

Notes for The ARRIVE guidelines checklist

The authors have read the ARRIVE guidelines, and the manuscript was prepared according to the ARRIVE guidelines.

We designed the experiments according to the ARRIVE guidelines. Before we carried out the research, we made a application for the study and the Ethics Committee of Renmin Hospital of Wuhan University approved all procedures involving animals (WDRM#20181114). All experiments were carried out according the procedures in the application form. The details about animals were shown in the application form. The results were analyzed according to the ARRIVE guidelines, too. The results and discussion of the experiments were shown in the manuscript.

The application form was attached to the ARRIVE guidelines checklist. You can find the items of the ARRIVE guidelines in the pages that were noted in the checklist.

The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

| | ITEM | RECOMMENDATION | Reported on page # |
|-------------------------|------|--|--|
| Title | 1 | Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible. | application form p1 |
| Abstract | 2 | Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study. | application form p1-2 |
| INTRODUCTION | | | |
| Background | 3 | <p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p> | application form p2-3 |
| Objectives | 4 | Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested. | application form p3 |
| METHODS | | | |
| Ethical statement | 5 | Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research. | manuscript p20 |
| Study design | 6 | <p>For each experiment, give brief details of the study design including:</p> <p>a. The number of experimental and control groups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when).</p> <p>c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals).</p> <p>A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.</p> | application form p4-5, manuscript p7-8 |
| Experimental procedures | 7 | <p>For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:</p> <p>a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).</p> <p>b. When (e.g. time of day).</p> <p>c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).</p> <p>d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).</p> | application form p3-5 |
| Experimental animals | 8 | <p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naive, previous procedures, etc.</p> | application form p2 |

| | | | |
|---|----|---|-------------------------|
| Housing and husbandry | 9 | Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment. | application form p2 |
| Sample size | 10 | a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant. | application form p3-4 |
| Allocating animals to experimental groups | 11 | a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed. | application form p3-4 |
| Experimental outcomes | 12 | Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes). | manuscript p11-12 |
| Statistical methods | 13 | a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach. | manuscript p7-8, p11-12 |
| RESULTS | | | |
| Baseline data | 14 | For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated). | manuscript p11-12 |
| Numbers analysed | 15 | a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50% ²). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why. | manuscript p7 |
| Outcomes and estimation | 16 | Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval). | manuscript p11-12 |
| Adverse events | 17 | a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events. | manuscript p11-12 |
| DISCUSSION | | | |
| Interpretation/scientific implications | 18 | a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research. | manuscript p11-12 |
| Generalisability/translation | 19 | Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology. | manuscript p11 |
| Funding | 20 | List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study. | manuscript p1 |

References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332.

武汉大学人民医院

实验动物福利伦理审查申请书

编号：WDRM 动(福)第 号

一、项目信息（在“□”中打钩用“☑”表示）

| | |
|--|---|
| 项目名称（中文）及项目号：二氢丹参酮（DHTS）抑制消化道肿瘤发生发展及其机制的研究 项目号：81870392 | |
| 项目名称(英文):Dihydrotanshinone I inhibits the development of digestive tract tumors and its potential mechanism | |
| 项目类型： <input checked="" type="checkbox"/> 科学研究 <input type="checkbox"/> 教学实验 <input type="checkbox"/> 其它： | |
| 项目来源： <input type="checkbox"/> 国家重大专项 <input type="checkbox"/> 973 计划 <input type="checkbox"/> 863 计划 <input checked="" type="checkbox"/> 国家自然科学基金 <input type="checkbox"/> 其它 | |
| 项目负责人 | 董卫国 |
| | 职称/职务:博士生导师 Email:dongweigu@whu.edu.cn |
| | 办公（实验）室电话:13986167388 实验室地址:武汉大学人民医院中心实验室 |
| 联系人 | 齐明明 |
| | 职称/职务:博士研究生 Email:2290694482@qq.com 电话: 18253165263 |
| 拟申请的有效期限 | 2018.12.01-2019.12.31 |

二、动物实验操作人员资质

| 授权进行动物实验的人员 | | | |
|-------------|----|-----------------|--|
| 姓名 | 职称 | 实验动物从业人员考核合格证编号 | 在本项目中的职责（实验设计、实验管理、主操作、操作助手、手术者、麻醉师、动物管理等） |
| 齐明明 | 博士 | TY2018493 | 实验设计、实验管理、主操作 |
| 张岚 | 硕士 | TY2018504 | 实验管理、操作助手、麻醉师 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

三、实验动物基本信息

针对使用的每一种动物的品系填写每一栏。如果使用了 3 种以上或 3 个品系以上的动物，可在后面增加列。

| 内容 | A | B | C |
|------------------------|--|---|---|
| a. 动物品种、品系 | Balb 裸鼠 | | |
| b. 性别 | 雄性 | | |
| c. 年龄范围 | 4 周龄 | | |
| d. 体重范围 | 18-20 克 | | |
| e. 所需动物数量 | 72 只 | | |
| f. 运输方式 | 空运 | | |
| g. 饲养环境(普通、屏障/IVC 和隔离) | 屏障/IVC | | |
| h. 实施地点 | 武汉大学人民医院动物中心 | | |
| i. 是否要求繁殖动物? | 否 | | |
| j. 饲养时间(年月日—年月日) | 2018.12.01— 2019.07.31 | | |
| k. 特殊要求 | 无 | | |
| l. 是否使用基因修饰动物 | 是 <input type="checkbox"/> 否 <input checked="" type="checkbox"/> | | |
| | | | |

四、动物使用的理由和替代方法的检索 (在所有适合的项目前打)

| |
|--|
| <p>a. 解释为什么你的研究中将要使用的动物种类是合理的。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 本实验是以前使用该品种动物实验工作的直接延续。</p> <p><input type="checkbox"/> 本研究致力于扩展以前的从其它品种到这个品种的实验结果。</p> <p><input type="checkbox"/> 对于该品种动物很重要的生理/行为学现象, 现在缺乏了解。</p> <p><input type="checkbox"/> 对于这个品种动物很重要的生理/行为学现象的相关内容比其他品种了解得更多。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 这个品种的选择体现出了在能够使用的最低级的生物体和与人类的生理/行为最相近的模型系统中间最好的折衷方案。</p> <p><input type="checkbox"/> 对于计划开展的研究这个品种是最经济的。</p> <p><input type="checkbox"/> 其他(请解释): _____</p> |
| <p>b. 在本实验中使用活体动物的理由是什么?</p> <p><input type="checkbox"/> 本研究要求对活体动物进行行为测量。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 本研究要求对活体动物进行生物学检测或活体动物的组织样本取材。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 在本实验中, 计算机或者其他模型不能代替动物。</p> <p><input type="checkbox"/> 本研究不能做离体实验。</p> <p><input type="checkbox"/> 其他(请解释): _____</p> |
| <p>c. 所需动物数量的依据。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 统计分析显示, 实验计划的(动物)数量是最少的, 符合统计学上对实验假设进行有效检验的要求。</p> <p><input type="checkbox"/> 实验将进行多个独立因素结果的对比, 因此要求多组。</p> <p><input type="checkbox"/> 结果的检测或者被检测的现象是可变的, 大样本量对于统计上有效的取样是必需的。</p> |

来自于对照组的差异预计是很小的。对于可靠地区分组间差异，大样本量是必需的。

实验具有技术上的困难，需要多次尝试以便从每一次实验中获得令人满意的数据。

其他（请解释）：_____

d. 寻找活体动物使用的替代方法。

至少列出 2 种查阅的数据库（如：中国知网、PubMed 等）

(1) 中国知网 (2) PubMed (3) 其它数据库：web of science

检索日期：2018.10.15 检索涵盖的年份：2000.01.01-2018.09.30

检索关键词（如：动物模型，非动物模型，疼痛，福利，紧张，在体外，培养）：
动物模型、体外实验、体内实验、异种移植瘤

请描述有无活体动物的替代方法：
无

五、研究目的和意义：

以一般非生物学背景人员为对象，用通俗的语言描述研究目的（做什么？），对人类、动物的健康或科学的贡献（原因？）。（避免使用简写和缩写）

研究目的：探索二氢丹参酮是否能够抑制活体动物体内的肿瘤生长

对人类、动物的健康或科学的贡献：若二氢丹参酮可抑制小鼠体内移植瘤生长，可能在人体也能发挥相似的作用，对于抗肿瘤新药物的研发具备指导意义

六、实验计划（设计）和基本实验操作

| 描述项目实验计划（设计）和主要实验操作程序 | <p>1、实验分组（描述实验组、对照组、动物数）：<u>食管癌：对照组、低浓度 DHTS 组、中浓度 DHTS 组、高浓度 DHTS 组各 6 只；肝癌：对照组、低浓度 DHTS 组、中浓度 DHTS 组、高浓度 DHTS 组各 6 只；结肠癌：对照组、低浓度 DHTS 组、中浓度 DHTS 组、高浓度 DHTS 组各 6 只。一共 72 只。</u></p> <p>2、主要实验流程（下表为范例，请根据实验计划修改后填写）</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">时间</th> <th>内容</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>第 1-7 天</td> <td>适应性饲养期</td> </tr> <tr> <td>第 8 天</td> <td>实验开始：于各组小鼠皮下分别注射肿瘤细胞，构建异种移植瘤体内模型</td> </tr> <tr> <td>第 15-35</td> <td>对照组及低中高浓度 DHTS 组小鼠分别注射 0.2ml</td> </tr> </tbody> </table> | 时间 | 内容 | 第 1-7 天 | 适应性饲养期 | 第 8 天 | 实验开始：于各组小鼠皮下分别注射肿瘤细胞，构建异种移植瘤体内模型 | 第 15-35 | 对照组及低中高浓度 DHTS 组小鼠分别注射 0.2ml |
|-----------------------|--|----|----|---------|--------|-------|----------------------------------|---------|------------------------------|
| 时间 | 内容 | | | | | | | | |
| 第 1-7 天 | 适应性饲养期 | | | | | | | | |
| 第 8 天 | 实验开始：于各组小鼠皮下分别注射肿瘤细胞，构建异种移植瘤体内模型 | | | | | | | | |
| 第 15-35 | 对照组及低中高浓度 DHTS 组小鼠分别注射 0.2ml | | | | | | | | |

| | |
|--------|---|
| 天 | 生理盐水、5 mg/kg DHTS、10 mg/kg DHTS、15 mg/kg DHTS，隔天给药 1 次，给药同时记录小鼠体重、小鼠皮下移植瘤长径及短径，共给药 10 次 |
| 第 36 天 | 小鼠麻醉后眼球取血，随后颈椎脱臼法处死。于 75%乙醇中浸泡 10 分钟后取材 |
| | |

3、动物实验给药（如灌胃、注射、皮肤给药、植入、其他___）

是 否，如果是，请填写下表

| 给药方式 | 物质名称 | 剂量 | 部位（如皮下、脑腔等） | 时间点 |
|------|------|------------|-------------|------------------|
| 腹腔注射 | DHTS | 5-15 mg/kg | 腹腔 | 实验第 15-35 天，隔天一次 |
| | | | | |

4、采血：是 否，如果是，请完成该项后面信息。

频率（于实验第几天？）处死动物当天，采血部位眼球，每次每只动物的最大采血量1.5ml

5、预期实验会对动物造成的伤害：肿瘤生长，体重增加或减少，丧失饮食饮水能力，死亡，其它异常临床症状_____

其他需要说明的情况：_____

主要实验流程（造模或手术过程）：

裸鼠适应性饲养后，皮下注射肿瘤细胞悬液，建立裸鼠移植瘤模型，待肿瘤大小达 80-120mm³，腹腔注射二氢丹参酮（DHTS），给药频率为隔天一次，持续 3 周。小鼠麻醉后眼球取血，随后颈椎脱臼法处死取材（取材内容包括小鼠异种移植瘤、肝、脾、肺、脑）。

6、样品采集：是 否，如果是，请填写下表

| | 样本名称 | 部位 | 频率或时间点 | 方法 |
|-----------------|---|----|--------|---------|
| | 血液 | 眼球 | 实验最后一天 | 麻醉后眼球取血 |
| | 移植瘤 | 皮下 | 实验最后一天 | 处死后解剖 |
| | 肝 | 腹腔 | 实验最后一天 | 处死后解剖 |
| | 脾 | 腹腔 | 实验最后一天 | 处死后解剖 |
| | 肺 | 胸腔 | 实验最后一天 | 处死后解剖 |
| | 脑 | 头部 | 实验最后一天 | 处死后解剖 |
| 是否使用有毒化学品或药品 | <input checked="" type="checkbox"/> 没有使用 <input type="checkbox"/> 使用，请描述来源： _____ | | | |
| 使用重组 DNA 或病原微生物 | <input checked="" type="checkbox"/> 没有使用 <input type="checkbox"/> 使用，请描述来源： _____ | | | |
| 对人员健康的潜在危害性 | 无 | | | |
| 对直接接触人员可能的进入途径 | <input type="checkbox"/> 吸入 <input type="checkbox"/> 消化道 <input type="checkbox"/> 皮肤接触 <input checked="" type="checkbox"/> 注射 <input type="checkbox"/> 其它（具体说明）： _____ | | | |
| 防护性措施 | <input type="checkbox"/> 防毒面具 <input type="checkbox"/> 安全眼镜（或密封保护镜） <input checked="" type="checkbox"/> 手套 <input checked="" type="checkbox"/> 防护服 <input type="checkbox"/> 机械通风笼具 <input type="checkbox"/> 通风柜 <input type="checkbox"/> 生物安全柜 <input type="checkbox"/> 其他(特殊的) | | | |

七、实验动物的麻醉

根据实验对动物造成的疼痛、应激或不舒适性进行分类。

如果为 3 类，需要用科学的判断方法来解释为何实验处置中所致的持续性的疼痛与不适不能应用麻醉、止痛或镇静方法来减轻的理由。简要描述可能发生的持续性的疼痛与不适、解决办法或认为没有可行的解决办法。

| | | |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| 1 类 | 仅引起短暂性的疼痛，无需麻醉；或无痛、无应激。 | 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> |
| 2 类 | 可用适当方法减轻疼痛和/或应激。 | 是 <input checked="" type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> |
| 3 类 | 不能使用适当方法以减轻疼痛或持续性不适 | 是 <input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> |
| 说明（麻醉药品及麻醉方式）： 麻醉药品：异氟烷；麻醉方式：吸入麻醉 | | |

八、实验结束后的动物处理方法及其他需说明的问题：

1. 过量麻醉药
2. 二氧化碳吸入
3. 物理方法（颈椎脱臼、断头等）
4. 领养
5. 其它要说明的问题

九、项目负责人的申明：

• 我保证在此提请的陈述是完整的且准确的，本方案中的动物使用没有单纯重复以前的实验。

• 如果方案被批准，我同意以书面形式告知实验动物福利伦理委员会任何的紧急情况，且同意在问题解决之前将不会继续实验。

• 没有提交实验方案的书面修改稿给实验动物福利伦理委员会，且经伦理委员会审查、批准之前，我将不会对涉及动物的程序做出较大的改动。

• 保证每个从事与动物有关的工作人员接受合适的培训是我的职责。

• 在收到实验动物福利伦理委员会的批准通知之前，我不会开始本方案中所描述的实验操作。

• 我将保留一个本实验方案的副本及随后所有的通信资料。

项目负责人（签名）： 

日期： 2018.10.31

武汉大学人民医院
实验动物福利伦理审查结果告知书
Renmin Hospital of Wuhan University

Notification of the Result for Ethical Approval for Research Involving Animals

| | | | |
|---|--|----------------------------|-----------------|
| 项目名称 Program | Dihydrotanshinone I inhibits the development of digestive tract tumors and its potential mechanism | | |
| 编号 IACUC Issue No. | WDRM 动(福)第 20181114 号 | | |
| 项目负责人 Name of Principal Investigator | Dong Weiguo | 项目负责人电话 Contact Tel.No. | +86 13986167388 |
| 项目负责人电子信箱 Contact Email | dongweiguo@whu.edu.cn | | |

实验动物福利伦理审查结果告知书内容
Content of the notification

该项目福利伦理审查结果如下:

The result of the application for ethical approval:

- 通过审查, 有效期:
- Approve, period of validity: 2018/ 12/ 01 TO 2019/ 11/ 30
- 未通过审查, 原因:
- Disapprove, reasons:

实验动物福利伦理审查委员会 (IACUC)
Laboratory Animal Welfare & Ethics Committee

2018 年(Y) 11 月(M) 20 日(D)

备注: 通过审查的项目, 在有效期届满 10 个工作日前, 由科室负责人/项目负责人 (或指定人员) 向 IACUC 提出延期年度审查备案申请。

通过审查的项目, 动物实验项目结束时, 项目负责人应向 IACUC 提出福利伦理监督检查的申请。

未通过审查的项目, 请按 IACUC 的建议修改实验方案或补充新资料, 申请复审。

Remarks: When the program application approved, the applicant should submit a deferred annual approval application to IACUC, 10 days before expiry date.

When animal experiment program completed, the applicant whose program application have been approved should submit an application of welfare & ethics supervision and inspection to IACUC.

When the program application disapproved, the applicant should submit the Application Form again according to the opinion IACUC giving.

主任委员 (或授权的副主任委员) 签字:

Signature of Director:

