

动物实验伦理审查同意书

Affidavit of Approval of Animal Ethical and Welfare

编号 Approval No.	23001
-----------------	-------

以下《动物实验方案》经过实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,特此证明。

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Animal Ethical and Welfare Committee (AEWC), Hereby certify.

课题名称 Protocol Title	生物钟基因 Rev-erb 调控胰岛 α 细胞功能的作用与机制研究				
申请人 Applicant	高婧	职称/学位 Title/Degree	硕士	邮箱 Email	
课题负责人 Principle Investigator (PI)	侯新国	职称/学位 Title/Degree	教授/博士	邮箱 Email	
院系(部门) Department	第一临床学院			申请日期 Application date	2023.02.08
动物种系 Species or Strains	C57BL/6J 小鼠; 转基因小鼠 db/db; 转基因小鼠 Sting ^{flax/flax} ; LysM-Cre 转基因小鼠 Iba1-sh-Sting			动物数量 Quantity	90
计划执行时间 Period of Protocol	2023.02	实验动物使用许可证 Number of Animal use permit		SYXK (鲁): 20190005	
审查意见 Results of inspection	☒ 符合动物福利伦理要求, 可以进行实验 Agree ☐ 调整方案后, 可以进行实验 Agree after modify				
设施负责人 Chief Facility Officer		日期 Date	2023.2.12		
备注: Supplement			章 (实验动物伦理委员会) Stamp		

山东大学齐鲁医学院实验动物伦理审查委员会
Laboratory Animal Ethical and Welfare Committee of
Shandong University Cheeloo College of Medicine

主任委员:

日期: 2023.2.12

23001
山东大学齐鲁医学院实验动物伦理审查申请表

一、申请者基本情况			
项目名称	生物钟基因 Rev-erb 调控胰岛 α 细胞功能的作用与机制研究		
项目来源	国家自然科学基金	资助类别	☒ 1.纵向 ☐ 2.横向
资助等级	☒ 1.国家级 ☐ 2.省部级 ☐ 3.厅局级 ☐ 4.其他		
实验种类	☒ 1.医学研究 ☐ 2.药物疫苗类 ☐ 3.生物类 ☐ 4.农业研究 ☐ 5.健康食品 ☐ 6.其他		
申请单位	第一临床学院		
项目负责人	侯新国	电话:18560080308	E-mail:houxinguo@sdu.edu.cn
联系人	高婧	电话:18661800323	E-mail:gushuiling@126.com
申请目的	☒ 初次申请 ☐ 延长 ☐ 修改原申请 (原批准号:)		
合作单位			
合作者			
二、所需实验动物			
品种: C57BL/6J 小鼠; 转基因小鼠 db/db; 转基因小鼠 $Sting^{lox/lox}; LysM-Cre$; 转基因小鼠 Iba1-sh- $Sting$	级别: SPF	年龄: 4 周	
体重: 18g	雌 (只): 0	雄 (只): 90	
来源	☐ 1.实验动物中心统一采购。 ☒ 2.国内其他正规饲养繁殖单位。 ☒ 3.国外引进。		
饲养场地	☒ 实验动物中心 ☐ 自己实验室 ☐ 其他		
三、以非专业语言简述本研究的目的及对人类、动物或科学的贡献 本研究的目的是探究 CGAS-STING 通路对小鼠代谢、认知、免疫等影响, 为肥胖相关并发症的治疗找到新的干预靶点。			

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.请说明使用动物数量的充分理由：

1. 两种转基因动物：Cre-flox 模型、工具病毒干扰模型。

2. 高脂饮食肥胖模型，造模失败的可能性。

3. 敲基因小鼠繁育过程死亡的可能性。

4. 脑立体定位注射手术动物死亡的可能性。

五、描述动物实验的设计

1、具体说明所选物质的给药方案

工具病毒，脑立体定位注射

葡萄糖、胰岛素，腹腔注射

2、说明动物保定的必要性，动物保定的方法，包括设备和药物。

需要脑立体定位注射病毒，需要动物保定。保定方法为脑立体定位仪，药物为包裹 shRNA 或 sgRNA 或 cas9 的慢病毒或腺相关病毒。

需要腹腔注射药物，因此需要动物保定。保定方法为徒手保定。药物为葡萄糖和胰岛素。

3、标本采集方案

动物麻醉后，经过内眦静脉取血，头颈部迅速脱臼，采集小鼠脑、肝脏、肾脏、胰腺、脂肪、肌肉组织。

4、动物标识

- | | | |
|---|--|-----------------------------------|
| ☐ 染色 | ☒ 耳标 | ☐ 芯片 |
| ☐ 缠绷带 | ☐ 纹身 | ☐ 剪趾 |
| ☒ 插笼卡 | ☐ 剪耳 | ☐ 其它 (请说明) |

六、描述手术过程，使审查者知道本实验将做什么，怎样做。

一、脑立体定位注射

1. 麻醉后的小鼠剃除头部毛发，固定于脑立体定位仪。
2. 碘伏消毒，眼科剪纵向剪开头部皮肤约 1cm，暴露前后囟。前囟点作为颅骨三维坐标系原点，坐标归零。
3. 海马定位， $X = \pm 1.5 \text{ mm}$, $Y = 2 \text{ mm}$, $Z = -2 \text{ mm}$ 。调节旋钮移动操作臂到坐标位置，并标记。移开注射针，小心地用颅骨钻轻磨颅骨，将颅骨打薄至出现裂孔。
4. 10ul 的微量注射器于坐标点进针，注射剂量 2ul (两侧注射，各 1 ul)，注射速度 0.2ul/min，注射时间 5min，注射完后留针静置 5 min，然后缓慢拔出注射器针头。
5. 缝合皮肤。将小鼠从脑立体定位仪上取下，放置于饲养笼内 (可在旁边放置电暖器)，待其苏醒。

二、葡萄糖耐量实验

1. 小鼠禁食不禁水 12-14h 2. 测量小鼠体重，尾静脉取血测空腹血糖 3. 2g/kg 葡萄糖溶液腹腔注射 4. 注射葡萄糖后 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟分别尾静脉取血测血糖 三. 胰岛素耐量实验 1. 小鼠禁食不禁水 4-6h 2. 测量小鼠体重，尾静脉取血测空腹血糖 3. 0.75U/kg 胰岛素溶液腹腔注射 4. 注射胰岛素后 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟分别尾静脉取血测血糖 5. 若小鼠血糖低于 2.8mmol/L，给予腹腔注射葡萄糖，终止实验	
手术操作人及培训情况	高婧、邹颖、臧楠，均已取得实验动物从业人员培训合格证 20213715020589、20213709820576、20213425290591
手术执行地点	山东大学实验动物中心
实验后的护理	分笼饲养，防止感染
是否在同一动物上进行多个操作	☐ 否 ☒ 是，具体说明：脑立体定位注射造模转基因动物，4-8 周后行葡萄糖耐量实验，1 周后行胰岛素耐量实验
七. 导致疼痛的分类 ☐ A. 无疼痛 ☒ B. 一般性疼痛 ☐ C. 轻微疼痛 ☐ D. 有疼痛，但能够解除 ☐ E. 不能缓解的疼痛	

八、麻醉、镇痛

药物名称	给药剂量和频率	给药途径	维持时间
异氟烷	浓度 1.5%，持续	吸入	2 分钟
戊巴比妥	50mg/kg，一次给药	腹腔注射	1 小时

九、人道地结束动物生命

A、人道地结束动物生命标准

- ☐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：																									
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，由学校实验动物中心作无公害化处理 ☐ 3、其它，具体说明																									
十、有害（毒）物质的使用（应得到安全委员会的批准）																									
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;"></th> <th style="width: 10%;">是</th> <th style="width: 10%;">否</th> <th style="width: 40%;">使用物品的名称</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 放射性同位素</td> <td>☐</td> <td>☐</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2 生物物品</td> <td>☒</td> <td>☐</td> <td>LV/AAV 工具病毒载体</td> </tr> <tr> <td>3 有毒化学品、药品</td> <td>☐</td> <td>☐</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4 重组 DNA</td> <td>☐</td> <td>☐</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5 其它</td> <td>☐</td> <td>☐</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		是	否	使用物品的名称	1 放射性同位素	☐	☐		2 生物物品	☒	☐	LV/AAV 工具病毒载体	3 有毒化学品、药品	☐	☐		4 重组 DNA	☐	☐		5 其它	☐	☐	
	是	否	使用物品的名称																						
1 放射性同位素	☐	☐																							
2 生物物品	☒	☐	LV/AAV 工具病毒载体																						
3 有毒化学品、药品	☐	☐																							
4 重组 DNA	☐	☐																							
5 其它	☐	☐																							
十一、实验动物从业人员岗位资格证书：																									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">实验动物从业人员</th> <th style="width: 50%;">岗位资格证书</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>		实验动物从业人员	岗位资格证书																						
实验动物从业人员	岗位资格证书																								
十二、承诺																									
项目负责人承诺书																									
我承诺该申请使用表的内容准确无误。																									

我同意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》、山东省人民政府发布的《实验动物管理条例》。

我承诺包括我自己在内的该申请使用表中提及的与实验动物有接触的人员，已经参加了山东大学实验动物中心要求的相关培训，掌握了申请使用表中涉及的动物实验方法，都有能力完成动物实验，并且深知使用这些活体动物及动物组织所存在的风险。

我清楚作为该项目的负责人，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，遵循有关动物实验伦理原则，并严格遵守山东大学实验动物中心的相关规章制度。

项目负责人签字：侯世国

日期：2023年2月8日

十三、审核意见：

主审委员签字：

日期：2023年2月12日