

湖南循证生物科技有限公司动物实验伦理委员会
动物伦理审查表

登记编号：XZ015

审查编号：XZ20221021

协议/研究题目	不同减肥手术通过介导PKC β /P66shc通路对食物源性肥胖糖尿病大鼠糖脂代谢肝肾功能的影响		
申请人（申请人必须是具有正高、副高级职称或独立从事研究工作获得中级职称者）	龙泓		
学位/职称	硕士/主治医师	地址： 湖南省衡阳市石鼓区船山路69号	Email： [REDACTED]
工作单位	南华大学附属第一医院		电话：[REDACTED]
合作研究者（学生可作为合作研究者）		Email：	电话：
项目起讫时间	2022年10月-2023年2月		
项目资金来源（请提供资金来源的复印件）		自费	
研究的目的： 肥胖通常会导致糖尿病，严重危害人类健康，2型糖尿病主要与肥胖有关。食源性肥胖糖尿病是由长期饮食和能量过剩引起的。减肥手术可以改善一些肥胖患者的2型糖尿病的症状。但不同的减肥手术可能会有不同的效果。因此，在本研究中，我们调查了不同的减肥手术对糖脂代谢的影响			

动物实验的必要性：

糖尿病（DM）是一种众所周知的慢性代谢性疾病，是一个重大的全球性问题，其特征是常见的高血糖的结果。2型糖尿病（T2DM）占有糖尿病病例的90%以上，被认为是糖尿病并发症的主要原因，包括糖尿病肾病、糖尿病神经病变、心血管疾病和糖尿病视网膜病，迄今为止，人们已经广泛认识到，肥胖，越来越多地受到生活方式因素的影响，是2型糖尿病[2, 3]发展的一个重要风险。肥胖参与了上调的循环游离脂肪酸（FFAs），它在胰腺β细胞的进行性功能障碍中发挥了独特的作用，损害了β细胞补偿当前胰岛素抵抗的能力，从而促进了T2DM的发病机制[4]。2型糖尿病的日益流行导致了各种方法，专注于发现治疗高血糖的新治疗靶点。高血糖是所有原因死亡的绝对危险因素，而减肥手术能够提高肥胖型[5, 6]患者的生存率。减肥手术能够促进持续的减肥效果，并且对于长效控制T2D比传统的医疗策略更有效。减肥手术迅速减少胰岛素抵抗和血糖之前，在任何可测的体重减轻之前降低胰岛素抵抗和血糖。减肥手术可以改善2型糖尿病患者的血糖控制和血糖稳态，但其潜在的机制仍有待研究。PKC是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的家族成员，包含超过12个成员，在细胞内的串扰和信号转导[11]中发挥着关键作用。有报道称，药理阻断或基因缺失或PKCβ可减少梗死面积，保护缺血心肌，促进心室功能恢复[12]。Shc适配器蛋白家族包含P46 shc、P52 shc和P66 shc，但只有P66 shc作为氧化还原酶与线粒体活性氧（ROS）的生成和氧化信号转化为细胞凋亡[13]发挥重要作用。高血糖症和氧化应激可以激活PKCβ 2亚型刺激磷酸化P66中心ser36导致磷酸化(p)p66中心从细胞质线粒体膜，pP66shc可以扩大氧化应激和催化的生成通过细胞色素[14, 15]的氧化。因此，我们推测在糖尿病的发病机制中可能存在一个PKCβ /p66 Shc信号通路。因此，在本研究中，我们研究了包括Roux-en-Y胃旁路手术、袖状胃切除术和胃束带手术对大鼠食物源性肥胖糖尿病的影响，以及PKCβ /p66Shc信号通路的可能机制。

研究过程与方案

动物品质品种	动物规格	动物性别、数量	动物微生物学级别
SD大鼠	220g	雄性，40只	SPF级

实验研究方案（亦可使用示意图）

- 一、给予高脂饮食建立食源性肥胖糖尿病大鼠模型。
- 二、通过葡萄糖，胰岛素耐量试验，血清，生化分析，组织学检查，蛋白印迹，实时荧光定量PCR, 判断建模是否成功。
- 三、食源性肥胖糖尿病大鼠模型成功后，从不同减重手术对大鼠葡萄糖耐受不良和胰岛素不敏感性，生化指标，肝肾组织形态变化，PKCβ / P66 shc通路所产生的影响

动物实验分组处理情况：

1. 胃旁路手术（RYGB）组：大鼠术前12 h常规禁食水。实验大鼠称重后，按3%戊巴比妥腹腔注射5ml，0.15ml/100g的无菌注射器，等待麻醉生效。当老鼠的四肢很柔软时，用动物剃须刀准备手术区域的皮肤，用无菌棉签浸入碘酚，对切口周围的皮肤消毒三次。取大鼠胸骨以下约3 cm处的无菌区域，用无菌手术刀做纵向切口，将其逐层进入腹腔，需要时用电凝器止血。进入腹腔后，确认Treitz的远端韧带的位置。在距离Treitz小肠远端约10-15 cm处，游离一段小肠，避免损伤肠系膜血管和肠浆膜，分离并切断空肠，用棉签擦拭消化液，并对远端和近端肠道进行消毒管碘化物。在空肠远端以下10 cm处行空肠近端处的端对侧全层吻合术，以保持吻合口通畅。用无菌棉签轻轻暴露胃体、食道和贲门，电凝器轻轻释放胃，向下腹部弯曲贲门的一部分。在贲门远端10 cm处切断胃，只有不到20%的胃囊被保留。胃囊近端与空肠远端向外侧吻合。在确认了通畅后 吻合术后，残胃远端缝合闭合。胃空肠吻合术和空肠吻合术均采用6-0可吸收缝合线缝合。关闭腹腔前，用含庆大霉素的生理盐水冲洗腹腔3次。4-0丝丝线间断缝合，腹部闭合。

2. 袖状胃切除术（SG）组：术前治疗方法与RYGB组相同。逐层切开皮肤和皮下组织，暴露食管、胃、十二指肠等器官，使胃脱离腹腔，并根据切除范围结扎大曲率的血管。切断占整个胃体积的75%-80%的胃，包括胃底和大部分的胃体组织。切除后，用棉签清洁残余胃的内容物。缝合并闭合残胃，止血冲洗，继续缝合残胃，用生理盐水冲洗腹腔。浸泡生理后用棉球打生理盐水，用大网膜覆盖残端胃，一层封闭腹腔。

3. 胃束带手术（GB）组：术前治疗方法与RYGB组相同。上腹部中线切口长3厘米，进入腹部。上贲门下部的内径在贲门下方1厘米处用带扣式硅带固定固定在原来位置的1/3处。近端形成一个20%的小胃囊。常规腹部闭合。

4. 假手术（AL）组：术前12 h用水禁食，与RYGB组相同位置切开空肠、胃体，切开断端吻合。胃肠道横切面在RYGB行胃切开术和胃切开术的部位进行，并在原切割部位进行吻合。手术时间应与RYGB相同，并应使用含庆大霉素的生理盐水冲洗腹部。食物通过胃肠道的生理流动保持完整。此外，还可以自由地食用基本的饲料，而不限制饮用水。

详细实验过程：

第一阶段：动物模型制备：SPF级SD大鼠40只，雄性，全部大鼠适应性饲养一周后开始进行模型制备，给予高脂饮食（常规饲料基础上加10%猪油，2%胆固醇），持续饲养4周，其中体质量≥对照大鼠（常规饮食）体质量均值+2倍标准差的大鼠视为食源性肥胖模型制备成功。然后将成功的大鼠继续以高脂饮食饲养4周，之后腹腔注射链脲佐菌素（0.5%链脲佐菌素，30mg / kg，0.1mmol / L柠檬酸缓冲液，pH4.4）。10d后测定大鼠空腹血糖，将空腹血糖>对照大鼠血糖均值+3个标准差，且维持2周以上，则判定为肥胖2型糖尿病大鼠模型制备成功。

第二阶段：实验动物分组干预：1. 胃旁路手术（RYGB）组：大鼠术前12 h常规禁食水。实验大鼠称重后，按3%戊巴比妥腹腔注射5ml，0.15ml/100g的无菌注射器，等待麻醉生效。当老鼠的四肢很柔软时，用动物剃须刀准备手术区域的皮肤，用无菌棉签浸入碘酚，对切口周围的皮肤消毒三次。取大鼠胸骨以下约3 cm处的无菌区域，用无菌手术刀做纵向切口，将其逐层进入腹腔，需要时用电凝器止血。进入腹腔后，确认Treitz的远端韧带的位置。在距离Treitz小肠远端约10-15 cm处，游离一段小肠，避免损伤肠系膜血管和肠浆膜，分离并切断空肠，用棉签擦拭消化液，并对远端和近端肠道进行消毒管碘化物。在空肠远端以下10 cm处行空肠近端处的端对侧全层吻合术，以保持吻合口通畅。用无菌棉签轻轻暴露胃体、食道和贲门，电凝器轻轻释放胃，向下腹部弯曲贲门的一部分。在贲门远端10 cm处切断胃，只有不到20%的胃囊被保留。胃囊近端与空肠远端向外侧吻合。在确认了通畅后 吻合术后，残胃远端缝合闭合。胃空肠吻合术和空肠吻合术均采用6-0可吸收缝合线缝合。关闭腹腔前，用含庆大霉素的生理盐水冲洗腹腔3次。4-0丝丝线间断缝合，腹部闭合。

2. 袖状胃切除术（SG）组：术前治疗方法与RYGB组相同。逐层切开皮肤和皮下组织，暴露食管、胃、十二指肠等器官，使胃脱离腹腔，并根据切除范围结扎大曲率的血管。切断占整个胃体积的75%-80%的胃，包括胃底和大部分的胃体组织。切除后，用棉签清洁残余胃的内容物。缝合并闭合残胃，止血冲洗，继续缝合残胃，用生理盐水冲洗腹腔。浸泡生理后用棉球打生理盐水，用大网膜覆盖残端胃，一层封闭腹腔。

3. 胃束带手术（GB）组：术前治疗方法与RYGB组相同。上腹部中线切口长3厘米，进入腹部。上贲门下部的内径在贲门下方1厘米处用带扣式硅带固定固定在原来位置的1/3处。近端形成一个20%的小胃囊。常规腹部闭合。

4. 假手术（AL）组：术前12 h用水禁食，与RYGB组相同位置切开空肠、胃体，切开断端吻合。胃肠道横切面在RYGB行胃切开术和胃切开术的部位进行，并在原切割部位进行吻合。手术时间应与RYGB相同，并应使用含庆大霉素的生理盐水冲洗腹部。食物通过胃肠道的生理流动保持完整。此外，还可以自由地食用基本的饲料，而不限制饮用水。

第三阶段：观察指标：1. 葡萄糖与胰岛素耐量试验：4周时，采用葡萄糖口服葡萄糖耐量试验（OGTT），在禁食过夜后通过葡萄糖灌胃（5g[16]/kg体重）进行口服葡萄糖耐量试验（OGTT）。用针刺穿大鼠尾部后，滴一滴静脉血测定血糖，采集尾静脉300 μl血，2000 rpm离心15 min，收集血清测定胰岛素。注射葡萄糖0、1和2小时后，使用血糖仪（罗氏诊断，瑞士）测定血糖，并在同一时间点监测胰岛素。胰岛素耐受性试验（ITT）按照如前所述的[17]方法进行。禁食8h后，将大鼠腹腔注射胰岛素（0.5 U/kg）随后还分别计算了OGTT和ITT的AUC。2. 生化参数的分析：在4周，血液样本收集的大鼠腹主动脉麻醉离心15 min 3000 rpm获得血清确定血清浓度的甘油三酯（TG）（TBA），总胆汁酸，丙氨酸转氨酶（ALT）和天冬氨酸氨基转氨酶（AST）。3. 组织学检查：组织学检查进行了如前所述的[17]。肝和肾组织在4%多聚甲醛（PFA）溶液中固定，然后嵌入石蜡块。在用苏木精和伊红（H&E）染色，并在光学显微镜下检查后，用切片机获得切片。4. 蛋白质印迹：免疫印迹检测方法如前所述的一般情况下，蛋白质样品用10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶在90 V下电泳分离近1.5小时，然后在300 mA下在聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上电印迹2小时。然后，用5%牛血清白蛋白（BSA，#9048-46-8）稀释0.1%吐20（TBST；pH 7.4），在一抗兔抗PKC β（1：1000，#ab32026，Abcam），兔抗p66（1：1000，#ab1000，ab33770，Abcam）孵育过夜，然后用TBST洗涤3次。然后，用辣根过氧化物酶（HRP）偶联的山羊抗兔二抗（1：5000，#ab288151，Abcam）在室温（RT）后用TBST洗涤膜3次，每次5 min。接下来，使用增强化学发光（ECL）溶液（Bio-Rad，Haglues，CA，USA）来观察免疫反应信号。最后，利用ImageJ 5.0对条带的强度进行量化。5. 实时荧光定量PCR（qRT-PCR）：qRT-PCR进行了如前所述的[17]。采血后，处死大鼠，快速切下肝、肾组织，在冰床上分离15-20 mg胰尾组织，进行荧光定量PCR检测。加入肝肾组织和TRIZOL，切割组织，冰敷完成组织匀浆，直至完全溶解。离心后，吸收上清液，加入相同体积的异丙醇，倒置混合，离心，弃用上清液。加入1ml75%乙醇，离心，弃上清。RNA在室温下干燥半小时，并在-80℃下保存备用。用紫外分光光度计测量A260和A280的吸光度值，并计算其比值，控制在1.8-2.0。根据OD值260值计算RNA含量。RT反应：将总RNA8加入EP管μl，10 μmol/l Oligo（dT）1 μl。DEPC水3 μl。搅拌均匀，用离心机搅拌，立即溶于水中3 min。向M-MLV加入5*缓冲液4.0 μl，10mmol/l dNTP2.0 μl，RNasin 1 μl，M-MLV 1 μl。混合后，慢跑离心，并在PCR仪器上完成以下操作：42℃60 min，70℃5 min。取出上述反应溶液获得cDNA，并在-20℃处。荧光定量PCR反应：实时荧光法检测基因表达，反应体系如下：2 * Real-time PCR，PCR反应总体积为10 μl。含正向引物（10 μmol/L）0.4 μl。反向引物（10 μmol/L）0.4 μl，50*ROX II 0.4 μl，cDNA2.0 μl。双层蒸馏水，6.8 μl。采用2-ΔΔCt法分析各基因的相对mRNA水平。

实验过程中减轻实验动物痛苦的措施：

动物实验中采用注射麻醉的方法，麻醉药物为戊巴比妥。

动物实验地点：

湖南循证生物科技有限公司动物中心

课题人员遵守实验动物福利伦理原则的声明：

本课题组郑重承诺：本动物实验方法和目的符合人类的道德伦理标准和国际惯例。在动物实验期间遵守有关的法规。实验动物伦理福利原则和实验动物中心的规章制度。

动物实验伦理委员会审查意见

湖南循证生物科技有限公司

动物实验伦理委员会

