

# 华东师范大学动物实验伦理委员会

## 动物实验伦理审查表

登记编号:

审查编号: m20160806

该表必须打印, 并须送至伦理委员会。如在填写过程中有任何疑问, 请致电 62232092 或 54345245。

协议/研究题目 SD 大鼠肝纤维化模型构建及评价实验

申请人 (申请人必须是具有正高、副高职称或独立从事研究工作并获得中级职称者)

李陈婕

学位/职称

硕士/主治医师

地址: 湖南省长沙市人民中路 139 号

Email: chenjielimao@126.com

工作单位

中南大学湘雅二医院

电话 #: 18900725369

合作研究者 (学生可作为合作研究者)

无

Email:

电话

项目起讫时间 2016 年 1 月-----2016 年 10 月

项目资金来源 (请提供资金来源的影印件)

自费

研究目的 (阐明动物实验的科学性、前瞻性)

检测肝纤维化 (或肝纤维化) 大鼠模型的生化、凝血、纤维化指标及病理组织学改变, 评价抗凝药物阿司匹林和依诺肝素对肝纤维化 (或肝纤维化) 大鼠模型的纤维化进展的影响, 以确定这两种药物是否有抗纤维化作用。

动物实验的必要性

肝硬化是一种具有高发病率和死亡率的世界范围的公共健康问题。肝硬化的发病机制中, 病毒性肝炎、慢性酒精中毒等各种病因均可引起肝脏的持续损伤。尽管使用抗肝炎病毒药物、停止酒精摄入等病因学治疗起到了一定成果, 但不能完全终止肝硬化的进展。研究认为, 肝硬化的进展是一种复杂的疾病过程, 可以由遗传因素与环境之间相互作用而影响。有证据表明, 其中的一个重要因素就是凝血状态紊乱。因此, 探讨肝硬化的凝血状态、抗凝血治疗与肝纤维化、肝硬化的关系, 对避免肝硬化代偿向失代偿转化或逆转失代偿、减轻肝纤维化可能有一定的临床意义。而肝脏穿刺病理学检查风险高, 大多数患者不易接受, 且抗凝治疗易导致出血并发症, 因此选择了动物实验。大鼠的肝硬化模型具有人类肝硬化的基本形态特征, 其病理改变呈阶段性进展, 且造模方法简单, 模型形成率高, 重现性好、死亡率低等特点, 因此本研究选用大鼠作为实验动物。鉴于肝硬化患者中, 男性比例高于女性患者。文献报道, 因免疫等因素乙肝男性病发率高于女性, 且男性乙肝患者较女性向肝硬化的进展更快。国内外相关肝硬化研究

多采用雄鼠。

#### 研究过程与方案

动物品种品系  
封闭群 SD 大鼠

动物规格 (周龄/体重)  
250g

动物性别、数量  
雄性, 45 只

动物微生物学级别  
SPF 级

实验研究方案 (亦可使用示意图)

- 一、应用硫代乙酰胆碱 (TAA) 建立肝纤维化大鼠模型;
- 二、通过抽血及病理检查判断建模是否成功;
- 三、肝纤维化大鼠模型建模成功后, 接受阿司匹林及伊诺肝素治疗, 评价药物疗效。

实验动物分组处理情况

- A 组: (空白对照组) 腹腔注射同剂量的无菌蒸馏水, 每周两次, 8-10 周。再蒸馏水 2ml 灌胃, 4-5 周。
- B 组: (TAA 组) 硫代乙酰胆碱 (TAA) 以 0.03% 200mg/kg, 每周两次, 8-10 周, 腹腔注射给药以诱导肝纤维化 (准备期)。再蒸馏水 2ml 灌胃, 4-5 周。
- C 组: (TAA+阿司匹林组) 硫代乙酰胆碱 (TAA) 以 0.03% 200mg/kg, 每周两次, 8-10 周, 腹腔注射给药以诱导肝纤维化 (准备期)。再阿司匹林灌胃, 1ml/200g 体重或【300 毫克/千克】, 4-5 周。
- D 组: (TAA+伊诺肝素组) 硫代乙酰胆碱 (TAA) 以 0.03% 200mg/kg, 每周两次, 8-10 周, 腹腔注射给药以诱导肝纤维化 (准备期)。再伊诺肝素皮下注射, 2mg/kg/天, 4-5 周。
- 为防止肝纤维化自发性退化, TAA 在研究的治疗阶段继续进行每周一次的注射。

详细实验过程 (同时指出实验过程中减轻动物痛苦的措施)

第一阶段: 建模

1. SPF 级 SD 大鼠 45 只, 雄性, 在标准条件下饲养 (普通饲料、自由饮水), 包括每日 12 小时黑暗与 12 小时光线的交替循环。动物每周称重以调整硫代乙酰胆碱及药物的剂量。 (若从其他地方购买, 需适应性喂养 3-7 天后开始实验)

空白对照 (5 只; A 组); 模型对照 (40 只; B 组、C 组、D 组)

2. 建模前抽血: 随机检测 10 只大鼠的肝功能 (ALT、TBIL、ALB)、凝血指标 (PT、INR、D-二聚体)、肝纤维化指标 (HA、IV-coll)。采血方法为眼缘静脉丛采血, 每次采血量约为 2ml, 用于指标检测。

3. 40 只 SD 大鼠硫代乙酰胆碱 (TAA) 以 0.03% 200mg/kg (生理盐水配置: 相当于 50mg/mL 的 TAA 生理盐水溶液, 4mL/kg) 体重的剂量, 每周两次, 8-10 周, 腹腔注射给药以诱导肝纤维化 (准备期)。

5 只健康空白对照大鼠 (A 组) 在整个研究期间未接受特殊药物治疗, 但同期腹腔注射同剂量的无菌蒸馏水。

第二阶段: 建模: 判断建模是否成功。

TAA (8-10) 周后, 随机处死模型对照组 4 只, 取出肝脏组织。

先肉眼观察, 照相; 再 (取肝右叶组织或全肝) 用 10% 的福尔马林甲醛溶液进行固定, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 4-6  $\mu\text{m}$  厚度连续切片后进行常规 H E 染色和纤维特染 Masson 染色, 行病理组织学检查。显微镜下观察肝脏组织形态的变化, 模型建立成功标准是肝组织纤维增粗紊乱, 部分肝细胞和肝小叶被较粗的纤维分割包绕, 并可见完整的假小叶。【采用 Image pro plus 6.0 软件进行 Masson 染色结果的分析。Masson 染色每张切片选取 5 个视野 ( $\times 100$ ), 每个视野  $1447680\mu\text{m}^2$  视场面积, 结果表示为: 胶原纤维面积百分比 = 胶原纤维着色面积 / 视场面积  $\times 100\%$ , 取平均值。】 (病理: 光镜及电镜下观察肝细胞坏死情况, 纤维化程度, 有无再生结节或假小叶; 尤其是肝窦、肝内动静脉内有无血栓, 有无管腔狭窄等)

第三阶段: 用药后观察

1. 若判断建模成功 (8-10 周) 后所有剩下大鼠接受每天一种处理【共 4-5 周】

- a. 正常对照组 (A 组; 5 只): 生理盐水灌胃; 1ml/200g 体重; 或蒸馏水 2ml
- b. 模型组 (B 组; 12 只): 生理盐水灌胃; 1ml/200g 体重; 或蒸馏水 2ml

- c. 阿司匹林组 (C组; 12只): 阿司匹林灌胃, 1ml/200g 体重) 【300 毫克/千克】;  
d. 伊诺肝素组 (D组; 12只): 伊诺肝素皮下注射) 【2mg/kg/天】  
为防止肝硬化自发性退化, TAA 在研究的治疗阶段继续进行了每周一次的注射。  
2. 用药前及治疗后每周抽血检测肝功能、凝血指标、肝纤维化指标。  
3. 处死所有大鼠 (病理: 光镜及电镜下观察 METAVIR 评分纤维化程度, 有无再生结节; 尤其是肝窦、动静脉内有无血栓, 有无管腔狭窄等)

实验过程中减轻动物痛苦的措施

试验中需麻醉时采用气体麻醉的方法, 麻醉剂为乙醚。

实验结束后对动物的处理

实验结束后, 大鼠采用 CO<sub>2</sub> 窒息法处死, 解剖尸体, 取得样本后, 尸体-20℃冰箱冻存, 集中处理。

动物实验地点:

华东师范大学动物中心

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。

签名栏 (课题组全体成员签名)

李陈健

动物实验伦理委员会审查意见

审查通过

