

## 实验动物福利伦理审查表

编号 No.	IACUC-2108008
申请日期 Date	2021-08-07

### 一、申请者基本情况

实验名称 Protocol	益生菌改善母体免疫激活孤独症模型小鼠行为的机制研究				
	the mechanism of probiotics improving the behavior of maternal immune-activated autism mice				
项目来源及编号 Fund Source	生殖医学国家重点实验室 KY116XJ20190004	拟实验时间 Period of Protocol	2021-08-23 - 2023-12-31		
	State Key Laboratory of Reproductive Medicine KY116XJ20190004				
申请人姓名 Applicant	李涛	职称/学位 Title/Degree	硕士	电话 Tel	13813453084
	LITAO		master		
院系(部门) Department	南京医科大学基础医学院微生物学系		邮箱 Email	13813453084@163.com	
	Department of microbiology, nanjing medical university				
实验负责人 Principle Investigator	刘星吟	职称/学位 Title/Degree	教授	电话 Tel	86869397
	liuxingyin		professor		
院系(部门) Department	南京医科大学基础医学院微生物学系		邮箱 Email	xingyinliu@njmu.edu.cn	
	Department of microbiology, nanjing medical university				

### 二、实验人员(没有资格证号不予受理)

实验执行人	职称/学位	动物实验资格证编号	电话	邮箱
李涛	硕士	2170334	13813453084	13813453084@163.com
朱启辉	硕士	220195751	13915451728	zhuqh@njmu.edu.cn

### 三、项目简介

## 1、 本研究的目的、内容、意义，动物实验的目的、拟解决问题和实验策略（以非专业语言简述）（≤1000字）

### 研究背景：

自闭症也就是孤独症，这种严重的神经发育障碍疾病的发病率近些年呈现出持续增长的趋势，2020年美国的统计数据显示孤独症患病率上升了近10%，占美国儿童的1/54[1]。目前孤独症的病因大致归类于环境因素和遗传因素环境因素包括孕期感染等因素所致的母体免疫激活、心理压力、丙戊酸钠等药物使用 and 环境污染等。遗传因素则包括以CHD8为代表的一些基因缺陷，环境因素中的母体免疫激活，多数指孕期感染会导致母亲血液中如TH17细胞激活以及白介-17等促炎细胞因子释放，并通过胎盘屏障进入胎儿体内影响胚胎发育[2]。再加上自身的遗传背景和以及出生后的免疫状况等都将与母亲感染一起增加后代神经发育障碍的风险。在动物模型上，科学家多以病毒核酸类似物poly I:C构建的妊娠期感染模型，对子代的研究发现，PIC诱导的小鼠在发育期大脑结构发生改变，出生的子代小鼠大脑S1DZ区的c-Fos基因表达增加，海马区苔藓纤维突触水平增加[3]。在自闭症的临床表现方面，前面提到多数自闭症儿童还存在便秘、腹泻等肠道问题，课题组前期的研究也表明：自闭症患者存在胃肠道问题的同时，他们的肠道菌群也是异常的，菌群丰度和多样性降低，结构异常，普氏菌、拟杆菌等共生菌属比例降低，提示了肠道菌群对自闭症发生发展的影响以及潜在的治疗作用[4]。

### 动物实验目的：

基于肠道菌群对自闭症发生发展的影响以及潜在的治疗作用，以及肠道菌群对中枢神经系统的重要调节作用，对本课题拟通过母体免疫激活小鼠模型探究本课题组分离出的一株益生菌 Poly I:C诱导的子代孤独症发生发展中的作用和机制。

### 拟解决的问题：

- 1、通过小鼠模型，阐明候选益生菌对poly I:C诱导的自闭症小鼠的社交行为的改善作用；
- 2、通过小鼠模型，阐明益生菌的候选代谢产物对自闭症模型小鼠的改善作用及其机制；
- 3、通过小鼠模型，阐明益生菌及其候选的代谢物通过肠道免疫影响神经免疫的作用及其机制；

## 2、 主要参考文献（≤5篇）（≤1000字）

[1]Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *Surveillance Summaries* March 27, 2020 / 69(4);1-12

[2]Myka L. Estes and A. Kimberley McAllister. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* 2016 Aug 19;353(6301)

[3]The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science* 2016 Feb 26;351(6276)

[4]Dan Z, et al. Altered gut microbial profile is associated with abnormal metabolism activity of Autism Spectrum Disorder. *Gut Microbes*. 2020

3、本项目是否与已通过审查的项目相关联（重复或类同）？如果有，具体的项目名称与受理号并附加说明：（≤1000字）

无

#### 四、动物信息

使用动物来源	<input checked="" type="checkbox"/> 繁育中心 <input type="checkbox"/> 五台动物房 <input type="checkbox"/> 基地公用平台动物房 <input type="checkbox"/> 国内其他饲养繁殖单位 <input type="checkbox"/> 国外引进	质量合格证	<input checked="" type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 无
品种、品系	<input type="checkbox"/> 大鼠 <input checked="" type="checkbox"/> 小鼠 C57 <input type="checkbox"/> 裸鼠 <input type="checkbox"/> 其他（具体说明）	等级	<input type="checkbox"/> 普通 <input type="checkbox"/> 清洁 <input checked="" type="checkbox"/> SPF <input type="checkbox"/> 无菌
数量	♀ 300 ♂ 150	周龄	6~8 W
饲养设施地点	<input type="checkbox"/> 五台动物房 <input checked="" type="checkbox"/> 江宁公用平台动物房 <input type="checkbox"/> 其它（请填写校外实验动物设施使用证明）	设施类型	<input checked="" type="checkbox"/> 屏障环境（正压） <input type="checkbox"/> 屏障环境（负压） <input type="checkbox"/> 普通环境 <input type="checkbox"/> 隔离环境
动物使用的理由	<input checked="" type="checkbox"/> 一些生物学过程和机理不能在体外研究 <input checked="" type="checkbox"/> 已进行体外实验，现必须进行体内实验 <input checked="" type="checkbox"/> 体外实验需要动物组织 <input type="checkbox"/> 其它，请具体说明：		

<p>动物品种选择的理由</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> 该品种的生理学、解剖学、身体大小等特点最适于本研究</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 该品种是本实验公认的理想动物模型</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 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</p> <p><input type="checkbox"/> 从其它品种动物扩展相关数据到该品种</p> <p><input type="checkbox"/> 其它，请具体说明：</p>
<p>动物实验计划、分组、与实验操作 (≤1000字)</p>	<p>1、构建poly IC诱导的自闭症小鼠模型： 6~8 周龄C57雌鼠SPF级喂养，随机分为对照组和poly IC注射组，考虑到孕期用药会导致流产及poly IC对小鼠性别的影响，雌鼠每组50只。适应性培养一周后与成年健康雄鼠交配，于E12.5 天注射poly IC。子代小鼠出生后3周断奶，母鼠淘汰，将子代雄鼠分别随机分为益生菌或候选代谢产物治疗组和PBS治疗组 (n=20)，益生菌或候选代谢产物加入饮用水中，并每日更换饮用水，标准食物喂养，治疗4周后对雄性后代进行后续实验。 (考虑前期实验摸索及后续补充实验，此造模过程约进行3次，雌鼠用量约为300只，对应配繁用雄鼠约150只)</p> <p>2、自闭症小鼠模型行为测试： 益生菌或候选代谢产物治疗4周以后，对雄性子代小鼠进行埋珠、旷场、三箱社交等行为学测试 (n=20)；</p> <p>3、行为学测试结束后，收集各组小鼠粪便，检测益生菌对小鼠肠道稳态的影响，对小鼠脑组织进行MRI和HE等病理检测，以探究益生菌及其候选代谢产物改善自闭症小鼠行为的机制。</p>

## 五、实验信息

### 1、动物实验主要观察指标 (≤1000字)

<p>1、埋珠、旷场、三箱社交等行为学测试检测小鼠社交行为变化； 2、MRI、HE和IHC等检测小鼠大脑结构改变； 3、16s测序等检测小鼠肠道菌群改变。</p>
---

### 2、给药方案 (包括注射细胞)

药名	给药剂量	给药频率	给药途径	给药部位
益生菌	109CFU/只	1次/天	灌胃	胃
poly IC	20mg/kg	1次	腹腔注射	腹部

### 3、标本采集方案

采集的组织或体液	采集方法	数量或体积	采集频率	持续时间或最大采集数量
外周血清	心脏取血	500ul	1次	500ul

脑组织	安乐死后解剖取材	全脑	1次·	全脑
粪便	代谢笼收集粪便	200ng	2次	400mg

#### 4、手术操作描述 (≤1000字)

无			
术者技术资质		手术地点	
手术后护理		同一动物上进行多个操作	<input type="checkbox"/> 否 <input type="checkbox"/> 是
疼痛评价	<input type="checkbox"/> 无疼痛或痛苦 <input type="checkbox"/> 轻微疼痛或痛苦 <input type="checkbox"/> 明显疼痛或痛苦 <input type="checkbox"/> 重度疼痛或痛苦		

#### 5、麻醉与镇痛

药物名称及浓度	给药剂量和频率	给药途径	维持时间
1%巴比妥钠	40mg/kg	腹腔注射	麻醉后颈椎脱臼处死

#### 6、实验动物生命终结标准

<input checked="" type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 2、实体瘤的大小超过动物体重的10% <input checked="" type="checkbox"/> 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 <input checked="" type="checkbox"/> 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 <input checked="" type="checkbox"/> 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 <input checked="" type="checkbox"/> 6、感染，在抗生素治疗无效并伴随动物全身性不适症状 <input type="checkbox"/> 7、器官：出现器官严重丧失功能的临床症状且治疗无效，或经动物中心兽医师判断预后不佳 <input type="checkbox"/> 8、呼吸系统：呼吸困难、发绀大失血 <input type="checkbox"/> 9、心血管系统：大失血、已给予一次输液治疗后仍贫血（低于20%）
--

- 10、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
- 11、神经系统：中枢神经抑制、震颤、瘫痪（其中任一肢或以上）、对止痛剂治疗无效之疼痛
- 12、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）
- 13、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

### 7、动物安乐死方法

	小于125g 啮齿动物	125g~ 1kg 啮齿 动物/兔	1kg~ 5kg 啮齿 动物/兔	犬	猫	非人 灵长类	牛、马、猪	两栖 类/鱼类
<input type="checkbox"/> 二氧化碳	√	√	√	X	X	X	X	√
<input checked="" type="checkbox"/> 巴比妥 钠静脉注射 (100 mg/ kg)	√	√	√	√	√	√	√	√
<input type="checkbox"/> 巴比妥 钠腹腔注射 (100 mg/ kg)	√	√	√	X	√	X	√	√
<input type="checkbox"/> 麻醉后放 血致死	√	√	√	√	√	√	√	√
<input type="checkbox"/> 麻醉后 静脉注射 Kcl (1-2 mg/ kg)	√	√	√	√	√	√	√	√
<input type="checkbox"/> 麻醉后断 头	√	√	△	X	X	X	X	√
<input checked="" type="checkbox"/> 麻醉后颈 椎脱位	√	√	X	X	X	X	X	X
<input type="checkbox"/> 动物清醒 中直接断头	△	△	△	X	X	X	X	X
<input type="checkbox"/> 动物清醒 中直接颈椎脱 位	△	X	X	X	X	X	X	X
<input type="checkbox"/> 乙醚	△	X	X	X	X	X	X	X

表格说明：Y 建议使用之方法；× 不建议使用之方法；△ 说明理由并经动物实验管理委员会审核通过后可使用之方法。

8、用CO2或其他吸入性气体对动物安乐死时，需准备另一种物理方法，在动物无意识的状态下，对其进一步安乐死

- 1、断头
- 2、头颈部脱臼
- 3、放血法，如割开大血管、心脏灌注、摘取主要器官
- 4、切开胸部，使动物气胸和停止呼吸
- 5、其它，请具体说明：

9、用过剂量的药物（如戊巴比妥）对动物实施安乐死时，在给药10分钟后必须再次检测动物的生命体征。采用以下标准判断动物已死亡

- 1、动物已经不动了，没有呼吸了
- 2、动物已没有呼吸、心跳、角膜反射、肌张力和粘膜颜色
- 3、其它，请具体说明：

10、剩余动物的最终处理

- 1、安乐死
- 2、返回供应单位
- 3、转给其它课题组
- 4、饲养直至其自然死亡
- 5、其它，请具体说明：

11、动物尸体、组织、或体液的最终处理

- 1、制作标本
- 2、集中无公害化处理
- 3、其它，请具体说明：

12、动物实验中使用的试剂

- 1、放射性同位素
- 2、生物物品 益生菌
- 3、化学品、药品 poly IC
- 4、重组 DNA
- 5、其它
- 6、无

13、如对伦理审查有特殊要求，请说明（例如需要某一委员回避等）（≤1000字）

无

## 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》、江苏省人民政府发布的《江苏省实验动物管理办法》。

我承诺该申请表中提及的实验人员，已经参加实验动物的相关培训，掌握了实验中涉及的动物实验方法，并且深知使用这些活体动物及物组织所存在的风险。

我将自觉遵守实验动物福利伦理原则，同意接受委员会或实验室管理者的监督与检查。

实验负责人：

实验执行人：

（包括参与实验的所有人员）：

2021年 08月 07日

<b>审 查 依 据</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1、该实验是否必须用实验动物进行实验，即能否用计算机模拟、细胞培养等非生命方法替代动物或用低等动物替代高等动物进行实验</li><li>2、表中所填实验相关人员资格和实验相关单位是否合适</li><li>3、表中所填实验所用动物能否通过改良设计方案或用高质量的动物来减少所用动物的数量</li><li>4、能否通过改进实验方法、调整实验观测指标、改良处死动物的方法，来优化实验方案、善待动物</li><li>5、实验设计、实验技术方法及用于本实验的动物数量是否合理可行</li></ol>
----------------------------	--

实验动物福利伦理委员会审查意见

委员签字（签章）：

年 月 日

备注：

### 填表说明：

1、本申请表须在实验前2个月提交。要求写明课题的意义、必要性，表中有关实验动物的用途、饲养管理或动物实验操作和观察步骤、实验终结标准、减少动物痛苦伤害措施的程序和方法等涉及动物福利和伦理问题的需要详细描述，可以增加附页。

- 2、请根据初审意见修改并提交，初审通过后，请根据会审意见修改并提交，然后会再次审核。通过后将本申请表下载并打印一份，课题负责人、执行人及合作单位负责人均需在声明人签字栏签字。然后连同必要的审查资料递交到动物伦理委员会兽医办公室。
- 3、需在外单位完成课题的，请同时填写院外实验动物设施使用证明。
- 4、凡项目执行人无实验动物上岗培训合格证明材料（需在有效期内）的课题不能进行，亦不做伦理审查。

## 实验动物福利伦理审查同意书

Affidavit of Approval of IACUC

申请编号	14308	批准编号 Approval No.	IACUC-2108008
------	-------	----------------------	---------------

本《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。方案的相关信息如下：

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

实验名称 Protocol Title	益生菌改善母体免疫激活孤独症模型小鼠行为的机制研究				
	the mechanism of probiotics improving the behavior of maternal immune-activated autism mice				
申请人姓名 Applicant	李涛	职称/学位 Title/Degree	硕士	邮箱 Email	13813453084@163.com
	LITAO		master		
实验负责人 Principle Investigator	刘星吟	职称/学位 Title/Degree	教授	邮箱 Email	xingyinliu@njmu.edu.cn
	liuxingyin		professor		
院系(部门) Department	南京医科大学基础医学院微生物学系			申请日期 Application Date	2021-08-07
	Department of microbiology, nanjing medical university				
拟实验时间 Period of Protocol	2021-08-23 - 2023-12-31	实验动物使用许可证 Number of Animal Use Permit		SYXK(苏)2020-0022	
审核意见 Results of Inspection	符合动物福利伦理要求，可以进行实验。 Agree				
兽医师 Chief Veterinary Officer	张爱华 Zhang Aihua			日期 Date	

南京医科大学实验动物福利伦理委员会  
Institutional Animal Care and Use Committee of NMU

主席(chairman): 施爱民 签名(signature):  
Shi Aimin

日期(Date): 2021-08-09

## 实验动物福利伦理审查同意书

Affidavit of Approval of IACUC

申请编号	14308	批准编号 Approval No.	IACUC-2108008
------	-------	----------------------	---------------

本《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。方案的相关信息如下：

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)

实验名称 Protocol Title	益生菌改善母体免疫激活孤独症模型小鼠行为的机制研究				
	the mechanism of probiotics improving the behavior of maternal immune-activated autism mice				
申请人姓名 Applicant	李涛	职称/学位 Title/Degree	硕士	邮箱 Email	13813453084@163.com
	LITAO		master		
实验负责人 Principle Investigator	刘星吟	职称/学位 Title/Degree	教授	邮箱 Email	xingyinliu@njmu.edu.cn
	liuxingyin		professor		
院系(部门) Department	南京医科大学基础医学院微生物学系			申请日期 Application Date	2021-08-07
	Department of microbiology, nanjing medical university				
拟实验时间 Period of Protocol	2021-08-23 - 2023-12-31	实验动物使用许可证 Number of Animal Use Permit		SYXK(苏)2020-0022	
审核意见 Results of Inspection	符合动物福利伦理要求，可以进行实验。 Agree				
兽医师 Chief Veterinary Officer	张爱华 Zhang Aihua			日期 Date	

南京医科大学实验动物福利伦理委员会  
Institutional Animal Care and Use Committee of NMU

主席(chairman): 施爱民 签名(signature):  
Shi Aimin

日期(Date): 2021-08-09