

白藜芦醇对脓毒症大鼠心肌能量代谢的影响

赵华杰

【摘要】目的 探讨白藜芦醇对脓毒症大鼠心肌能量代谢的影响及相关机制。**方法** 将20只雄性SD大鼠按随机数字表法分为4组,每组5只。以腹腔注射脂多糖(LPS)10 mg/kg制备脓毒症模型;假手术组(Sham组)腹腔注射等量生理盐水。白藜芦醇治疗组(RES组)于注射LPS前10 min静脉注射白藜芦醇8 mg/kg;白藜芦醇联合沉默信息调节因子1(sirt1)抑制剂sirtinol组(RES+sirtinol组)于注射LPS前先静脉注射sirtinol溶液1 mg/kg,5 min后再静脉注射白藜芦醇8 mg/kg。6 h后处死大鼠取心脏,透射电镜下观察各组大鼠心肌超微结构;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌sirt1蛋白表达;紫外分光光度法检测心肌细胞色素C氧化酶(CCO)活性;高效液相色谱法检测心肌三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)含量。**结果** 透射电镜下显示,Sham组心肌线粒体结构正常;LPS组及RES+sirtinol组心肌线粒体肿胀、排列紊乱,线粒体嵴减少;RES组上述症状不明显。与Sham组比较,LPS组sirt1蛋白表达下降(灰度值:0.602±0.038比0.902±0.037, $P<0.05$),CCO活性降低(U/mg:0.344±0.019比0.600±0.023, $P<0.05$),ATP、ADP、AMP含量下降[ATP(μg/g):89.958±7.570比157.460±6.737,ADP(μg/g):164.658±6.742比251.608±5.191,AMP(μg/g):179.926±7.303比276.262±5.546,均 $P<0.05$]。与LPS组比较,RES组sirt1蛋白表达增加(灰度值:0.874±0.017比0.602±0.038, $P<0.05$),CCO活性提高(U/mg:0.574±0.013比0.344±0.019, $P<0.05$),ATP、ADP、AMP的含量升高[ATP(μg/g):147.686±8.853比89.958±7.570,ADP(μg/g):245.860±7.111比164.658±6.742,AMP(μg/g):271.260±6.658比179.926±7.303,均 $P<0.05$]。与RES组比较,RES+sirtinol组sirt1蛋白表达下降(灰度值:0.636±0.030比0.874±0.017, $P<0.05$),CCO活性减弱(U/mg:0.369±0.040比0.574±0.013, $P<0.05$),ATP、ADP、AMP含量下降[ATP(μg/g):97.942±11.257比147.686±8.853,ADP(μg/g):168.888±8.965比245.860±7.111,AMP(μg/g):175.498±6.993比271.260±6.658,均 $P<0.05$]。**结论** 白藜芦醇能明显改善脓毒症大鼠心肌能量代谢,sirt1是白藜芦醇影响心肌能量代谢的重要调节因子。

【关键词】 脓毒症; 白藜芦醇; 沉默信息调节因子; 能量代谢; 细胞色素C氧化酶; 三磷酸腺苷

Effect of resveratrol on myocardial energy metabolism in sepsis rats Zhao Huajie. Department of Intensive Care Unit, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China
Corresponding author: Zhao Huajie, Email: zhao.hj2008@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of resveratrol (RES) on myocardial energy metabolism in sepsis rats and its mechanism. **Methods** Twenty Sprague-Dawley (SD) rats were divided into four groups according to the random number table, 5 rats in each group. The sepsis model was reproduced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) 10 mg/kg, and the rats in sham group were injected intraperitoneally with the same amount of saline. The rats in RES treatment group (RES group) were injected RES 8 mg/kg 10 minutes before LPS injection, and those in RES combined with the silent information regulator 1 (sirt1) inhibitor group (RES + sirtinol group) were injected sirtinol 1 mg/kg followed by RES 8 mg/kg 10 minutes before LPS injection. The rats were sacrificed 6 hours later, and the heart was harvested. The myocardial ultrastructure was observed by transmission electron microscope. The expression of sirt1 protein was detected by Western Blot. The cytochrome C oxidase (CCO) activity was determined by ultraviolet spectrophotometry. The content of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) were detected by high-performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Under transmission electron microscopy, the mitochondria in myocardium in sham group was normal, and mitochondria was swollen and derangement in LPS group and RES + sirtinol group, but it was not significant in RES group. Compared with sham group, the sirt1 protein expression in LPS group was decreased (gray value: 0.602±0.038 vs. 0.902±0.037, $P<0.05$), the CCO activity was declined (U/mg: 0.344±0.019 vs. 0.600±0.023, $P<0.05$), the contents of ATP, ADP, and AMP were decreased [ATP(μg/g): 89.958±7.570 vs. 157.460±6.737,

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.12.008

基金项目:天津市自然科学基金(09JCYBJC11300)

作者单位:300211 天津医科大学第二医院ICU

通讯作者:赵华杰, Email: zhao.hj2008@163.com

ADP ($\mu\text{g/g}$): 164.658 ± 6.742 vs. 251.608 ± 5.191 , AMP ($\mu\text{g/g}$): 179.926 ± 7.303 vs. 276.262 ± 5.546 , all $P < 0.05$]. Compared with LPS group, the sirt1 protein expression in RES group was increased (gray value: 0.874 ± 0.017 vs. 0.602 ± 0.038 , $P < 0.05$), the CCO activity was increased (U/mg: 0.574 ± 0.013 vs. 0.344 ± 0.019 , $P < 0.05$), the contents of ATP, ADP, and AMP were increased [ATP ($\mu\text{g/g}$): 147.686 ± 8.853 vs. 89.958 ± 7.570 , ADP ($\mu\text{g/g}$): 245.860 ± 7.111 vs. 164.658 ± 6.742 , AMP ($\mu\text{g/g}$): 271.260 ± 6.658 vs. 179.926 ± 7.303 , all $P < 0.05$]. Compared with RES group, the sirt1 protein expression in RES + sirtinol group was decreased (gray value: 0.636 ± 0.030 vs. 0.874 ± 0.017 , $P < 0.05$), the CCO activity was declined (U/mg: 0.369 ± 0.040 vs. 0.574 ± 0.013 , $P < 0.05$), the contents of ATP, ADP, and AMP were decreased [ATP ($\mu\text{g/g}$): 97.942 ± 11.257 vs. 147.686 ± 8.853 , ADP ($\mu\text{g/g}$): 168.888 ± 8.965 vs. 245.860 ± 7.111 , AMP ($\mu\text{g/g}$): 175.498 ± 6.993 vs. 271.260 ± 6.658 , all $P < 0.05$].

Conclusion RES could improve myocardial energy metabolism in sepsis rats, in which sirt1 is an important factor.

【Key words】 Sepsis; Resveratrol; Silent information regulator; Energy metabolism; Cytochrome C oxidase; Adenosine triphosphate

脓毒症 (sepsis) 是感染所致的全身炎症反应, 严重威胁患者的生命。脓毒症患者常出现心功能不全 (40% ~ 50%)^[1], 而研究表明心力衰竭会大大增加脓毒症患者的病死率 (70% ~ 90%)^[2-3]。心肌能量代谢障碍是脓毒症心肌损害的始动环节, 改善心肌能量代谢可能成为治疗脓毒症的新方案。白藜芦醇是多酚类化合物, 具有抑制线粒体氧化应激、改善糖代谢、脂代谢等作用。激活静默信息调节因子 1 (sirt1) 是白藜芦醇参与能量代谢的主要作用机制之一。那么, 白藜芦醇能否通过 sirt1 途径改善脓毒症大鼠的心肌能量代谢呢? 本实验通过观察白藜芦醇对脓毒症大鼠心肌能量代谢通路中重要环节——细胞色素 C 氧化酶 (CCO) 活性以及三磷酸腺苷 (ATP) 含量等的影响, 并通过 sirt1 抑制剂 sirtinol 干扰 sirt1 途径, 探讨白藜芦醇可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂: 脂多糖 (LPS)、白藜芦醇、sirt1 一抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗、细胞色素 C、ATP、二磷酸腺苷 (ADP)、一磷酸腺苷 (AMP, 美国 Sigma 公司), β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物和分组: 20 只健康雄性 SD 大鼠, 体重 (250 ± 50) g, 由天津医科大学动物实验中心提供, 动物合格证号: SCXK (京) 2009-2004。按随机数字表法将大鼠分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (LPS 组)、白藜芦醇治疗组 (RES 组)、白藜芦醇联合 sirtinol 组 (RES+sirtinol 组) 4 组, 每组 5 只。

1.3 动物模型制备与处理: 通过静脉注射二甲基亚砜 (DMSO) 稀释液 (DMSO : 生理盐水为 1 : 2) 后 10 min 腹腔注射 LPS 10 mg/kg 制作脓毒症大鼠模型; Sham 组静脉注射 DMSO 稀释液后 10 min 腹

腔注射生理盐水。RES 组于注射 LPS 前 10 min 静脉注射白藜芦醇 8 mg/kg (溶于 DMSO 稀释液中); RES + sirtinol 组于腹腔注射 LPS 前静脉注射 sirtinol 1 mg/kg, 5 min 后再静脉注射白藜芦醇 8 mg/kg。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法: 各组均于处理后 6 h 处死动物取心脏备用。

1.4.1 心肌超微结构观察: 取适量心肌组织, 常规固定、包埋、切片、铅-铀双染, 于透射电镜下观察。

1.4.2 sirt1 蛋白表达测定: 取心肌组织, 常规制备蛋白样品并测定浓度。取 20 μg 样品上样后, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、电转膜、封闭、sirt1 一抗 (1 : 20) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h 后缓冲液冲洗, HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育 1 h, 缓冲液冲洗, 显影定影, 检测 sirt1 蛋白及内参照 β -actin 的灰度值, 以目的条带与 β -actin 的灰度值比值代表 sirt1 蛋白的相对表达水平。

1.4.3 CCO 活性测定: 参照文献[4]方法检测 CCO 活性。提取心肌线粒体蛋白制成 1 mg/mL 悬液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下向 2 mL 细胞色素 C 反应体系中加入 20 μL 线粒体蛋白悬液, 每隔 1 min 记录波长 550 nm 处吸光度 (A) 值, 用反应物 A 值变化代表其活性。

1.4.4 ATP、ADP、AMP 含量测定: 采用高效液相色谱技术测定 ATP、ADP、AMP 含量。色谱条件: ODS 分析柱 (5 μm , 4.6 mm \times 500 mm), 流动相为甲醇-磷酸二氢钾缓冲液, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 259 nm。将 ATP、ADP、AMP 标准品制成标准液经色谱分析得出标准曲线。取心肌组织, 经沉淀、匀浆, 冰浴离心取上清液, NaOH 调至 pH 7.0, 再次离心取上清 20 μL 进样, 与标准曲线对比。

1.5 统计学方法: 所有数据通过 SPSS 16.0 软件进行处理, 经 Levene 检验验证方差齐性。计量资料以

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-*q* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织超微结构改变: Sham 组心肌线粒体结构清晰, 嵴光滑可见。LPS 组及 RES+sirtinol 组心肌线粒体肿胀变形, 排列略紊乱, 线粒体嵴肿胀减少, 膜连续性消失, 空泡形成。RES 组上述症状不明显, 线粒体大小趋于均匀, 膜间断连接。

2.2 sirt1 蛋白表达 (图 1; 表 1): LPS 组 sirt1 蛋白表达较 Sham 组明显下降 ($P < 0.05$); RES 可诱导脓毒症大鼠 sirt1 表达增加 ($P < 0.05$); sirtinol 可抑制 RES 的作用 ($P < 0.05$)。而 Sham 组与 RES 组、LPS 组与 RES+sirtinol 组之间 sirt1 蛋白表达差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, sirt1 为沉默信息调节因子 1, Sham 组为假手术组, LPS 组为脂多糖致脓毒症组, RES 组为白藜芦醇治疗组, RES+sirtinol 组为 RES+sirtinol 抑制剂组, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 1 Western Blot 检测各组大鼠心肌 sirt1 蛋白表达

2.3 CCO 活性 (表 1): LPS 组 CCO 活性较 Sham 组明显下降 ($P < 0.05$); RES 能提高脓毒症大鼠 CCO 活性 ($P < 0.05$); sirtinol 能抑制 RES 的作用 ($P < 0.05$)。Sham 组与 RES 组、LPS 组与 RES+sirtinol 组之间 CCO 活性差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

2.4 ATP、ADP、AMP 的含量 (表 1): LPS 组 ATP、ADP、AMP 含量较 Sham 组明显减少 (均 $P < 0.05$); RES 能增加脓毒症大鼠的 ATP、ADP、AMP 含量 (均 $P < 0.05$); 而 sirtinol 能抑制 RES 的作用 (均 $P <$

0.05)。Sham 组与 RES 组、LPS 组与 RES+sirtinol 组之间差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

3 讨论

临床上脓毒症患者常出现心功能不全; 动物实验也表明, 脓毒症模型兔心肌毛细血管充血、炎性细胞浸润, 心肌纤维变性、坏死, 证实脓毒症确实存在心肌损害, 可能是引起心肌收缩和舒张功能下降的原因^[5]。尽管机制尚未完全明确, 但目前已有研究证实, 内毒素-炎症因子是造成脓毒症心肌细胞损伤的重要原因。内毒素可直接损害线粒体功能, 抑制电子传递, 损害线粒体复合物 I 呼吸, 使呼吸控制率显著下降, ATP 产生减少^[6]。内毒素诱导的脓毒症动物模型易于复制, 其症状、体征与临床脓毒症类似, 为研究脓毒症病理生理机制的理想模型之一。本研究中经腹腔注射 LPS 后大鼠出现精神差、活动减少、对外界刺激反应差、寒战、呼吸急促等脓毒症表现; 电镜下观察心肌线粒体表现为体积增大, 排列略紊乱, 线粒体嵴肿胀、减少等中毒症状, 提示脓毒症模型制备成功。

能量代谢障碍是脓毒症心肌损害的重要原因。线粒体进行的有氧氧化是能量的主要来源之一, 心肌是高耗能器官, 一旦线粒体功能出现异常, 有氧氧化将不能顺利进行, 能量合成难以维持心肌活动需要, 造成心功能不全、心肌坏死等中毒症状。脓毒症尤其是脓毒性休克时, 心肌处于低灌注状态, 心肌微循环障碍、微血栓形成, 氧摄取不足, 当持续缺血时间 $> 5 \sim 7$ min 时, 呼吸链就会发生不可逆的改变, 其中以 CCO 活性受到的影响最大。由于 CCO 连接线粒体呼吸代谢与氧的供给, 其发生病变必将直接影响线粒体氧化磷酸化过程^[7]。相反, 无论是提高电子传递链酶的活性^[8], 还是直接补充外源性 ATP, 都能提高脓毒症大鼠的心肌射血分数。本实验中电镜下观察到脓毒症大鼠心肌线粒体体积增大、排列紊乱等超微结构改变。CCO 是线粒体氧化磷酸化的关键限速酶, CCO 活性抑制提示线粒体内膜电子传递链效率下降, ATP、ADP、AMP 减少直接反映心肌能量合成障碍。

植物类中药如黄芪、川芎等对脓毒症心肌损害具有预防及保护作用, 且少有副作用出现^[9-10]。白藜芦醇化学

表 1 各组大鼠心肌 sirt1 蛋白表达、CCO 活性及 ATP、ADP、AMP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	sirt1 蛋白 (灰度值)	CCO 活性 (U/mg)	ATP (μg/g)	ADP (μg/g)	AMP (μg/g)
Sham 组	5	0.902 ± 0.037	0.600 ± 0.023	157.460 ± 6.737	251.608 ± 5.191	276.262 ± 5.546
LPS 组	5	0.602 ± 0.038 ^a	0.344 ± 0.019 ^a	89.958 ± 7.570 ^a	164.658 ± 6.742 ^a	179.926 ± 7.303 ^a
RES 组	5	0.874 ± 0.017 ^b	0.574 ± 0.013 ^b	147.686 ± 8.853 ^b	245.860 ± 7.111 ^b	271.260 ± 6.658 ^b
RES+sirtinol 组	5	0.636 ± 0.030 ^c	0.369 ± 0.040 ^c	97.942 ± 11.257 ^c	168.888 ± 8.965 ^c	175.498 ± 6.993 ^c

注: sirt1 为沉默信息调节因子 1, CCO 为细胞色素 C 氧化酶, ATP 为三磷酸腺苷, ADP 为二磷酸腺苷, AMP 为一磷酸腺苷, Sham 组为假手术组; LPS 组为脂多糖致脓毒症组, RES 组为白藜芦醇治疗组, RES+sirtinol 组为 RES+sirtinol 抑制剂组; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 RES 组比较, ^c $P < 0.05$

名称为3,5,4'-三羟基苯二烯,属于多酚类化合物,在植物中分布很广,具有防癌、治疗糖尿病、抗病毒、心血管保护等多种功效。近年来,白藜芦醇在脓毒症中的作用逐渐被人们的关注。有研究表明,白藜芦醇能阻止内毒素诱导的急性期炎症反应,促进脓毒症大鼠大脑^[11]、肾脏^[12]、回肠^[13]功能的恢复,对内毒素性急性肺损伤有显著的保护作用,其作用机制可能与其抑制核转录因子 κ B(NF- κ B)活化、减轻肺组织炎症反应有关^[14]。

改善能量代谢是白藜芦醇的重要作用机制。白藜芦醇可增加急性心肌梗死(AMI)大鼠线粒体腺苷激酶1及异柠檬酸脱氢酶活性,加快三羧酸循环恢复,为梗死心肌氧化磷酸化提供更多的还原型辅酶I(NADH)^[15]。白藜芦醇能增加乙醇诱导的肝损伤模型小鼠肝脏线粒体中ATP含量^[16]。那么,白藜芦醇能否改善脓毒症大鼠心肌能量代谢呢?本研究表明,RES组心肌线粒体结构未见明显异常,CCO活性较LPS组升高,ATP、ADP、AMP合成较LPS组增加,推测白藜芦醇可以用于治疗脓毒症心力衰竭。常见的白藜芦醇给药方式为预防性给药和治疗性给药,本研究采用预防性给药取得了较好的疗效,提示白藜芦醇能够用于脓毒症高危患者。

sirt1是重要的代谢调节因子。sirt1 mRNA表达与线粒体呼吸链酶系(如NADH脱氢酶1 α 亚基2、细胞色素C、CCO IV亚基和ATP合成酶)的表达和活性相关^[17]。激活sirt1是线粒体功能修复的作用机制之一^[18]。白藜芦醇是sirt1最强的天然激活剂,为验证白藜芦醇对脓毒症心肌的保护作用是否也与sirt1有关,本研究给予脓毒症模型大鼠sirt1抑制剂sirtinol后再给予白藜芦醇,结果显示,RES+sirtinol组sirt1表达较RES组明显减弱,心肌线粒体增大、线粒体嵴减少,CCO活性下降,ATP、ADP、AMP合成减少。提示白藜芦醇对脓毒症大鼠心肌能量代谢的有益作用与sirt1有关。

参考文献

- [1] Esper AM, Martin GS. Extending international sepsis epidemiology: the impact of organ dysfunction [J]. Crit Care, 2009, 13 (1): 120.
- [2] Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart [J]. Circulation, 2007, 116 (7): 793-802.
- [3] 陈娣,潘昊,李醇文,等. 硫化氢在脓毒症大鼠心肌损伤中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21 (1): 48-53.
- [4] Ikegaya H, Iwase H, Hatanaka K, et al. Postmortem changes in cytochrome c oxidase activity in various organs of the rat and in human heart [J]. Forensic Sci Int, 2000, 108 (3): 181-186.
- [5] 潘小进,孙华. 兔脓毒症早期心肌功能的变化[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16 (6): 355-357.
- [6] 龚平,李春盛. 脓毒症和线粒体功能障碍[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (4): 254-256.
- [7] 陈昌勤,张召才,严静. 脓毒症和心肌线粒体损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2007, 19 (10): 630-632.
- [8] Groening P, Huang Z, La Gamma EF, et al. Glutamine restores myocardial cytochrome C oxidase activity and improves cardiac function during experimental sepsis [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2011, 35 (2): 249-254.
- [9] 胡雪珍,卢中秋,李志涛,等. 黄芪注射液对脓毒症患者心肌损伤干预作用的观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (6): 346-348.
- [10] 杨广,黄丹虹,杨澄,等. 川芎嗪保护脓毒症大鼠心肌的抗氧化机制研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 13-15.
- [11] Sebai H, Gadacha W, Sani M, et al. Protective effect of resveratrol against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat brain [J]. Brain Inj, 2009, 23 (13-14): 1089-1094.
- [12] Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, et al. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2012, 81 (4): 370-378.
- [13] Gacar N, Goomez S, Utkan T, et al. Effects of resveratrol on ileal smooth muscle reactivity in polymicrobial sepsis model [J]. J Surg Res, 2012, 174 (2): 339-343.
- [14] 左祥荣,曹权,阙军,等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子 κ B及炎症反应的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 16-19.
- [15] Lin JF, Wu S, Huang SS, et al. Resveratrol protects left ventricle by increasing adenylate kinase and isocitrate dehydrogenase activities in rats with myocardial infarction [J]. Chin J Physiol, 2011, 54 (6): 406-412.
- [16] Gallis JL, Serhan N, Gin H, et al. Resveratrol plus ethanol counteract the ethanol-induced impairment of energy metabolism: 31P NMR study of ATP and sn-glycerol-3-phosphate on isolated and perfused rat liver [J]. Pharmacol Res, 2012, 65 (3): 387-395.
- [17] Rutanen J, Yaluri N, Modi S, et al. SIRT1 mRNA expression may be associated with energy expenditure and insulin sensitivity [J]. Diabetes, 2010, 59 (4): 829-835.
- [18] Xu Y, Nie L, Yin YG, et al. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 259 (3): 395-401.

(收稿日期: 2015-04-23)

(本文编辑:李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代,符合动物伦理学标准;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析。