

中南大学实验动物福利伦理审查申请表

NO: 201804020280

一、申请者基本情况			
项目名称	薯蓣丸抑制 HIF-1 α 改善肝癌微环境缺氧与免疫逃逸的机制研究		
任务来源	医院课题	资助类别	☒ 1.纵向 ☐ 2.横向
资助等级	☒ 1.国家级 ☐ 2.省部级 ☐ 3.厅局级 ☒ 4.其他		
实验种类	☒ 1.医学研究 ☐ 2.药物疫苗类 ☐ 3.生物类 ☐ 4.农业研究 ☐ 5.健康食品 ☐ 6.其他		
申请单位	湖南中医药大学		
项目负责人	邓哲	电话:15243602168	E-mail:502120935@qq.com
联系人	曾维予	电话: 15874286045	E-mail:362626330@qq.com
	郭垠梅	电话: 13298684330	E-mail:747323953@qq.com
申请目的	☒ 初次申请 ☐ 延长 ☐ 修改原申请 (原批准号:)		
合作单位	无		
合作者	无		
二、所需实验动物			
品种: B/C 裸鼠		级别: SPF	年龄: 5w
体重: 20 $\pm$ 2g		雌 (只) : 0	雄 (只) : 24
来源	☒ 1.实验动物学部统一采购: ☐ 2.国内其他正规饲养繁殖单位: ☐ 3.国外引进:		
饲养场地	☒ 实验动物学部 ☐ 自己实验室 ☐ 其他		

三、以非专业语言简述本研究的目的及对人类、动物或科学的贡献

肝癌是常见的恶性肿瘤之一，其发病率、死亡率高。肝癌作为实体瘤具有缺氧与免疫功能紊乱的特征，临床治疗容易对化疗药物产生抵抗和耐药。缺氧是实体瘤发生发展过程中伴随的常见现象，肿瘤组织的低氧是促使癌症进展、转移、耐药和免疫抑制的中介，改善肿瘤微环境的缺氧情况有助于抑制肿瘤的发生发展，帮助有效改善肝癌患者生存质量，延缓病情进展。

中医药是肝癌重要的治疗手段。肝癌主要病机是脾气亏虚、痰瘀毒结，治疗以健脾益气、扶正抗邪为法。根据“脾主运化、实四肢、主肌肉，为后天之本”的思想，健脾扶正法用于肝癌的治疗具有保护骨骼肌、改善消化功能、增强食欲、加强抗癌的综合作用。本课题以健脾扶正法作为切入点治疗肝癌，而薯蓣丸是健脾扶正法的代表方剂，其成分具有抗氧化，改善耐药，增强免疫，辅助抗肿瘤等多方面的作用。本课题将薯蓣丸应用于肝癌的治疗，研究薯蓣丸对微环境缺氧与免疫逃逸的影响，挖掘其对肝癌患者缺氧与免疫功能紊乱的治疗潜力，帮助改善肝癌患者生存质量，延缓病情进展，为化疗药物耐药及抵抗的肝癌患者提供新的治疗方案。

四、请以实验动物“3R”原则为考虑重点，说明进行动物实验的必要性，包括非动物模型不合适性及选择该动物品种的理由。

A.使用动物的理由

☒1.一些生物学过程和机理不能在体外研究

☒2.已进行体外实验，现需进行体内实验

☒3.体外实验需要动物组织

☐4.其他请具体说明：

B.使用某品种动物的理由

- ☒1.该品种的生理学、解剖学、身体大小等特点最适于本研究
- ☒2.该品种是本实验公认的理想动物模型
- ☒3.利用该品种已获得大量的相关数据，本研究进一步扩展该品种相关数据
- ☐4.从其他品种动物扩展相关数据到该品种
- ☐5.其他请具体说明：

C.请说明使用动物数量的充分理由：

本实验，需要在适应性饲养一周后进行肿瘤，灌胃，分4组，每组6只，共计24只。

五、描述动物实验的设计

① 实验分组:将 24 只裸小鼠随机分为四组(对照组、薯蓣丸组、薯蓣丸联合化疗组、化疗组)，薯蓣丸组用配置好的薯蓣丸颗粒剂灌胃，化疗组腹腔注射顺铂，对照组用等体积的生理盐水灌胃。

② 实验准备:实验器械(高压灭菌小鼠灌胃器、1mL 注射器)、薯蓣丸试剂配置(将薯蓣丸颗粒溶于生理盐水中，配置成浓度为 2g/mL)、注射用生理盐水、顺铂注射液 0.4g/mL、碘伏。

③ 实验组:薯蓣丸组 薯蓣丸颗粒剂溶液 2g/mL/d 灌胃；薯蓣丸联合化疗组：薯蓣丸颗粒剂溶液 2g/mL/d 灌胃+顺铂注射液 0.4g/mL/d 腹腔注射；化疗组：顺铂注射液 0.4g/mL 腹腔注射；对照组:用等体积的生理盐水灌胃。

④ 细胞准备:细胞于 75 cm² 培养皿中培养至 80%，将培养液吸出，用 10mmPBS 洗一次后，加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶溶液，倒置显微镜下观察细胞，待胞质回缩，细胞之间不再连接成片，则加入新鲜的含 10%FBS 的培养液，终止消化，用吸管将

已经消化细胞吹打成细胞悬液，将细胞悬液吸入 15mL 离心管中天平配平后将离心管放入台式离心机中，1000 rpm，离心，5min。弃去上清液，加入适量新鲜培养液，用吸管轻轻吹打细胞制成细胞悬液。用血球计数板计数。

⑤ 先将裸小鼠每只 0.15 mL 1%戊巴比妥钠麻醉,将人肝癌细胞通过尾静脉注射裸鼠;造模成功后，分组给药 14 天。

⑥2w 后脱颈处死取出移植瘤体积及，称重后取部分新鲜组织用于 Western-blot 检测 EMT 相关蛋白；部分进行包埋，步骤:4%多聚甲醛 4 小时→50%酒精 4 小时→75%酒精过夜→85%酒精 3 个小时 →95%酒精 2 小时→100%酒精(1)1 小时→100%酒精(2)1 小时→二甲苯(1)30 分钟→二甲苯(2)30 分钟→50%二甲苯石蜡 1 小时→石蜡(1)1 小时→石蜡(2)2 小时→包埋。

⑦ 裸小鼠的日常喂养:向动物房购买高压灭菌饲料 2-3 天加一次饲料，饮用高压灭菌用水 2-3 天换 一次。3 天更换一次笼子。

1、具体说明所选物质的给药方案

药名	给药剂量和频率	给药途径	给药部位	备注
薯蓣丸	2g/mL/d	灌胃	胃部	Qd
顺铂注射液	0.4g/mL/d	注射	腹腔	一次

2、说明动物保定的必要性，动物保定的方法，包括设备和药物。

保定的必要性：保证自己的人身安全，方便手术

保定的方法：固定不动，方便手术

3、标本采集方案

采集的组织或液体	采集方法	数量或体积	采集频率	持续时间或最大采集数量

肿瘤组织	解剖	每只一个	一次	24

4、动物标识

☐染色☒耳标☐芯片

☐缠绷带☐纹身☐剪趾

☐插笼卡☐剪耳☐其它（请说明）

六．描述手术过程，使审查者知道本实验将做什么，怎样做。
手术过程：1、用生理盐水配 7%浓度的水合氯醛
2、称取小鼠体重并记录
3、以 0.5ml/100g 剂量腹腔注射水合氯醛
4、皮下取出瘤体，保存于液氮罐中以进行后续检测指标。
5、脱颈法处死老鼠，袋装后冷冻，由学校实验动物中心作无公害化处理

手术操作人及培训情况	已经通过了培训，有了一定的操作及手术能力
手术执行地点	湘雅实验室解剖室
实验后的护理	袋装后冷冻，由学校实验动物中心作无公害化处理
是否在同一动物上进行多个操作	☒ 否 ☐ 是，具体说明：

七．导致疼痛的分类

☒A.无疼痛

☐B.一般性疼痛

☐C.轻微疼痛

☐D.有疼痛，但能够解除

☐E.不能缓解的疼痛

八. 麻醉、镇痛

药物名称	给药剂量和频率	给药途径	维持时间
水合氯醛	0.5ml/100g	腹腔	1-2 小时

九. 人道主义结束动物生命

A 、人道主义结束动物生命标准

☒1、体重减轻：体重减轻达 20-25%，或是动物出现恶病质或消耗性症候时。

☐2、实体瘤的大小超过动物体重的 10%。

☐3、丧失食欲：小型啮齿类动物完全丧失食欲达 24 小时或食欲不佳（低于正常量之 50%）达 3 天时。大动物完全丧失食欲达 5 天或食欲不佳（低于正常量之 50%）达 7 天时。

☐4、虚弱（无法进食或饮水）：动物在没有麻醉或镇静的状态下，无法进食或饮水，长达 24 小时无法站立或极度勉强才可站立时。

☒5、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。

☐6、感染：在抗生素治疗无效并伴随动物全身性不适症状出现时：

☐a、器官：出现器官严重丧失功能的临床症状且治疗无效，或经动物中心兽医判断预后不佳。

☐b、呼吸系统：呼吸困难、发绀大失血。

☐c、心血管系统：大失血、已给予一次输液治疗后仍贫血（低于 20%）

☐d、消化系统：严重呕吐或下痢，消化道阻塞，套迭，腹膜炎，内脏摘除手术

☐e、神经系统：中枢神经抑制、震颤、瘫痪（其中任一支或以上）、对止痛剂治疗无效之疼痛。

☐f、肌肉骨骼系统：肌肉受损或骨折使肢体丧失功能（实验预期发生并通过 IACUC 审核除外）

☐g、皮肤：无法治愈之伤口、重复性自残或二级以上之保温垫烫伤

B、安乐死

☐ 1、迅速断头

☒ 2、头颈部迅速脱臼 (<1kg)

☐ 3、在全身麻醉下放血 (适合猫, 反刍动物, 马, 猪等)

☐ 4、过量吸入麻醉剂 (氟烷、异氟醚、甲氧氟烷等)

☐ 5、腹腔注射安乐死药剂

☐ 6、静脉注射安乐死药剂

☐ 7、二氧化碳或二氧化碳/氧气混合气体

☐ 8、其它, 请具体说明

C、剩余动物的最终处理

☒ 1、对动物实施安乐死

☐ 2、返回生产/育种单位

☐ 3、作其它研究

☐ 4、动物饲养在动物中心, 直到其自然死亡

☐ 5、其它, 具体说明:

D、动物尸体、组织、或体液的最终处理

☐ 1、制作标本

☒ 2、袋装后冷冻, 由学校学校实验动物中心作无公害化处理

☐ 3、其它, 具体说明

十、有害(毒)物质的使用(应得到安全委员会的批准)

	是	否	使用物品的名称
1 放射性同位素	☐	☒	_____
2 生物物品	☐	☒	_____
3 有毒化学品、药品	☐	☒	_____
4 重组 DNA	☐	☒	_____
5 其它	☐	☒	_____

十一、实验人员许可证:

邓哲、郭垠梅、曾维予皆已获得实验人员许可证

十二、承诺

项目负责人承诺书

我承诺该申请表的内容准确无误。

我同意遵守中华人民共和国国家科学技术委员会制定的《实验动物管理条例》、中华人民共和国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》、湖南省人民政府发布的《湖南省实验动物管理办法》。

我承诺包括我自己在内的该申请表中提及的与实验动物有接触的人员，已经参加了中南大学实验动物学部要求的相关培训，掌握了申请表中涉及的动物实验方法，都有能力完成动物实验，并且深知使用这些活体动物及动物组织所存在的风险。

我清楚作为该项目的负责人，有责任承诺本课题组所有成员在本研究工作中均会遵循人道主义原则，确保实验动物的福利伦理，并严格遵守中南大学实验动物学部的相关规章制度。

项目负责人签字：邓哲

日期：2019 年 3 月 1 日

十三、审核意见：

同意审批

主审委员签字：2019

日期：2019 年 3 月 1 日