

湖南中医药大学动物实验福利伦理审查申请表

申请时间： 2020 年 7 月 14 日		批准编号： LL2020102801	
一、申请者基本情况			
项目名称	西黄丸中牛黄-麝香、乳香-没药抗肝癌效应及调节肝癌微环境的机制研究		
任务来源	湖南省自然科学基金面上项目	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	湖南中医药大学		
项目负责人	田雪飞	电话：13787150655	E-mail: 003640@hnucm.edu.cn
联系人	黄振	电话：15616041313	E-mail: 731985038@qq.com
申请目的	☒ 初次申请 ☐ 延长 ☐ 修改原申请(原批准号：)		
合作单位	无		
合作者	无		
二、所需实验动物			
品种：BALB/c 小鼠	级别：SPF	年龄：4-6 周	
体重：18-22g	雌（只）：0	雄（只）：130	
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

课题组前期通过西黄丸的临床观察、西黄丸治疗肝癌的部分研究结果显示了西黄丸治疗肝癌的良好优势。结合肿瘤缺氧及免疫微环境，本项目从免疫抑制/监视失衡途径出发，分别探索西黄丸拆方牛黄-麝香，乳香-没药抗肝癌的作用机制，为临床合理使用西黄丸及其拆方提供依据，为西黄丸的深入研究和应用提供实验支持和科学依据。预计会有十分广阔的市场和良好的需求，必将带来良好的应用前景和学术价值。

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：

实验分组及给药：空白对照组，模型组，牛黄高、低剂量组，麝香高、低剂量组，牛黄麝香高、低剂量组，BMS-202 组，乳香高、低剂量组，没药高、低剂量组，乳香没药高、低剂量组，ZD1839 组。其中模型组 12 只，其余每组 6 只，共 102 只，避免因实验的不熟练带来不必要的浪费和损失，另 28 只为预实验使用，共 130 只。动物给药及标本收集分两批进行。连续灌胃给药 14 天后结束实验，收集血清和肝癌组织标本。

五、描述动物实验的设计

实验动物信息，饲养条件，造模方法，给药方法，处死动物方式，检测指标

1. 实验动物：BALB/c 小鼠、体重为 18-22g、雄鼠，130 只。
2. 饲养条件：将所有动物均置于 25℃ 的室温、45%的相对湿度、12 小时的明暗循环以及 SPF 的环境中，食用无菌食品和水。连续饲养 7 天以适应环境。
3. 肝癌皮下移植瘤小鼠模型的制备：将冻存的肝癌细胞株 SMMC-7721 复苏，体外培养至对数生长期时，离心，PBS 冲洗后，制成 1×10^7 个/ml 细胞浓度，每只 0.5ml 接种于小鼠前肢，共 124 只，6 只不进行造模做空白对照。造模成功后进行实验分组。
4. 给药方式：灌胃给药及腹腔注射给药。
5. 处死动物的方式：快速脱颈处死。
6. 指标检测：1) 血清缺氧、炎症因子含量；2) 小鼠一般情况；3) 肝癌组织 HE 染色；4) 肝癌组织的相关蛋白及 mRNA 检测。

1、具体说明所选物质的给药方案

药名	给药剂量和频率	给药途径	给药部位	备注
生理盐水	等体积，qd	灌胃	胃部	
牛黄	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
麝香	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
牛黄+麝香	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
BMS-202	20mg/kg，qd	注射	腹腔	
乳香	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
没药	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
乳香+没药	低、高剂量，qd	灌胃	胃部	
ZD1839	100mg/kg，qd	灌胃	胃部	

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。

必要性：防治动物伤人和自伤；减少动物因挣扎导致实验失败

方法：徒手保定；器械保定

设备和药物：实验鼠板；戊巴比妥

3、标本采集方案

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
皮下移植瘤	手术剥离	124 个瘤组织	1 次/只	124 个
血液	心室采血取血	1ml/只	1 次/只	6 ml
血液	心室采血取血	1ml/只	1 次/只	124 ml

4、动物标识

☒ 染色

☒ 插笼卡

☐ 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。

1、将小鼠麻醉后仰卧位固定在鼠板上。

2、剪去胸前区域被毛。

3、用碘酒及 75%酒精消毒胸前区。

4、触摸小鼠心搏最强处，右手持带 4-5 号针头的注射器，于胸左侧第 3-4 肋间，心搏最强处穿刺。

5、见血液自动流入注射器时便可缓慢回抽。

6、小鼠每次可采血量 0.5-0.6mL。

是否在同一动物上进行多个操作

☐ 否

☒ 是，具体说明：心室采血和瘤组织剥离

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
戊巴比妥	50mg/kg	腹腔注射	30min

九．人道主义结束动物生命

A、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, 小型猪等)
- ☐ 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

B、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:

C、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)

	是	否	使用物品的名称
1 放射性同位素	☐	☒	_____
2 生物物品	☐	☒	_____
3 有毒化学品、药品	☐	☒	_____
4 重组 DNA	☐	☒	_____
5 其它	☐	☒	_____

十一、实验动物设施准入资格:

实验动物从业人员	设施准入资格证号码
黄振	201905071
郑飘	201901307
郭垠梅	201901299
宁迪敏	201902146

十二、承诺

项目负责人承诺书

我承诺该申请表的内容准确无误。

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》、湖南省人民政府发布的《湖南省实验动物管理办法》。

我承诺包括我自己在内的该申请表中提及的与实验动物有接触的人员，已经参加了湖南中医药大学实验动物中心要求的相关培训，掌握了申请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伦理，并严格遵守湖南中医药大学实验动物中心的相关规章制度。

项目负责人签字：



动物实验负责人签字：



日期：2020 年 10 月 09 日

十三、审核意见：

同意审批

主审委员签字：

日期：2020 年 10 月 28 日

