

## IACUC 实验动物使用申请表

批准号: YZW19007  
 实验编号:         
 批准日期: 2019-12-13  
 有效日期: 2022-12-12

一、申请者基本情况			
申请人	刘星	部门	心血管疾病课题组
电话	67776809	E-mail	zhw_yang@hotmail.com
课题名称	PSGL-1 通过诱导中性粒细胞和单核细胞与内皮粘附在急性胰腺炎发生发展中作用机制的研究		
课题负责人	杨志伟		
申请类型	<input type="checkbox"/> 紧急项目申请 <input checked="" type="checkbox"/> 初次常规申请		
列出所有参与课题中接触实验动物的人员			
姓名	分工	是否完成实验室安全 线上及线下培训	是否完成实验动物使用和 饲养的线上及线下培训
刘星	实验观察、动物取材	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下
姜晓亮	实验设计、实验方案确定、 动物取材	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下
刘雪	实验观察、动物取材	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下
张旭	实验观察、给药及动物取材	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下
赵琳娜	兽医技术员	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下	<input checked="" type="checkbox"/> 线上 <input checked="" type="checkbox"/> 线下
二、实验动物			
种类(品种、品系)	PSGL-1-/-敲除小鼠 及对照野生型 C57 小鼠	年龄	6-8 周龄
体重	小鼠 18-24 克	性别	雌性、雄性
数量	小鼠 170 只	来源	北京华阜康生物科技股份有限公司
饲养场所	二层动物房	实验场所	二层动物房
三、饲养环境			
普通环境 <input type="checkbox"/> 屏障环境 <input checked="" type="checkbox"/> 隔离环境 <input type="checkbox"/> ABSL-2 <input type="checkbox"/> ABSL-3 <input type="checkbox"/>			
是否单笼饲养    是 <input type="checkbox"/> 单笼饲养原因: _____  否 <input checked="" type="checkbox"/> 每笼动物数量: 小鼠≤5 只_____    小鼠笼具尺寸: (31×20.5×15cm)  环境丰容措施: _____			
四、动物的运送(是否需要运送, 如果需要, 说明运送的路线和使用的运输工具、包装和随运文件等) 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 由该公司负责使用 SPF 级小鼠专用笼具专用汽车运输, 使用专业的运输笼具和包装。由于是本市的公司, 运输的时间比较短, 因此不需在运输过程中加料和水。到达后经消毒酒精喷淋、15 分钟紫外灯灭菌处理后转入饲养房间。			

五、研究的目的（简单描述研究的目的，和该研究对人类，或动物，或科学研究的贡献）

急性胰腺炎（acute pancreatitis, AP）是一种临床常见的严重疾病，引起急性胰腺炎的机制和病理生理学改变极其复杂，胰腺组织消化酶异常活化以及大量胰腺腺泡细胞的坏死是急性胰腺炎的关键病理生理过程，目前还没有针对该疾病的分子发病机制的治疗方法，约 20% 的患者发生严重急性胰腺炎。但是仍然没有有效的药物疗法可以缓解 AP。尽管 SAP 的致病机制尚未完全阐明，但已认识到腺泡细胞的损伤以及随后炎症反应（例如细胞因子，趋化因子）的系统性进展的激活在 SAP 的病理过程中起着关键作用。这个过程与炎性细胞的浸润密切相关，其中单核细胞和中性粒细胞最先浸润器官并导致胰腺损伤。越来越多的证据表明，抑制免疫细胞的活化和迁移可能对 AP 中过度的炎症反应具有治疗作用。所以对急性胰腺炎的机制研究及治疗方法研究十分必要。

P-选择蛋白糖蛋白配体 1（PSGL-1）是白细胞激活，募集和粘附的关键调节分子，被认为是炎症反应的开始开关。PSGL-1 可以结合内皮细胞的 E-选择素和血小板的 P-选择素，从而启动白细胞-内皮细胞粘附的“捕获和滚动”步骤，随后渗透到组织中，同时激活多种炎症信号传导途径。经过十多年的研究，中性粒细胞的募集是 AP 发展的一个限速步骤，单核细胞/巨噬细胞的浸润以及单核细胞衍生的巨噬细胞的活化决定了 AP 的严重程度。通过靶向特定的粘附分子，包括 P-选择蛋白，淋巴细胞功能抗原 1（CD11a / CD18）和细胞间粘附分子 1（CD54），中性粒细胞的耗竭或中性粒细胞浸润的抑制可改善 AP 的组织损伤。Bhatia 等报道，单核细胞中给予 MCP-1 抑制剂可明显减轻 AP 的严重程度。同时，其他证据表明，P-选择蛋白与 PSGL-1 的交联会在细胞内引发白细胞产生细胞因子，而化学引诱剂诱导的  $\beta$ 2-整合素激活则使白细胞牢固粘附。有人指出，阻断 PSGL-1 的功能可有效预防内脏脂肪炎症和减少内皮功能障碍，这可预测以后的动脉粥样硬化和心血管并发症。所有这些研究表明，靶向阻断 PSGL-1 在减少炎症中起关键作用。然而，PSGL-1 是否参与 AP 的病理发展仍不清楚。

本研究利用 PSGL-1 敲除小鼠及其对照小鼠等研究 PSGL-1 诱导中性粒细胞和单核细胞与内皮粘附在急性胰腺炎发生发展中的作用，为急性胰腺炎的治疗提供了新的思路和方法。



#### 六、使用实验动物的依据（解释使用动物的原理；阐述选择动物属种和数量的依据）

急性胰腺炎（acute pancreatitis, AP）是一种临床常见的严重疾病，引起急性胰腺炎的机制和病理生理学改变极其复杂，胰腺组织消化酶异常活化以及大量胰腺腺泡细胞的坏死是急性胰腺炎的关键病理生理过程，这个过程与炎性细胞的浸润密切相关，其中单核细胞和中性粒细胞最先浸润器官并导致胰腺损伤。

已有研究报道使用 L-精氨酸造急性胰腺炎模型，但是该方法造模，动物模型死亡率高，模型严重程度无法控制，且其发病机制与临床急性胰腺炎发病机制相差较大。本实验拟采用腹腔注射雨蛙肽诱导急性胰腺炎模型，该模型安全性高，几乎不会出现模型动物死亡的情况，但是其模型轻重程度需要摸索，前期需要对模型进行预实验。选取不同剂量雨蛙肽，给予不同次数腹腔注射雨蛙肽，每个时间点及每个剂量均采用雌雄各半的分组方法。对照组给予相同剂量和次数的生理盐水。

##### 实验分组：

- 1) 实验采用  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ， $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ， $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ， $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  剂量浓度 7 次腹腔注射雨蛙肽，实验组 4 组，每组 10 只小鼠，雌雄各半，对照组 1 组，每组 10 只，雌雄各半；共 50 只
- 2) 选取出合适的浓度，分别采用 7 次、8 次、9 次、10 次不同注射次数，实验组 4 组，每组 10 只小鼠，雌雄各半；共 40 只

剂量及注射次数摸索确定之后，进行以下实验

- 3) PSGL-1/-小鼠构建急性胰腺炎模型组（实验组）及对照组 实验组 1 组，每组 10 只，雌雄各半；对照组 1 组，每组 10 只，雌雄各半；实验重复 2 次；共 40 只。
- 4) C57 小鼠构建急性胰腺炎模型组（实验组）及对照组 实验组 1 组，每组 10 只，雌雄各半；对照组 1 组，每组 10 只，雌雄各半；实验重复 2 次；共 40 只。

根据实验效果统计，共计小鼠 170 只。

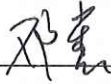
#### 七、描述动物实验的设计和操作程序






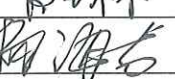



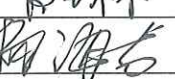



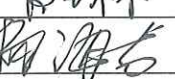


给药（所有的施于动物的药品/受试物/其他化学处理）	<p>物质 <u>雨蛙肽溶液</u> 部位 <u>腹部</u> 途径 <u>腹腔注射</u></p> <p>剂量 <u><math>1.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}</math>，<math>2.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}</math>，<math>5 \mu\text{g}/\mu\text{l}</math>，<math>10 \mu\text{g}/\mu\text{l}</math></u> 体积 <u><math>10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>，<math>20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>，<math>50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>，<math>100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math></u> 频率 <u>每隔 1h 注射 1 次，注射 7，8，9，10 次。距离第一次注射 24h 处死小鼠。</u></p>
标本的收集	<p>标本名称 <u>小肠、肾、胰、肺</u> 部位 <u>胸腹腔内</u></p> <p>时间 <u>实验结束时</u> 方法 <u>采血处死，小肠、肾、胰腺、肺 PBS 灌流后直接取材</u></p> <p>标本名称 <u>血液</u> 部位 <u>下腔静脉</u></p> <p>时间 <u>实验结束时</u> 方法 <u>下腔静脉采血</u></p>

限制动物的方法	(描述实验全过程中, 可能对动物实施的所有限制措施和限制时间) 腹腔注射时保定, 时间 3-5s;
动物识别方法	耳号 <input checked="" type="checkbox"/> 纹身 <input type="checkbox"/> 挂牌 <input checked="" type="checkbox"/> 芯片 <input type="checkbox"/>
对动物的损害和疼痛来源	(描述实验全过程中, 所有实验操作、施与动物的受试品、使用的相关制剂等, 对动物带来的危害) 在饲养分组、观察、麻醉过程中可能因为抓取使动物恐慌、紧张, 从而造成轻微应激。 在给小鼠腹腔注射等操作时对动物造成的损伤。
理想的实验终结标准	(描述完成实验任务的具体标准) 实验过程中, 动物出现如下状态将实施仁慈终点措施: 体重减少原体重的 25%以上; 持续性拱背, 明显皮毛粗糙, 并伴随其他症状如拱背、迟钝反应; 持续性呼吸困难; 持续性的弄湿下颚附近的皮毛; 没有任何的互动行为; 对刺激或外部行为无任何反应。没有出现仁慈终点状态的小鼠, 将按实验计划, 在实验完成后进行麻醉、取血, 处死、取材。
具体实验操作步骤(非手术)	动物到达后, 随机分组, 动物识别采取饲养笼卡片标记和耳号个体识别标记; 动物自由摄食饮水。 1) 按不同组别要求给予腹腔注射雨蛙肽, 对照组给予腹腔注射生理盐水, 实验期注意观察动物的行为状态。 2) 24h 后, 异氟烷 2%吸入麻醉后, 取血液、小肠、胰腺、肾等, 血液进行流式检测, 部分组织制作冰冻或石蜡切片, 进行免疫组化及免疫荧光检测, 提取蛋白进行免疫印迹检测。
八、手术操作程序 (如需要, 请填写本目录)	
具体操作步骤	不涉及
手术操作人, 是否有资质或经验	不涉及
手术执行的地点	不涉及
实验后的护理	不涉及
在本研究开始前, 是否有动物已经被进行过手术	<input checked="" type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是, 具体说明:
九、疼痛分类 来源: <input type="checkbox"/> A 动物园式仿生圈养之苦 <input type="checkbox"/> B 实验动物笼养限制之苦 <input type="checkbox"/> C 轻微, 或一过性, 或无疼痛 <input type="checkbox"/> D 有疼痛, 但能够解除 <input checked="" type="checkbox"/> E 不能缓解的疼痛	
十、麻醉和镇痛	
麻醉或镇痛的方法	异氟烷吸入麻醉, 剂量 2%, 时间 5-10min, 下腔静脉采血至死执行安乐死。



麻醉剂	名称 <u>异氟烷</u> 剂量 <u>2%</u> 使用方式 <u>吸入麻醉</u> 时间 <u>实验终止时 5-10min</u>
手术实验	术前：不涉及。 术中：不涉及。 术后：不涉及。
十一、仁慈终点和安乐死	
仁慈终点的判定	仁慈终点的判定必须基于准确的临床判断，综合考虑病情的严重程度，痛苦的程度，预后和实验数据等。1) 垂死及濒死状态可由以下一项或多项症状判断：不能或极缓慢移动以获取水食，持续厌食；严重体重减轻，严重消瘦，严重脱水；严重失血；不可逆的器官衰竭；持续缺乏对外界刺激的自发性应答；持续的呼吸困难；持续的不能保持竖直；持续惊厥；自残；持续腹泻；显著的，持续的体温降低；显著的肿瘤；其他与实验相关的，经判定与垂死相关的效应。2) 以下临床症状提示动物正遭受巨大痛苦。应在不影响实验目的和实施的情况下给予适当的处理进行缓解，或给予仁慈终点：异常叫声；攻击性异常；异常姿势；对提取的反应异常；移动异常；自残；开放创口或皮肤溃疡；呼吸困难；角膜溃疡；骨折；活动度降低；外观异常；快速体重降低，消瘦或严重脱水；严重出血；其他提示动物痛苦的症状。
如何执行安死术	麻醉剂名称 <u>异氟烷</u> 剂量 <u>2%</u> 使用方法 <u>吸入麻醉下腔静脉采血至死亡</u>
动物尸体的处理	动物尸体将暂时冻存于研究所-20℃冰箱，然后由所里定期送至指定公司进行焚化。

十二、危害环境的实验材料（应得到安全委员会的批准）		
	否      是（说明）	使用物品的名称
	否      是（说明）	使用物品的名称
1 生物物品	_否_      _____	
2 放射性同位素	_否_      _____	
3 有毒的化学（药）品	_否_      _____	
4 基因工程材料	_____ 是	<u>基因修饰动物（PSGL-1-/-敲除小鼠）</u>
<p>请具体描述危害环境实验材料以及如何进行相关安全操作和处理被污染的动物和有关污染物：            动物实验按照动物实验标准操作规程进行。</p> <p>本实验部分使用了基因修饰动物，如果动物逃逸，将会造成的环境潜在的基因污染。实验动物饲养繁殖于三楼动物房屏蔽环境中，整个实验过程中保证动物处于监管状态，无逃脱可能。动物房出入口安放挡鼠板，严防动物逃逸，定期对门窗进行检查，保证严密，动物笼具一经发现破损，立即更换，饲养人员出入确保动物房门关紧并锁住等。实验结束后由实验人员按笼取出，在实验室中进行取材。动物尸体及废弃物，将送后勤相关部门依据相应生物安全条例进行处理。</p> <p>实验室安全委员会主任签字：_____  _____</p>		
十三、特殊操作和仪器设备		
特殊笼具	繁殖笼 <input type="checkbox"/> 代谢笼 <input type="checkbox"/> 行为训练测试笼 <input type="checkbox"/> 其他：_____ 不涉及 _____	
限制饮水	是 <input type="checkbox"/> 时间：_____      否 <input checked="" type="checkbox"/>	
禁/限食	是 <input type="checkbox"/> 时间：_____      否 <input checked="" type="checkbox"/>	
特殊仪器设备	X-光机 <input type="checkbox"/> 核磁共振仪 <input type="checkbox"/> CT 仪 <input type="checkbox"/> 跳台 <input type="checkbox"/> 跑台 <input type="checkbox"/> 转杆 <input type="checkbox"/> 迷宫 <input type="checkbox"/> 固定架/台 <input type="checkbox"/> 猴限制椅 <input type="checkbox"/> 其他：_____	
十四、实验动物福利其他措施和紧急情况处理预案		
<p>1.日常饲养观察、实验观察和兽医/实验动物医师管理：</p> <p>每天观察的人员和观察次数：每天在给动物加料、加水对动物进行观察，上下午常规观察各 1 次，因此每天至少观察 3-4 次以上。如果出现异常情况，由动物技术人员通知兽医进行观察和处理。</p>		
<p>2.动物在进入实验前的训练：</p> <p>训练内容：检疫及实验前是动物适应新的环境设施。每个实验安排相对固定的技术员，每天与动物接触至少 3-5 次，使动物尽快熟悉实验人员。</p>		

<p>3.实验过程中动物可能出现的异常/突发情况处理:</p> <p>□瘫痪, 相应处理: □定期按摩(频率: _____) <input checked="" type="checkbox"/> 定期更换铺垫物(频率: 每三天换一次垫料)</p> <p>□不食, 相应处理: □定期提供营养乳(频率: _____)</p> <p>□体温波动, 相应处理: □体温监测(频率: _____) □保温(频率: _____)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 体重波动, 相应处理: □称体重(频率: 1次/天)</p> <p>□疼痛, 相应处理: □麻醉镇痛药物: 名称 _____ 剂量 _____ 使用方式 _____</p> <p style="padding-left: 150px;">□止痛药膏: 名称 _____ 剂量 _____ 使用方式 _____</p>											
<p>4.针对开展认知训练测试动物的痛苦的措施:</p> <p style="text-align: center;">不涉及</p>											
<p>5.人和动物意外伤害的紧急处理措施:(抓伤、咬伤、划伤、扎伤、摔伤.....)</p> <p>人的意外伤害根据情况不同, 采取不同的措施进行简单的应急处理, 比较严重的, 及时到就近医院进行必要的处理。做好个人防护, 包括安全防护帽、眼镜、手套、服装、鞋袜等, 一旦发生及时处理。若伤口只是皮肤表面, 没有出血, 马上用清水或双氧水清洗伤口, 无菌纱布包扎伤口, 以防感染; 若伤口较深, 大量出血, 先用无菌纱布按压止血, 马上去医院进行检查和处理, 24h 注射破伤风预防针及狂犬疫苗。</p> <p>动物遇到意外伤害时, 及时通知兽医到现场进行诊断并由兽医制定处理方案。执行研究所和本中心的相关应急预案。</p>											
<p>十五、项目负责人承诺</p> <p>1 本人参加动物实验培训, 并获得资格证书。</p> <p style="padding-left: 40px;">参加时间: 2016 年 09 月 参加地点: 中国医学科学院医学实验动物研究所</p> <p>2 本课题组成员都参加过动物实验的培训。</p> <p>3 以上填写内容属实, 本人对动物实验的设计的科学性、合理性和可行性负全责。</p> <p>申请人签字: </p> <p>部门负责人签字:  日期: 2019 年 12 月 13 日</p>											
<p>十六、兽医/实验动物医师意见</p>											
<p>十七、以下内容实验动物使用和管理委员会填写</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">意见</th> <th style="width: 40%;">签名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">同意</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">同意</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">同意</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">同意</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		意见	签名	同意		同意		同意		同意	
意见	签名										
同意											
同意											
同意											
同意											
<p>十八、IACUC 主席审核意见:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>IACUC 主席签字:</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p style="font-size: 1.5em; color: blue;">同意</p> <p>日期: 2019 年 12 月 13 日</p> </div> </div>											

