



# 同济大学实验动物中心涉及动物生物医学研究 伦理审查申请表

编号(No): TJLAC-016-228

申请日期: 2016年1月1日

项目名称: miR-301a-PTEN-CCND1 pathway regulates cardiac cell cycle to promote the functional recovery of injured heart			
项目负责人: 赵倩		职称: 助理研究员	
电话: 13601952747		电子信箱: tiankong74177@126.com	
研究单位: 同济大学附属东方医院			
合作研究单位: 无		负责人: 无	
联系电话:		传真:	邮编:
研究者: 俞作仁	职称: 研究员	研究者: 甄丽晓	职称: 博士研究生
研究者: 吕金辉	职称: 助理研究员	研究者:	职称:
研究者:	职称:	研究者:	职称:
拟研究时间: 2016年01月01日至2021年12月31日			
研究课题来源: <input type="checkbox"/> 政府 <input checked="" type="checkbox"/> 基金会 <input type="checkbox"/> 公司 <input type="checkbox"/> 国际组织 <input type="checkbox"/> 其他:			
递交审查资料: <input checked="" type="checkbox"/> 实验方案 <input type="checkbox"/> 其他资料 包括: 试验用品安全性资料、生产企业资质证明、试验用品提供者的资质证明			
研究内容摘要(列清所需要的动物类型, 来源【若是从外单位取得, 请注明外单位是否已经进行伦理审查, 并提供相应的证明】, 如何使用动物): 1、本研究所采用的动物类型: C57/BL6 小鼠和 SD 大鼠 2、动物来源: 同济大学实验动物中心 若是从外单位获得实验动物, 请注明外单位是否已经进行伦理审查, 并提供相应的证明(已□/ 未□), 是否已经进行伦理审查, (能□/ 不能□) 提供伦理审查证明。			

实验过程	<p>请简要描述下在本中心实验室内进行的一系列操作。包括是否麻醉、常用药物、是否取材、实验终点（动物带走观察或是在本中心处死）</p> <p>本实验采用 C57/BL6 小鼠和 SD 大鼠分离心肌细胞。对实验鼠施行腹腔注射 1%戊巴比妥钠 80mg/kg 进行麻醉，麻醉后取出心脏分离心肌细胞，其中实验组及对照组每组各 20 只。</p> <p>本实验采用 C57/BL6 小鼠构建小鼠心梗模型。对实验鼠施行腹腔注射 1%戊巴比妥钠 80mg/kg 进行麻醉，麻醉后采用冠状动脉法构建心梗模型，给药治疗后取心脏组织，其中实验组及对照组每组各 10 只。</p> <p>实验结束后，实验鼠采用 CO2 窒息法处死，尸体置于-20℃冰柜保存，集中处理。</p>			
保密要点：				
审查要点	<p>研究的设计和 implement 是否科学、可行？1) 研究设计的合理性、统计方法(包括样本量计算) 和用最少的动物数量获得可靠结论的可能性 2) 权衡实验动物和相关群体的预期利益与预计的危险和不便是否合理 3) 应用对照组的理由 4) 暂停或终止整个研究的标准。</p>			
审查结果 (是否同意申请人的实验方案)	实验动物中心伦理委员会意见	<input checked="" type="checkbox"/> 同意	<input type="checkbox"/> 不同意	<input type="checkbox"/> 修改
				
<p>动物中心签章 (Signature of Animal center)</p> 				

填表说明：1、申请日期请填写拟交申请日期，编号由实验动物中心伦理委员会填写。

2、申请书中方格可在文字输入打印后，在选中的项目前用钢笔画√。

3、联系人为：本研究项目的联系人及电话。

4、研究者包括合作研究单位的人员。

5、送交审查资料包括：申请书、试验方案。



# 实验方案

## 一、小鼠及大鼠心肌细胞分离

1. 对实验鼠施行腹腔注射 1%戊巴比妥钠 80mg/kg 进行麻醉后，用锋利的剪刀剪开实验鼠胸腔，迅速取出心脏，放入盛有冰冷 PBS 的 100mm 培养皿中。其中实验组及对照组每组各 20 只。
2. 将心脏剪成 1mm<sup>3</sup> 小块，PBS 洗 3 次，冰上操作。
3. 将组织块移入 50ml 离心管，加入 2-3 倍体积的消化液，充分吹匀，37℃ 水浴中轻摇 5 分钟。
4. 去除上清。
5. 重复步骤 3，收集上清于 10mL 血清中。
6. 重复步骤 5，7~8 次直至组织块完全消化。
7. 收集的上清液，1200rpm 离心 3min。
8. 去除上清，培养基重悬，40μm 滤网过滤未消化的组织块。
9. 将过滤后的细胞放入 37 度培养箱中 2h，差速贴壁法去除成纤维细胞。
10. 同时将要使用的细胞培养板用 1% gelatin 包被，放置 37℃ 培养箱 30min。
11. 从 37℃ 取出包被过的细胞培养板，吸去 gelatin，PBS 清洗三遍。
12. 将未贴壁的细胞转移至离心管中，1200rpm 离心 3-5min，用含有 Brdu (0.1mmol/L) 的培养基重悬细胞，接种于细胞培养板中。

## 二、小鼠心梗模型的制备及病毒注射

1. 选取 30 只 C57 成年雄性小鼠，腹腔注射 1%戊巴比妥钠 80mg/kg 进行麻醉，用小鼠剃毛器剃除小鼠胸部及腋下毛发，充分暴露手术区，用 75%乙醇手术区消毒。
2. 气管插管：麻醉后，夹趾检测无反应即可进行心梗手术。打开外置光源、显微镜开关，打开呼吸机，设置好各参数（呼吸频率 110bpm），将气管插管沿声门插入气管，取下小鼠接上呼吸机，观察小鼠呼吸状况，胸廓起伏与呼吸机频率一致表示插管成功，即可进行心梗手术。
3. 小鼠采用右侧卧位，用眼科剪在左前肢腋下，用显微剪于三、四肋间打开胸腔充分暴露心脏，显微直镊轻轻夹起少量心包并于左心耳下撕开少许心包，充分暴露左冠状动脉前降支（LAD）或所在区域。

4. 结扎冠状动脉：于显微镜下找到 LAD 走向或可能所在位置,持针器持取 7-0 带针缝合线，于左心耳下缘 2mm 处进针，缝线穿过 LAD，以完全阻断 LAD 血流。
5. 关胸：结扎完成后，6-0 缝线完全缝合胸腔开口（保证无缝隙、无错位）关闭胸腔，由内向外逐层缝合各层肌肉和皮肤。
6. 术后管理：术后密切关注小鼠状态，有无呼吸异常等。待小鼠自然苏醒后将小鼠从呼吸机上取下并取下气管插管，正常饲养。
7. 小鼠手术三天后，心脏超声检测小鼠心脏功能各项指标。
8. 选取心功能损伤的小鼠，随机分别尾静脉注射 AAV9-miR-301a 或 AAV9-miR-scramble 病毒液，每只注射 10 $\mu$ L， $5\times 10^{11}$  滴度/mL 的病毒液。
9. 分别在注射病毒一周、两周、三周及四周后，进行心脏超声，检测小鼠心脏功能。
10. 病毒注射四周后，取小鼠心脏，进行后续实验。

实验结束后，实验鼠采用 CO<sub>2</sub> 窒息法处死，尸体置于-20℃冰柜保存，集中处理。