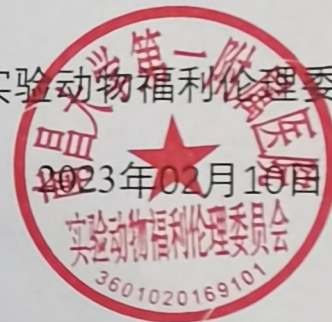


南昌大学第一附属医院实验动物福利伦理审批

经南昌大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审定，我院眼科周琼“抗氧化药迷迭香酸靶向调控RACK1/PKC/STAT3信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作用及其机制研究”（批准文号：CDYFY-IACUC-202302QR049），不违背实验动物福利伦理原则，同意其在已审批的方案下实施该项研究。

南昌大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会



南昌大学第一附属医院实验动物福利伦理审查表

Application for Ethical Approval for Research Involving Animals of The First Affiliated Hospital of Nanchang University

申请日期： 2022 年 11 月 14 日 批准文号(IACUC Issue No): CDYFY-IACUC-202302QR049

实验项目名称: Name of Research Project:		抗氧化药迷迭香酸靶向调控 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对早期糖尿病视网膜病变进展的干预作用及其机制研究			
项目来源: Name of Principal Investigator		国家自然科学基金		项目编号: Code	82260211
项目负责人: Sponsor		周琼		电话或邮箱: Tel. No. or Email	13870063999
单位及科室: Name of organization		南昌大学第一附属医院 眼科			
动物实验设施名称: Name of Animal facility		南昌大学第一附属医院 动物实验室		动物实验设施许可证编号: Name and certificate number or the facility	SYXK(赣)2021-0003
饲养环境: Feeding environment		普通环境 ☐ 屏障环境 ☒			
预计开始时间: Estimated Start Date		2023 年 01 月 01 日		预计结束时间: Estimated Completion Date	2026 年 12 月 31 日
参与动物实验操作人员姓名、相关专业证书编号, 经验、培训、资质和能力的描述 Name and certificate number, Description experience/training/competency of the individuals carrying out the research					
姓名 Name	分工 Division	科室 Department	联系方式 Contact details	培训及能力描述 Description experience/training of the individuals	
谭建	动物饲养、造模、取材处死等	眼科	18720997601	本院动物实验室培训合格证, 培训编号: N2210002	
林叶婷	动物饲养、造模、取材处死等	眼科	15179188504	本院动物实验室培训合格证, 培训编号: N2210003	
现有动物实验设施条件是否与拟开展动物实验的规范性要求相匹配的描述。 (Conformity of facility condition and proposed to carry out experiment requirement) (1)、南昌大学第一附属医院动物实验室于 2021 年取得《实验动物使用许可证》, 许可证号为 SYXK(赣)2021-0003, 其环境为屏障环境, 并且配有实验大小鼠的 IVC 饲养系统, 生物安全柜等操作系统, 能够进行实验大小鼠的相关实验 (2)、动物实验室通过屏蔽装置或专门的通道, 严格控制空气、物品、动物及人员的进出, 确保室内环境及实验人员的安全。 (3)、动物实验室不同的实验动物品种做到分区域饲养, 相互之间不会造成干扰; 所有鼠笼、环境都遵循严格消毒, 避免交叉污染。					
动物实验项目的目的、必要性、意义和如何设计以达成研究目标的? (Experimental objective, necessity and significance and how the program has been designed to achieve the objectives of the research) 糖尿病视网膜病变 (DR) 是一高发病率致盲性眼病。DR 出现典型表现时已发生不可逆转的视网膜病理改变, 因此寻找 DR 早期防治的关键靶点和方法尤为重要。本项目组前期研究表明, 在 DR 早期病变过程中存在 PKC/STAT3 信号通路的激活, RACK1 作为 PKC 的锚定蛋白可介导调控 PKC/STAT3 通路, 提示 RACK1 是参与 DR 发生发展的重要分子, 并可能是干预 DR 进展的潜在治疗靶点。 本申请项目拟通过构建 DR 小鼠模型, 检测 RACK1、PKC 和 STAT3 在 DR 小鼠模型中的表达, 观察 RACK1 调控 PKC/STAT3 信号通路对 DR 早期病变进展的影响, 探明抗氧化药物迷迭香酸靶向抑制 RACK1/PKC/STAT3 信号通路对 DR 发生发展的调控作用及机制, 有望为 DR 早期防治提供新靶点、新思路和新理论。					

Animal to be used

拟使用动物信息

动物品种 Animal Species	动物品系 Animal Species	级别 Grade	年龄/体重 Age/Weight	数量（只） (Quantity)		供应单位及生产许可证编号 Supplier
				雌 ♀	雄 ♂	
小鼠	C57BL/6	SPF 级	6-8 周龄 /9-13g	50	50	湖南斯莱克景达实验动物有限公司 SCXK（湘）2021-0002
大鼠	SD	SPF级	8周龄/400g	12	12	斯莱克SCXK（湘）2021-0002

说明选择实验动物种类和数量的原因；描述针对 3R 原则中动物替代和减少动物用量所采用的主要措施。
(Reasons for the choice of animal, and for species and numbers of animals to be used. And Major measure for (Replacement and Reduction)).

选择 C57BL/6 小鼠做为本研究的实验动物品种，主要有以下几个方面的考虑：

(1)

本研究旨在探究抗氧化药物迷迭香酸在 DR 早期中的影响或作用机制，需要通过实验动物来构建一个与 DR 疾病相似的动物疾病模型；

(2)

C57BL/6 小鼠在遗传背景/生理特点/解剖学结构/代谢方式/免疫系统/疾病发病特征等方面与人相似，能够有效地模拟人发病情况；

(3)

C57BL/6 小鼠对本研究中所要探究的抗氧化药物迷迭香酸敏感，能够更好地反应出抗氧化药物迷迭香酸在 DR 中的影响或作用机制。

本次研究使用 100 只数量实验动物来开展实验的原因及优化措施：

(1)

实验一、空白对照组 10 只；正常造模组 10 只。
实验二、正常造模组 10 只（模型对照组）； 基因敲除组 10 只（模型实验组）。
实验三、生理盐水组 10 只（模型对照组）；低剂量治疗组 10 只（模型实验组）；中剂量治疗组 10 只（模型实验组）、高剂量治疗组 10 只（模型实验组）。
预计造模的死亡率为 20%，因此将每个研究组设定为 12 只动物，自然对照组 4 只，总共使用 100 只动物。

(2)

在实验过程中，通过优化实验操作技术/丰富实验动物福利/增加对实验动物的健康检测等措施，尽量减少动物造模的死亡率，尽可能在实验过程中减少实验动物用量。

Detailed information of the experiments on animals 拟开展动物实验的详细信息	实验方案：应包括动物分组及数量,实验操作(如保定、注射、灌胃、采血和非存活手术或存活手术等)。 Experimental Procedures 一、检测 RACK1 在正常小鼠和 DR 早期小鼠模型视网膜组织中的表达差异并观察分析其对 DR 早期进展的影响。 (1) 按实验设计将 24 只实验动物分为 A 组、B 组 (2) A 组不做处理,在第 4 周的时候麻醉下取摘取眼球后处死。 (3) B 组 DR 造模(腹腔注射链脲佐菌素破坏胰岛 B 细胞造成小鼠患 I 型糖尿病),在第 4 周的时候麻醉下取摘取眼球后处死。 二、观察和分析:在敲除 RACK1 和未敲除 RACK1 的两组 DR 早期模型小鼠中,视网膜神经血管单元的不同病理表现。 (1) 按实验设计将 24 只实验动物分为 A 组(敲除 RACK1)、B 组(未敲除 RACK1) (2) 将 A、B 两组小鼠 DR 造模处理,通过视网膜荧光血管造影观察基因敲除 DR 小鼠与普通 DR 小鼠在第 6、8、10 周的血管渗漏情况。 (3) 通过视觉敏锐度测试基因敲除 DR 小鼠与普通 DR 小鼠在第 6、8、10 周的视觉改变情况。 (4) 用 qRT-PCR 和 WB 检测基因敲除 DR 小鼠与普通 DR 小鼠在 6、8、10 周的视网膜组织内 PKC、STAT3、VEGF、IL-6、ICAM、GFAP、TNF-α 和 RACK1 mRNA 水平及蛋白水平的表达情况; 三、观察和验证:迷迭香酸(RA)通过靶向抑制 RACK1 调控 PKC/STAT3 信号通路活性,RA 的不同给药剂量对 DR 小鼠模型中 DR 早期病变特征的影响。 (1) 将 STZ 诱导糖尿病 C57BL/6 小鼠 48 只随机分成对照组、低剂量 RA 组、中剂量 RA 组、高剂量 RA 组,分别用生理盐水、低剂量 RA (10 mg/kg/day)、中剂量 RA (20 mg/kg/day)和高剂量 RA (40 mg/kg/day)连续腹腔注射两周。 (2) 分别应用 qRT-PCR、Western blot 实验测定在各组小鼠在第 6、8、10 周的视网膜组织中 RACK1、PKC 和 STAT3 在 mRNA、蛋白水平的表达情况。 (3) 应用 HE 染色切片、TUNEL 染色切片、PAS 染色技术、免疫荧光共聚焦技术和扫描电子显微镜等实验技术;计数各组小鼠在第 6、8、10 周的视网膜神经节细胞数量、内皮细胞数/周细胞数比值、IV+型胶原丝条数等;观察对照组和实验组小鼠在 6、8、10 周的视网膜组织有无微血管组织结构或形态的改变。 详细列出对动物可能造成的所有可预期的伤害,包括动物运输,动物饲养方式(如单笼饲养)、实验操作步骤中等可能产生伤害或不适的细节以及拟采取的防控优化措施(包括麻醉、止痛和镇静,保温,环境丰容等)。涉及给药,应列出药物名称、剂量、给药途径及时间。 (Description of the overall harms expected to be experienced by the animals, including details of the likely adverse effects of each protocol, cage breeding and the steps which will be taken to control these adverse effects) 实验动物运输过程中造成的不适及拟采取的防控优化措施: a) 本实验所有实验动物的运输、转移均按照动物实验室要求严格执行,并根据气候环境适时给与保暖或降温措施。 实验动物饲养过程中造成的不适及拟采取的防控优化措施: a) 本实验因造模的特殊要求,需要在造模前 12 小时禁食保证空腹,对此我们在实验结束后及时给与食物。 实验动物操作过程中造成的不适及拟采取的防控优化措施: a) 抓取和固定的方法:在抓取固定时,我们采取标准的抓取方法,并辅以固定工具进行固定 b) 编号的方法:我们通过打耳钉的方法给老鼠标记,我们会尽量选用最小规格的耳钉标
---	---

	记。并且该过程会在动物麻醉状态进行 c) 给药的方法：本实验通过腹腔注射的方法给药，熟练掌握腹腔注射操作技能和实验动物保定方法，动作轻柔，以减轻实验动物不适及疼痛 d) 取眼球标本后处死方法：在动物麻醉的状态下快速从眼球根部摘取眼球，再使其大量失血致死，将取标本和处死合并成一个操作，减少小鼠的痛苦 e) 麻醉的方法：进行腹腔注射麻醉(采用 2%的戊巴比妥钠，剂量 45mg/kg 体重),抓住小鼠颈后皮肤皱褶，控制头部移动防止咬伤，迅速将注射针头刺入腹腔，注射完毕立即退出针头。										
Detailed information of the experiments on animals 拟开展动物实验的详细信息	仁慈终点或实验终结的指标(即终止实验的时机，请在下表中勾选，若有其他也可自行填写) (Humane endpoint or experimental terminative indicator) ☒ 体重下降：快速失去原体重的 15-20%、或成长期动物持续无增重、未监测体重但动物呈现恶病质及持续性肌肉消耗时。 ☒ 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。 ☒ 虚弱：无法自行摄食及饮水，长达 24 小时无法站立或极度勉强才可站立。需先排除是否为麻醉后动物苏醒期，再评估是否因疾病或实验等因素导致动物虚弱。 ☒ 身体器官的感染：呈现物理性指标及异常的血检值，对药物治疗无良好反应且持续演变为全身性疾病时。 ☐ 肿瘤：生长超过动物原体重的 10%，平均肿瘤直径在小鼠超过 15mm、在大鼠超过 40mm，或者肿瘤转移或快速增长至溃烂，造成感染或坏死时。 ☐ 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。 ☐ 器官系统衰竭：出现严重的器官系统功能障碍的临床症状且治疗无效，或经动物中心兽医判断预后不佳时。 ☐ 呼吸道系统：严重呼吸道感染、呼吸困难、发绀 ☐ 循环系统：严重贫血、无法控制的出血现象（PVC 低于 15%）、黄疸 ☐ 消化道系统：疾病或实验造成严重持续性呕吐或下痢、阻塞、肠套迭、腹膜炎、腹围扩大 ☐ 泌尿生殖系统：肾衰竭、腹腔积水 ☐ 肌肉骨骼系统：肌肉损伤、骨骼受损、四肢无法行走 ☐ 神经系统：异常的中枢神经反应(抽搐、颤抖、瘫痪、歪头等)、无法有效控制疼痛。 ☐ 其他症状：持续性的自残行为、不愈合的伤口、严重影响动物进食饮水的病症、传染性疾病末期、持续性低温、明显的器官及五官功能损伤、动物遭受窘迫及疼痛时的行为及生理现象 ☐ _____										
	动物处死方法 Death conduct <table><tr><td>☐ CO₂</td><td>☐ 过量麻醉致死</td></tr><tr><td>☐ 颈椎脱臼</td><td>☐ Anesthetic Overdose</td></tr><tr><td>☐ Cervical Vertebra Dislocating</td><td></td></tr><tr><td>☒ 麻醉后放血致死</td><td>☐ 其他</td></tr><tr><td>☐ Exsanguinating After Anesthesia</td><td>☐ Others</td></tr></table> 详细说明所需设备或药品，给药药物浓度及给药方式、剂量等。 Please list name, dose and rout of anesthetic agent, or the facility. 采用 2%的戊巴比妥钠，剂量 45mg/kg 体重进行腹腔注射麻醉。	☐ CO ₂	☐ 过量麻醉致死	☐ 颈椎脱臼	☐ Anesthetic Overdose	☐ Cervical Vertebra Dislocating		☒ 麻醉后放血致死	☐ 其他	☐ Exsanguinating After Anesthesia	☐ Others
	☐ CO ₂	☐ 过量麻醉致死									
☐ 颈椎脱臼	☐ Anesthetic Overdose										
☐ Cervical Vertebra Dislocating											
☒ 麻醉后放血致死	☐ 其他										
☐ Exsanguinating After Anesthesia	☐ Others										

	动物尸体的无害化处理 Harmless treatment of animal carcasses 本研究中所有产生的动物尸体废弃物包括动物尸体、残肢、固定的组织等都按照《南昌大学第一附属医疗废弃物处置管理办法》以病理性废弃物储藏与-30℃冰箱中，由医院集中统一处理。
	是否使用有毒（害）物质（感染、放射、化学毒、其他）？ Poisonous (harmful) material (infection, radiate, chemical poison and other) being uesd ☒否No ☐是 Yes 详细说明：Declare

相关的补充说明或辅助证明文件。(Supplementary instruction or any auxiliary documents for investigate.)
无。

信息公开和保密要求：说明哪些信息需要保密，哪些信息可以公开？

(Declaration for the information disclosure and confidentiality requirements, declaring the information need to be kept secret, the information can be disclosed.)

实验方案及数据请保密，其余信息无保密要求。

对伦理委员有无回避要求？(Claiming jurors for being debarb)

无。

声明：

- 1、我将自觉遵守实验动物福利伦理相关法规和各项规定，同意接受伦理委员会和实验动物室管理者的监督与检查。
- 2、本人保证本申请表中所填内容真实、详尽和易懂。

Declaration:

1. I will abide by the law and regulation stipulation, and accept the supervision and inspection by the committee and laboratory animal department.
2. The information I have given is accurate, detailed and comprehensive.

声明人：项目负责人签（章）



Declarant: Signature (stamp) of PI

2022 年 (Year) 11 月 (Month) 14 日 (Day)

(Inspection contents) 审查依据	1. 该项目是否必须用实验动物进行实验，即能否用计算机模拟、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进行实验？ (Does laboratory animal must be used in the project? Could other methods such as computer simulation, cell cultivation or using the low-grade animal instead of the high-grade animal?) 2. 表中所填申请人资格和所用动物的品种品系、质量等级、规格是否合适，能否通过改良设计方案或用高质量的动物来减少所用动物的数量？ (Are the qualification of applicant, species or strain, grade and specifications of animals suitable? Could the quantity of animals be reduced by improving the study design or using high quality animals?) 3. 能否通过改进实验方法、调整实验观测指标、改良处死动物的方法，来优化实验方案、善待动物？ (Could the study design and animal treatment be refined by ameliorating experimental method, adjusting observational index, executing animal method?)
(Results of) 审查结果	实验动物福利伦理委员会意见(Attitude of the Institutional Animal Care and Use Committee): ☒同意(Agree) ☐不同意(Disagree) ☐修改后同意 (Agree after revised)
南昌大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会（签章） (The Institutional Animal Care and Use Committee of The First Affiliated Hospital of Nanchang University) 年 月 日	

填表说明：

- 1.申请人需在动物实验开始前提交本表。
- 2.申请人需仔细、认真、完整填写上述内容。
- 3.本审查表一式二份及电子版，审批完成后，实验动物伦理委员会以及动物实验伦理申请人各留一份