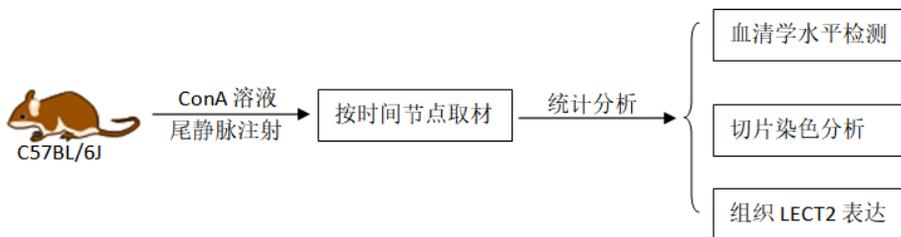
测。综合上述结果，可统计出 WT 鼠急性肝损伤时，从 0h 至 14d，血清肝功、血清 LECT2 蛋白，以及肝组织 LECT2 mRNA、肝内浸润的各种免疫细胞等动态改变。

实验 2: CCl4 诱导的急性肝损伤模型差异对比研究



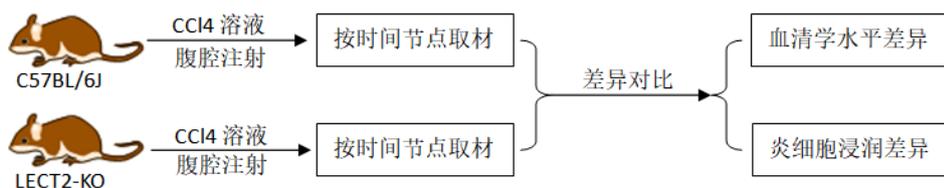
本批次小鼠为 10 只，5 只为 C57BL/6J 小鼠，5 只为 LECT2-KO 鼠。根据实验 1 中的结果，从 6h-14d 中，确定一个肝内免疫细胞浸润数量最为明显的时间节点。C57BL/6J 小鼠和 LECT2-KO 鼠，同时接受腹腔内 CCl4 注射，按照已经确定的时间点取材（全血、肝脏）。血清学检测肝功（ALT、AST 等），石蜡切片做各种免疫细胞的免疫组化染色。统计学分析二组间肝功、炎细胞浸润差异。

实验 3: ConA 诱导的急性肝损伤和修复过程中免疫细胞浸润研究



本批次小鼠为 45 只，其中 5 只为不做处理的 0h 对照组，剩下 40 只小鼠根据体重，尾静脉注射 ConA 溶液，按照注射后 6h、1d、2d、3d、5d、7d、10d、14d 时间节点，依次取材（全血、肝脏），每个时间点需 5 只鼠。同理，对照组 0h 的 5 只鼠按照上述方式取材。血清学检测肝功（ALT、AST 等）、LECT2 水平。石蜡切片做中性粒细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT 细胞、巨噬细胞和 T 细胞等细胞免疫组化染色，显微镜拍照，进行细胞计数。冰冻组织提取 RNA，通过 qPCR 做 LECT2 mRNA 水平检测。综合上述结果，可统计出 WT 鼠急性肝损伤时，从 0h 至 14d，血清肝功、血清 LECT2 蛋白，以及肝组织 LECT2 mRNA、肝内浸润的各种免疫细胞等动态改变。

实验 4: ConA 诱导的急性肝损伤模型差异对比研究



本批次小鼠为 10 只，5 只为 C57BL/6J 小鼠，5 只为 LECT2-KO 鼠。根据实验 3 中的结果，从 6h-14d 中，确定一个肝内免疫细胞浸润数量最为明显的时间节点。C57BL/6J 小鼠和 LECT2-KO 鼠，同时接受尾静脉 ConA 注射，按照已经确定的时间点取材（全血、肝脏）。血清学检测肝功（ALT、AST 等），石蜡切片做各种免疫细胞的免疫组化染色。统计学分析二组间肝功、炎细胞浸润差异。

Section D. 镇静过程 SEDATION FOR PROCEDURES

若适用，请填写 D1-D4 项。If section D is applicable, complete D1-D4.

不适用。Section D is NOT applicable.

D1. 品种/品系 Species/Strain: LECT2-KO 小鼠、C57BL/6J 小鼠

D2. 何时镇静 When is sedation used? 采血时

D3. 药名: 0.5% 戊巴比妥 剂量: 10ul/g 途径: 腹腔注射

D4. 如何控制麻醉深度? How will the depth of anesthesia be monitored?

脚趾收缩反应丧失 Absence of withdrawal reflex to toe pinch

眼睑对光反应迟钝 Absence of blink reflex

其它 Other

Section E. 手术程序 SURGICAL PROCEDURES

如做手术，请完成 E1-E13。If section E is applicable, complete E1-E13.

不做手术。Section E is NOT applicable.

术前准备事项 PRE-OPERATIVE CARE

E1. 实验动物需要术前用药吗? Will the animal require pre-operative drugs?

需要 Yes

不需要 No

药名 Drug name 剂量 Dose 途径 Route 周期 Frequency
不建议对啮齿动物采取禁食禁水。Withholding food and water is not recommended for rodents.

E2. 是否让实验动物存活? Is this a survival procedure?

是 Yes

不是 No

请将动物麻醉后安乐处死.The animal will be euthanized after anesthesia.

E3. 手术过程的描述:Describe the surgical procedure(s):

E4. 怎样缝合皮肤? How will skin be closed?

夹子或不可吸收性缝合 Clips or non-absorbable suture。

夹子或不可吸收性缝合须在术后两周内去除。Must be removed no later than two weeks post-op.

其它方法 (请描述) Other (Please describe):

E5. 手术操作者是谁? Who will perform the surgical procedure?

如需培训，请填写 A4 项。See Section A4 if training will be required.

E6. 手术将在一般消毒条件还是无菌条件下进行? Will surgery take place under sterile conditions or aseptic conditions?

消毒 Sterile

无菌 Aseptic

Rodent surgery can be performed under aseptic conditions, meaning that: (1) the surgical area is clean [wiped down with a disinfectant (i.e., 70% alcohol and betadine solution)], (2) instruments are sterilized either by autoclaving instrument pack or by soaking in a chemical sterilant (Instracal, Amerse) for at least 15 minutes, and (3) the surgeon wears a mask and sterile gloves or latex gloves thoroughly cleaned with 70% ethanol, Alcare, or another germicidal agent.

保持室内温度处于有利于小鼠生长及活动的 26 摄氏度；此外，在小鼠饲养过程中，可能干扰小鼠正常的作息，因此，通过统一管理小鼠饲养房间内照明的时长，模拟正常小鼠 12 小时活动时间和 12 小时休息时间的作息周期。

3. 在对小鼠进行腹腔注射时，注射器针头可能刺穿小鼠腹腔内器官，因此应将小鼠保持在头低尾高的体位，使其腹腔内器官偏向头侧再进行注射，另外，在注射器针头突破小鼠腹膜后，应回抽观察针筒内是否有血液。

4. 在对小鼠进行尾静脉注射时，注射器针头可能刺穿小鼠血管，因此应将小鼠尽量固定，拉直鼠尾，酒精棉球擦拭，暴露尾静脉，尽量水平进针，一次成功，避免穿刺失败给小鼠造成痛苦。

5. 麻醉时给药过多可能会导致小鼠死亡，因此在对小鼠给药前，需要对小鼠进行体重测量，根据体重准确计算给予剂量并注射。

F2. 主要观察指标 Main observation target

小鼠活动度、行为、体温、食欲以及对外界刺激的反应。

F3. 仁慈终点或实验终结的指标 Humane endpoint or experimental terminative indicator

每天应该由专人对病情危重的动物进行观察记录两次（早晚各一次）。当发现动物有死亡征兆，如有蜷缩，一动不动，皮毛皱褶，不进食，体温降低（直肠温度 $< 34^{\circ}\text{C}$ ）或体重下降（ $> 20\%$ ）等症状时，经慎重考虑之后对动物实施安乐死；如动物不能站立，呼吸困难，严重的肌肉萎缩，严重溃疡或流血不止时应及时采用适当的方法让其安乐死。

Section G. 安乐死 EUTHANASIA

安乐死须符合国际惯例或参照美国兽医医学协会制定的安乐死的最新指导方案。Methods must accord with international conventions or refer to current guidelines of the AVMA Panel on Euthanasia (www.avma.org).

G1. 方法 Methods

过量麻醉药 Drug overdose

三倍剂量的复合麻醉剂 Triple the recommended anesthesia dose for the combination anesthesia.

戊巴比妥钠 120mg/kg，静脉注射 Pentobarbital sodium, 120 mg/kg IP, IV in rodents and rabbits.

CO₂吸入 CO₂ inhalation。适用于啮齿动物。Approved for rodents.

麻醉后颈椎脱臼 Cervical dislocation under anesthesia。适用于小鼠和体重小于 200 克的大鼠 Approved for mice and rats less than 200 grams.。

麻醉后断颈 Decapitation under anesthesia

麻醉后放血 Exsanguination under anesthesia

其它（请说明）Other (Describe.)

Section H. 健康与安全 HEALTH & SAFETY

H1. 是否为感染性实验？ Is it an infectious experiment?

否 No.

是 Yes

H2. 实验过程中是否使用有毒有害物质，包括放射性物质、病原微生物、危险化学药品等？ Will procedures utilize potentially hazardous materials, including radioactive substances, infectious microorganism, hazardous chemicals, and hazardous waste?

没有 No.

有，请列出 Yes. Please list.

四氯化碳溶液

H3. 人员是否需要训练程序（例如危险、疾病、过敏反应防治措施） Will procedures require training of personnel (e.g., hazard/ illness /immunosuppression precautions)?

不需要 No

需要，请列出 Yes, Please list type:

H4. 是否需配有人员安全保护装备（例如手套、衣服、安全眼镜或眼罩） Will personal protective equipment (PPE) be required (e.g., gloves, clothing, safety glasses/goggles) ?

不需要 No

需要，请列出 Yes, Please list type: 手套、口罩

H5. Are specific procedures required for personal protection (e.g., shower/change facilities, injury or contamination prevention)?是否需要人员自身保护的特别程序（例如淋浴或更换装备、伤害或污染的预防装备）

不需要 No

需要 Yes