

审查编号:	UJS-IACUC-AP-2022081615
审查日期:	2022.08.16

涉及实验动物伦理的审查意见

吴其顺 申请的 2022 年 科研 项目,项目名称:MicroRNA-630 通过靶向 TLR4 抑制糖尿病肾病大鼠肾损伤和炎症反应。项目所涉及的实验动物有关材料,经江苏大学实验动物管理和使用委员会审查,认为该项目符合实验动物伦理要求,同意实施。

主任(签字)

2022 年 08 月 16 日

江苏大学实验动物管理和使用委员会





江苏大学实验动物使用伦理审查表

审查表编号: UJS-IACUC-AP-2022081615

审查日期: 20220816

1. 项目信息

项目负责人		吴其顺	电话	
单位		江苏大学附属医院		
项目名称		MicroRNA-630 通过靶向 TLR4 抑制糖尿病肾病大鼠肾损伤和炎症反应		
项目来源		苏州大学博士课题		
预期起始时间		2022.8.20	预期结束时间	2023.6.30
动物实验的人员信息				
姓名	单位	电话	上岗编号	备注
吴其顺	江苏大学附属医院		X2103624	
动物信息				
品种品系	SD 大鼠 rat	洁净等级	SPF	
规格(年龄/体重/大小)	6w/180-220g	性别/数量	(♀60♂)	
来源(供应商)	江苏大学实验动物中心			
饲养环境 (使用许可证号)	SYXK(苏)2018-0053	操作场所	江苏大学实验动物中心	

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)

2.1实验目的: 1.构建DKD模型。2..动物模型验证miR-630对TLR4的调控作用。 必要性及意义: DKD早期诊断对发现及延缓DKD的发展意义重大。通过动物实验进一步验证miR-630对TLR4的调控作用。
2.2 实验设计: 动物 选取 6 周龄 SPF 级 Wistar 雄性健康大鼠 60 只, 体重 200 g 左右。大鼠随机分为以下 4 组(每组 15 只大鼠): ①db /m 大鼠为 db /m 组; ②没有进行尾静脉注射 db /db 大鼠为 db /db-untreated 组; ③每天尾部注射 10 mg /kg agomir NC 的 db / db 大鼠为 db / db-miR-NC



组;④每天尾部注射 10 mg /kg 尾静脉注射 miR-630 agomir 的 db /db 大鼠为 db /db- miR-630 组。建模 8 周后处死,具体的操作见参考文献。构建 DKD 大鼠模型,大鼠用高脂高糖饲料饲养 1 个月,造模前禁食 12h 后,腹腔注射链脲佐菌素 45mg / kg, 72h 后采集大鼠尾静脉血,血糖值 >16.6mmol / L, 尿蛋白含量 >30mg / 24 h, 则 DKD 大鼠模型构建成功。

大鼠生化指标检测 血液标本通过大鼠尾静脉采血;尿液标本通过小鼠代谢笼收集 24 h 尿液,尿液标本和血液标本送我院检验科检测。末次给药后,留取 2 4 h 尿液,称取其体积后备用;

3% pentobarbital sodium (30mg/kg)麻醉,采集腹主动脉血 10ml,一部分用于测血糖含量,一部分离心后分离血清备用;静脉注射,150mg/kg 戊巴比妥钠处死各组大鼠,取其肾脏组织,剪取约 0.5 g 用于提取组织蛋白,储存在 -80℃ 冰箱中备用,剩余肾脏组织用 4 %多聚甲醛溶液固定,做常规石蜡切片,备用。

组织样本的获取 将大鼠麻醉后处死,快速剥离且纵剖双肾,一部分组织快速冻存于液氮中,用于 RNA 和蛋白质的提取。另一部分组织保存于多聚甲醛,包埋后用于 HE 染色。

RT-qPCR 检测 采用 TRIzol 法提取各组组织的总 RNA。再按照一步法反转录荧光定量试剂盒检测 miR-630 和 TLR4 mRNA 的表达情况,RT-qPCR 反应体系和反应程序参照说明书。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法 [6] 进行相对定量分析,以 U6 和 GAPDH 为内参。

Western blot 检测 各组组织中分别加入 RIPA 裂解液并在冰上放置 20 min, 4℃ 13 000 r / min 离心 20 min,采用 BCA 试剂盒测定上清液中蛋白含量。取 35 μ g 蛋白液进行 SDS-PAGE,转 PVDF 膜,用 2% BSA 封闭液封闭,分别加入一抗 4℃ 过夜,以 GAPDH 抗体为参照,再加入二抗室温孵育 1 h。ECL 曝光成像,采用 Alpha Imager HP 凝胶成像系统分析结果。

大鼠肾脏组织病理检查 各组组织分别用 40 g / L 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,4 μ m 切片,HE 染色后光镜下观察肾组织病理学变化。过碘酸希夫 (Periodic schiff, PAS) 染色和天狼星红 (Sirius Red, SR) 染色,脱水,透明,封片,镜下观察肾脏组织病理形态学变化。SR 染色检测肾间质沉积物平均光密度,可反映肾间质纤维化程度。

各组大鼠血清中炎症因子水平检测 取血清及尿液,用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法分别检测 IL-1 β 、IL-6 表达水平,具体操作步骤参考试剂盒说明书。

各组大鼠肾脏组织 α -SMA、E-cadherin、TGF- β 1、Smad3、Smad4、RUNX3 蛋白表达水平检测 提取肾脏组织蛋白,BCA 法检测蛋白浓度,调整上样蛋白至 50 μ g,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,转膜,加一抗 (α -SMA、E-cadherin、TGF- β 1、Smad3、Smad 4、RUNX3、GAPDH, 1:1000), 4℃ 孵育过夜,次日,加二抗 (1 : 5000) 室温孵育 2h,洗膜,加 ECL 发光液,用 Bio-Rad 成像系统检测蛋白灰度信号,以 GAPDH 为内参照,Image J 软件定量分析蛋白表达情况。

3. 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)		√	
生物制品(病毒、血清、细胞,等)		√	
其他			

4. 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。

江苏大学实验动物中心，超净工作台，无菌操作。

动物协议旨在将动物的疼痛或不适降至最低。在实验前，使大鼠适应实验室条件(23℃, 12小时/12小时光/暗, 50%湿度, 随意获得食物和水)一周。对有意识的动物进行胃内管饲给药，使用适合动物大小的直管饲针(15-17 g 体重:22号, 1英寸长, 1.25 mm 球直径)。

期间麻醉: 3% pentobarbital sodium (30mg/kg)麻醉。

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)

通过过量的戊巴比妥钠 (静脉注射,150mg/kg)对大鼠实施安乐死,用于组织收集。

安乐死/其它处置

√	过量麻醉法 A		CO ₂ 窒息		其他 B
---	----------------	--	--------------------	--	-------------

A 说明麻醉药物使用的试剂、剂量、使用频率和给药途径。

戊巴比妥钠 (静脉注射,150mg/kg)

B 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



江苏大学实验动物中心

Laboratory Animal Research Center

√	是 4℃ A		是 -20℃ B		否 C
---	---------------	--	-----------------	--	------------

A指试验期间，动物非工作时间死亡，暂存于 4℃ 以待解剖。

B指解剖结束后，动物尸体暂存于 -20℃，委托实验动物中心集中处置。

C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

7.1 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。

7.2 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。

7.3 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。

7.4 我保证若要对研究计划进行重大的改动，将会事先申请获得江苏大学实验动物管理委员会和伦理委员会审查批准。

7.5 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。

7.6 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: 2022-8-10