

受理编号：动物伦审（202009813）

中南大学湘雅医院实验动物伦理委员会伦理初始审查申请表

申请日期：2020年12月20日

一、申请者基本情况			
课题名称	ALKBH5 通过调节 ZKSCAN3 的 m6A 去甲基化介导自噬流受阻加重胰腺炎		
项目来源	湖南省自然科学基金	资助类别	<input checked="" type="checkbox"/> 1.纵向 <input type="checkbox"/> 2.横向
资助等级	<input type="checkbox"/> 1.国家级 <input checked="" type="checkbox"/> 2.省部级 <input type="checkbox"/> 3.厅局级 <input type="checkbox"/> 4.其他		
实验种类	<input checked="" type="checkbox"/> 1.医学研究 <input type="checkbox"/> 2.药物疫苗类 <input type="checkbox"/> 3.生物类 <input type="checkbox"/> 4.农业研究 <input type="checkbox"/> 5.健康食品 <input type="checkbox"/> 6.其他		
申请单位	中南大学湘雅医院 普通外科		
项目负责人	朱帅	电话: 15802674027	邮箱: 758698101@qq.com
课题执行人	朱帅	电话: 15802674027	邮箱: 758698101@qq.com
合作单位	无		
合作者	无		
拟实验时间	2021年01月01日 至 2022年12月31日		
二、拟使用动物信息			
品种/品系:	<input type="checkbox"/> 大鼠 <input checked="" type="checkbox"/> 小鼠 <input type="checkbox"/> 裸鼠 <input type="checkbox"/> 兔 <input type="checkbox"/> 犬 <input type="checkbox"/> 灵长类 <input type="checkbox"/> 转基因动物 <input type="checkbox"/> 其他（具体说明）		等级: <input type="checkbox"/> 普通 <input type="checkbox"/> CV <input type="checkbox"/> 清洁 <input type="checkbox"/> CL <input checked="" type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> GF <input type="checkbox"/> 其他
动物来源	<input checked="" type="checkbox"/> 1.实验动物学部统一采购: <input type="checkbox"/> 2.国内其他正规饲养繁殖单位:		

受理编号：动物伦审（202009813）

	<input type="checkbox"/> 3.国外引进:		<input type="checkbox"/> 4.其他 (请说明):	
	质量合格证: <input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无			
	体重: 15 克	月龄: 1 个月	雌 (只): 50	雄 (只): 50
饲养场地	<input checked="" type="checkbox"/> 实验动物学部 <input type="checkbox"/> 自己实验室 <input type="checkbox"/> 其他			
	设施类别: <input type="checkbox"/> 屏障环境		<input checked="" type="checkbox"/> 普通环境	

三、以非专业语言简述本实验的目的、意义、必要性及对人类、动物或科学的贡献

急性胰腺炎的发病率逐年升高,但对该病的发病机制和发展规律尚未完全了解。自噬流受阻是诱导胰腺炎发生的关键发病机制,是促进胰腺炎发展的重要病理过程,然而,关于胰腺炎中自噬流受阻的确切调控机制鲜有研究。ALKBH5 和 ZKSCAN3 是自噬控制网络中关键调节因子,可抑制自噬的多个环节。但是,急性胰腺炎中它们的表达和功能还没有相关研究。本申请项目通过细胞实验、动物实验和临床数据多角度多层次研究 m6A 去甲基化在胰腺炎中的作用和机制,探讨 ALKBH5 介导自噬流受阻的具体调控通路。该项研究可使研究者更深入的探索胰腺炎中自噬流受阻的机制和 m6A 修饰的调控作用,为胰腺炎诊断、治疗和机制研究开辟一系列新的思路。

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. 请说明拟用实验动物数量的原因：

建模需要一定数量小鼠方能获得可信结果。

D. 动物替代、降低对动物可能造成的所有可预期的痛苦、伤害，麻醉、保定、动物运输、实验操作步骤中等可能产生伤害和不适的细节，拟采取的防控措施。

五 动 物 实 验 设 计	<p>实验方案及主要实验操作：</p> <ol style="list-style-type: none">1. 构建小鼠胰腺炎模型：cerulein 腹腔内注射入小鼠，每小时 1 次，连续注射 8 次，注射剂量为 50 mg/kg。注射磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline, PBS）为对照组。2. 检测胰腺炎相关指标：尾静脉抽血测定血清淀粉酶和脂肪酶，解剖小鼠胰腺，测定干重和湿重比值，制作胰腺组织切片，观察胰腺坏死比例和炎性细胞浸润程度。3. 监测自噬流：免疫荧光检测 LC3（代表自噬体）和 LAMP1（代表溶酶体）4. 的表达和定位；提取胰腺组织蛋白，western blot 检测 LC3-II/LC3-I、自噬底物 SQSTM1 的表达。免疫荧光检测胰腺组织中 ALKBH5 和 ZKSCAN3 表达及细胞核/细胞质定位。5. 提取胰腺组织蛋白和 RNA，western blot 和 qPCR 检测 ALKBH5、ZKSCAN36. 和 ZKSCAN3 下游自噬相关蛋白的表达。7. 将 ZKSCAN3 和 ALKBH5 干扰序列构建入腺病毒载体（AAV-siZKSCAN3），经尾静脉注射入小鼠，以体内抑制其表达。使用 cerulein 构建胰腺炎小鼠模型。提取胰腺组织蛋白和 RNA，制作组织切片，检测 ZKSCAN3、胰腺炎相关指标和自噬流。提取胰腺组织蛋白和 RNA，制作组织切片，检测 ALKBH5 和 ZKSCAN3 的定位及表达，MeRIP-qPCR 检测 ZKSCAN3 mRNA 的 m6A 去甲基化程度，检测胰腺炎相关指标及自噬流。
	<p>给药方式：灌胃（<input type="checkbox"/>）皮下（<input type="checkbox"/>）腹腔（<input checked="" type="checkbox"/>）静脉（<input checked="" type="checkbox"/>）其他（<input type="checkbox"/>）</p> <p>如其他，请注明：</p>

	<p>标本采集方案：</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">采集的组织或液体</th> <th style="width: 20%;">采集方法</th> <th style="width: 10%;">数量或体积</th> <th style="width: 15%;">采集频率</th> <th style="width: 35%;">持续时间或最大采集数量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>血液</td> <td>建模后 24 小时</td> <td>1ml</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>胰腺</td> <td>处死后分离取出</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>				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	血液	建模后 24 小时	1ml	1	1	胰腺	处死后分离取出	1	1	1
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															
血液	建模后 24 小时	1ml	1	1															
胰腺	处死后分离取出	1	1	1															
	<p>实验执行地点：中南大学实验动物学部</p>																		
	<p>是否在同一动物上进行多个操作</p> <p><input checked="" type="checkbox"/>否 <input type="checkbox"/>是，具体说明：</p>																		

六. 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，或经动物中心兽医师判断预后不佳。

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：

受理编号：动物伦审 (202009813)

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，由学校实验动物学部作无公害化处理

3、其它，具体说明

七、是否使用有毒（害）物质（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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	_____
2 生物物品	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	_____
3 有毒化学品、药品	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	_____
4 重组 DNA	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	_____
5 其它	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	_____

八、相关的补充说明或辅助证明文件

无

九、对伦理委员会有无回避要求 有 无

十、承诺

承诺书

我承诺本申请表中所填内容真实、详尽、准确无误。

我承诺自觉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》以及实验动物福利伦理相关法规和各项规定，同意接受中南大学湘雅医院实验动物伦理委员会和实验动物管理者的监督和检查。

我承诺包括我本人在内与本申请表中参与动物实验的人员，已经参加了中南大学湘雅医院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，具备完成动物实验的能力，并且深知使用这些活体动物及动物组织所存在的风险。

我清楚作为本课题的负责人，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湘雅医院实验动物学部的相关规章制度。若该项目获得正式立项，将按照国家和医院科研管理规范要求实施，并在取得实验动物伦理委员会的正式批准后方启动项目研究。如违反规定，自愿接受处罚。

项目负责人签名：朱帅

课题执行人签名：朱帅

日期：2020年12月20日

实验动物伦理委员会接收人签名：朱礼君 日期：2020年12月25日

实验动物伦理委员会审核意见

通过 (✓)； 不通过 ()

中南大学湘雅医院实验动物伦理委员会

日期： 年 月 日

