

[文章编号] 1007-385X(2007)03-0254-05

MicroRNA 在 6 种肿瘤细胞中的表达差异

马卓娅, 汤 华*, 李 欣, 刘 民, 吴海东, 王 晶 (天津医科大学 天津市生命科学中心, 天津 300070)

[摘 要] **目的:** 利用生物芯片技术分析 6 种不同器官肿瘤细胞中 microRNA (miRNA) 的表达差异。**方法:** 将 210 个与已知人类和小鼠 miRNA 互补的序列 (206 个 miRNA, 4 个阳性对照) 作为探针, 点于玻片上制备寡核苷酸芯片。提取肿瘤细胞 HeLa (人宫颈癌上皮细胞)、MCF-7 (人乳腺癌细胞)、A549 (人肺腺癌细胞)、HT-29 (人结肠腺癌细胞)、ES-2 (人卵巢透明细胞癌)、K562 (人慢性髓细胞性白血病细胞) 的 miRNA, 荧光染料 Cy3 标记, 并与制备好的芯片杂交; 用 ScanArray™ Express1.0 扫描仪扫描荧光信号, 采用 ScanArray3.0 和 Cluster3.0 软件分析处理扫描结果; Northern blotting 和 RT-PCR 方法对芯片检测结果进行验证。**结果:** 在 6 种不同器官肿瘤细胞中, 检测到 115 种 miRNA 存在差异, 91 种 miRNA 没有明显差异; 其中, miR-21 在 6 种肿瘤细胞表达水平均较高, miR-125b 表达水平均较低, let-7 不同亚型在 6 种细胞系中表达水平较低; miR-17-5p 和 miR-20a 呈簇表达, 在卵巢肿瘤 ES-2 细胞中的表达水平高于其他细胞, 乳腺肿瘤细胞系 MCF-7 和宫颈癌细胞系 HeLa 的 miRNA 表达谱聚为一类。Northern blotting 检测到 miR-17-5p 及其前体在 K562 细胞中均见表达, A549 和 ES-2 细胞中只见较弱的前体表达, MCF-7、HeLa 和 HT-29 中可见明显的前体和较弱的成熟 miRNA 的表达。RT-PCR 检测到 miR-17-5p 前体在 K562 细胞中表达水平高于其他几种细胞, 在 ES-2 细胞中的表达量低于 K562 细胞, 同时高于另外 4 种细胞; miR-21 在 6 种肿瘤细胞中表达水平均较高, 在 A549 细胞中表达最高。**结论:** 应用生物芯片技术检测肿瘤细胞中 miRNA 的表达差异为进一步探索 miRNA 与肿瘤间的关系奠定基础。

[关键词] microRNA; 肿瘤细胞; 寡核苷酸芯片; 表达差异

[中图分类号] R730.2 **[文献标志码]** A

Expression of microRNA in 6 types of human cancer cell lines

MA Zhuo-ya, TANG Hua*, LI Xin, LIU Min, WU Hai-dong, WANG Jing (Tianjin Life Science Center, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the difference of miRNA expression profiles in 6 types of human cancer cells by microarray technique. **Methods:** The microarray was prepared, with contained 210 oligonucleotides, including 206 probes complementary with human and mouse miRNA sequences and 4 positive control oligos. MiRNAs were extracted from HeLa (human cervical cancer epithelial cells), MCF-7 (human breast cancer cells), A549 (human lung adenocarcinoma cells), HT-29 (human colonic cancer cells), ES-2 (ovarian carcinoma cells), and K562 (chronic myelogenous leukemia cells) cells and were labeled with Cy3 for hybridization to the miRNA microarray. The slides were scanned by ScanArray™ Express1.0 and images were analyzed by ScanArray3.0 and Cluster3.0; the results were confirmed by Northern blotting and RT-PCR. **Results:** Totally 115 miRNAs were found to be differentially expressed in the 6 cancer cell lines, with miR-21 expression up-regulated and miR-125b, let-7 expression down-regulated. The expression of miR-17-5p and miR-20a was in cluster and was more higher in ES-2 cells than in other cells. HeLa and MCF-7 cells were located on a single branch of the dendrogram in cluster analysis. Northern blotting showed that both pre- and miR-17-5p expressed in K562, pre-miR-17-5p was weakly expressed in A549 and ES-2 cells, and obvious pre-miRNA expression and weak miRNA expression were noticed in MCF-7, HeLa, and HT-29 cells. RT-PCR showed that expression of pre-miR-17-5p in K562 cells was higher than those in other cells. Expression of miR-21 was high in all 6 cell lines and the highest expression was seen in A549 cells. **Conclusion:** Microarray can be used to detect miRNA expression files in cancer cells, which contributes to the study of the relation between miRNA and tumor.

[基金项目] 天津市科技发展计划资助项目 (033182911). Supported by Science and Technology Development Program of Tianjin (033182911)

[作者简介] 马卓娅 (1979-), 女, 河北省邯郸市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤生物学方面的研究, E-mail: mazhuoya1@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: htang2002@yahoo.com

[**Key words**] microRNA(miRNA); cancer cell; oligonucleotide array; differential expression

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(3): 254-258]

新近发现一类长度为 18 ~ 26 个核苷酸的编码小 RNA, 被称为 microRNA(miRNA), 它们在生物个体发育和细胞动态平衡中发挥重要作用。在人类肿瘤中某些 miRNA 发生突变或表达水平异常^[1], 提示这类小的核酸分子可能发挥类似癌基因或抑癌基因的作用, 参与人类肿瘤的发生、发展^[2]。人类基因组中已发现 300 多种 miRNA, 而且预测在人体中实际数目会更多^[3-4], 它们可能会对人类基因组中近 30% 的基因发挥调控作用^[5]。但关于 miRNA 的表达模式、生物学功能、作用机制等目前认识还不是十分清楚。因此, 了解肿瘤细胞 miRNA 的表达水平, 可认识 miRNA 在细胞中的生物学行为以及 miRNA 与肿瘤的关系。本实验设计并制备了 miRNA 表达谱的寡核苷酸芯片, 利用其快速、平行、高通量的检测特点, 分析了 6 种不同器官肿瘤细胞系中 206 个 miRNA 的表达特点, 为进一步研究 miRNA 的生理功能以及 miRNA 与肿瘤的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系

实验中所用 6 种人类肿瘤细胞系, 均为本实验室保存, 分别为 HeLa(人宫颈癌上皮细胞)、K562(人慢性髓细胞性白血病细胞)、ES-2(人卵巢透明细胞癌)、MCF-7(人乳腺癌细胞)、HT-29(人结肠腺癌细胞)、A549(人肺腺癌细胞)。所有细胞系均在 5% CO₂ 条件下, 用含有 10% 胎牛血清的适合培养液培养。

1.2 miRNA 芯片的制备

所用的 210 个寡核苷酸探针为 mirVana™ miRNA Probe Set 试剂盒(Ambion), 其中 206 个与已知的人类和小鼠 miRNA 序列互补, 4 个为阳性对照。3 × SSC 点样缓冲液溶解探针至 50 μmol/L, 用 SpotArray™24 基因芯片点样仪(PerkinElmer)印制于 SuperChip™ I(PerkinElmer)玻片表面, 制成 miRNA 寡核苷酸芯片。每次杂交前进行水合、干燥等点样后处理。

1.3 miRNA 的准备、标记与杂交

依照 mirVana™ miRNA Isolation Kit(Ambion)说明书提取了肿瘤细胞的富集 miRNA。用 Universal Microplate Spectrophotometer(Bio-tek)紫外分析仪测定 miRNA 浓度和纯度, 8 mol/L 尿素变性的 15% 聚丙烯酰胺凝胶检测质量。依照说明书对富集 miRNA 进行荧光标记、杂交。

1.4 芯片图像的采集与数据处理

采用 ScanArray™ Express 1.0(PerkinElmer)扫描仪进行扫描, 扫描强度为 100%, 光电倍增管(PMT)增益为 80%, 扫描精度为 10 μm。扫描所得图像经 ScanArray 3.0(PerkinElmer)软件进行处理分析。数据经总体归一化和对数转化后用 Cluster 3.0(Stanford University)进行聚类分析。

1.5 Northern blotting 验证 miR-17-5p 的表达

分别提取 6 种肿瘤细胞总 RNA 各 100 μg, 用 8 mol/L 尿素变性的 15% 聚丙烯酰胺凝胶分离, 并用半干式转移系统转移至 BrightStar®-Plus(Ambion)尼龙膜, 紫外交联固定。预杂交后, 加入 [γ-³²P]ATP 标记的探针, 42 °C 杂交 24 h。经洗膜、曝光与放射自显影后观察。所用的寡核苷酸探针为: 5'-ACTACCTGCACTGTAAGCACTTTG-3'(miR-17-5p); 5'-CTCGCTTCGGCAGCAGCACA-3'(U6)。此实验重复 2 次。

1.6 RT-PCR 验证 miR-17-5p、miR-21 的表达

分别取 6 种肿瘤细胞总 RNA 各 5 μg, 用与 miRNA 前体互补的特异性引物 5'-CCATAATGCTACAAGTGCC-3'(miR-17-5p); 5'-CAGCCCATCGACTGGTG-3'(miR-21); 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'(U6)和逆转录酶 Superscript III(invitrogen)进行逆转录反应。分别取 1 μl 逆转录产物, 进行 PCR 反应扩增两个 miRNA 的前体。引物分别为: miR-17-5p: 5'-TGTCAAAGTGCTTACAGTG -3', 5'-CCATAATGCTACAAGTGCC-3'; miR-21: 5'-GCTTATCAGACTGATGTTGACTG-3', 5'-CAGCCCATCGACTGGTG-3'; U6: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCGT-3'。15% 非变性聚丙烯酰胺凝胶验证扩增产物大小, LabWorks 4.0 Image Acquisition and Analysis Software 软件进行定量及数据处理。相同条件下重复实验 3 次。

2 结果

2.1 6 种肿瘤细胞的 miRNA 抽提和纯化

6 种肿瘤细胞提取富集 miRNA 的 D_{260}/D_{280} 值均在 1.8 ~ 2.1 范围内, 符合 miRNA 芯片检测要求。

2.2 基因芯片杂交结果

纯化、标记的 6 种肿瘤细胞 miRNA 和芯片杂交, 用扫描仪在 543 nm 通道处对芯片进行扫描, 得到图像, 应用 Scanarray 3.0 软件分析 miRNA 在 6 种肿瘤细胞中的表达水平。存在差异的判断标准为:

(1)相互比较的各信号荧光强度值相差至少大于1 000;(2)若其中有信号强度值小于100,则同一种miRNA在不同细胞的荧光值差异需大于500。对数据进行整体归一化处理,经比较发现91个miRNA在6种细胞间没有明显差异,115个miRNA存在差异(表1,图1)。*miR-21*在6种肿瘤细胞中校正信号强度/背景强度均大于2倍,表达水平均较高;*miR-17-5p*和*miR-20a*的在6种肿瘤细胞中的表达情况相似;在ES-2细胞中校正信号强度/背景强度大于10倍,表达较高;*miR-126*与*miR-128a*和*miR-151*、*miR-145*与*miR-297-1*在HeLa和MCF-7细胞中的表达水平类似。

表1 6种肿瘤细胞中miRNA表达的差异

Tab. 1 Difference of miRNA expression in 6 cancer cell lines

Sanger ID*	Name of miRNA	HT-29	K562	HeLa	MCF-7	A549	ES-2
MI0000060	<i>Let-7a-1</i>	-	±	+	-	+	++
MI0000063	<i>Let-7b</i>	-	-	±	-	±	++
MI0000064	<i>Let-7c</i>	-	-	-	-	±	++
MI0000067	<i>Let-7f-1</i>	±	-	-	±	++	-
MI0000077	<i>miR-21</i>	+	+	+	+	+++	+++
MI0000446	<i>miR-125b-1</i>	-	-	-	-	-	±
MI0000071	<i>miR-17-5p</i>	-	-	-	-	±	+++
MI0000076	<i>miR-20a</i>	-	-	±	-	+	++
MI0000471	<i>miR-126</i>	±	-	-	±	±	-
MI0000447	<i>miR-128a</i>	-	-	-	-	±	-
MI0000461	<i>mR-145</i>	±	±	+	±	+	-
MI0000809	<i>miR-151</i>	-	-	±	-	-	-

Signal intensity/background intensity: “-”: <1 time; “±”: 1~2 times; “+”: 2~5 times; “++”: 5~10 times; “+++”: >10 times. *:http: microrna. sanger. ac. uk/

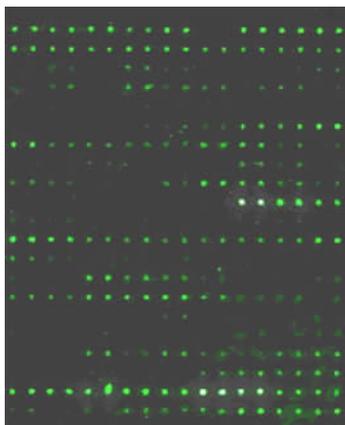


图1 ES-2细胞miRNA芯片杂交后的扫描图像

Fig.1 Scanning image of array after hybridization

Scan power: 100%; PMT: 80%; Scan precision: 10 μm

2.3 6种肿瘤细胞miRNA表达的聚类分析结果

扫描得到的杂交后图像用ScanArray 3.0 (PerkinElmer)软件进行处理,所得数据经归一化和对数转换后用Cluster3.0(Stanford University)进行聚类分析。分析可见,MCF-7和HeLa两类细胞miRNA的表达谱聚为一类(图2)。

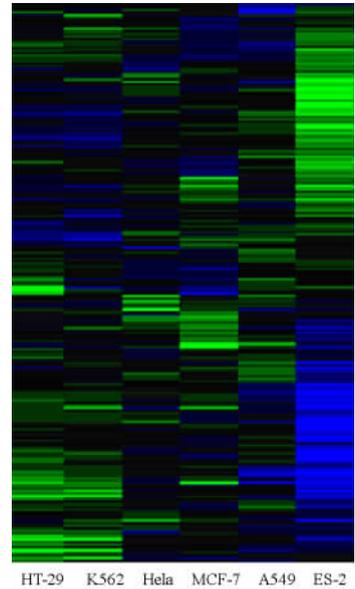


图2 6种肿瘤细胞miRNA表达谱聚类分析结果

Fig.2 Cluster analysis of miRNA in 6 cell lines

Green: Regylation-down; Red: Regulation-up

2.4 Northern blotting检测miR-17-5p在6种细胞中的表达差异

Northern blotting可以检测总RNA中70~80 nt的前体miRNA(pre-miRNA)和18~26 nt的成熟miRNA。2次重复实验所得结果相近。发现*miR-17-5p*及其前体在K562细胞中均见表达;A549和ES-2细胞中只见较弱的前体表达,而未见成熟miRNA的表达;MCF-7、HeLa和HT-29中可见明显的前体和较弱成熟的miRNA的表达(图3)。Northern blotting检测结果与芯片检测结果基本一致。

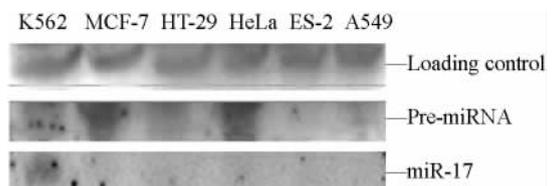


图3 Northern blotting检测miR-17-5p在6种细胞的表达

Fig.3 Detection of miR-17-5p expression in

6 cancer cell lines by Northern blotting

2.5 RT-PCR 检测 *miR-17-5p*、*miR-21* 在 6 种肿瘤细胞中的表达差异

用特异性引物对 *miR-17-5p*、*miR-21* 前体进行扩增,同时以 *U6* 作为内参,3 次重复试验结果相同。各细胞中 miRNA 前体的表达水平经内参校正发现,*miR-17-5p* 前体在 K562 细胞中表达水平高于其他几种细胞,在 ES-2 细胞中的表达量低于 K562 细胞,同时高于另外 4 种细胞。*miR-21* 在 6 种肿瘤细胞中表达水平均较高,在 A549 细胞中表达最高(图 4)。表达差异情况与芯片检测结果大致相似。

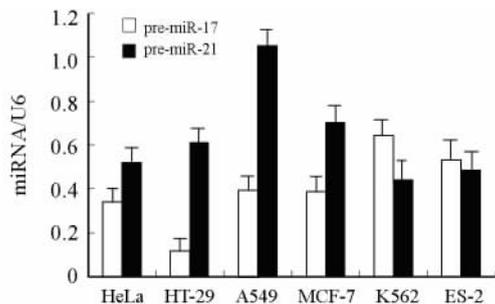


图 4 RT-PCR 检测 pre-miRNA 在 6 种肿瘤细胞的表达

Fig. 4 Expression of pre-miRNA in 6 cancer cell lines by RT-PCR

3 讨论

microRNA 是一类在线虫、植物、昆虫和哺乳动物中存在的小 RNA 分子,它们通过与靶 mRNA 的 3'-UTR(3'-untranslated region)互补,将 mRNA 剪切或是抑制其翻译^[5-6],在调控基因表达和肿瘤的发生发展中发挥重要作用。理解 miRNA 的作用,关键是要知道 miRNA 的表达模式。本实验利用生物芯片的高通量、高敏感性的特点,用荧光标记的 miRNA 直接与 miRNA 检测芯片杂交,发现不同肿瘤细胞中 miRNA 的表达存在明显差异。

大量的总 RNA 中,miRNA 所占的比例极少(约为 0.01%)^[7]。为了验证芯片的检测结果是否可以反映 miRNA 在总 RNA 中的量,本研究用 Northern blotting 和 RT-PCR 的方法对芯片杂交检测结果进行验证。在多数结果一致的情况下,还发现 Northern blotting 和 RT-PCR 的方法均检测到 K562 细胞中 *miR-17-5p* 的高表达,而微阵列中却显示在 K562 细胞中表达水平较低。这可能是由于:(1) K562 细胞前体 miRNA 和成熟 miRNA 表达量都非常高,虽然标记反应没有对 pre-miRNA 进行荧光标记,但杂交过程中大量的 pre-miRNA 仍可能和相对较少的成

熟 miRNA 竞争,影响了荧光标记的成熟 miRNA 与探针的结合,掩盖了 K562 中 *miR-17-5p* 信号;(2) 也可能实验过程中存在系统误差,这种情况在普通的生物芯片技术中也存在。因此除了要在芯片实验过程中尽量减少人为干扰和进一步改进实验技术减少系统误差,在对某一 miRNA 进行深入研究之前用其他方法验证基因芯片结果是有必要的。

实验中检测到 *miR-21* 在 6 种肿瘤细胞中的表达水平均较高,这与文献报道的 *miR-21* 在 70% 的肺癌和 70% 的结直肠癌患者中表达上调一致。Chan 等^[8]发现 *miR-21* 在胶质瘤中过表达,而且可能发挥了抗凋亡因子的作用。Iorio 等^[9]也发现 *miR-21* 在乳腺癌中表达明显上调,而且在一定程度上可以显示肿瘤的恶性程度。这些都提示 *miR-21* 在肿瘤的发生发展中可能发挥原癌基因样作用。

本实验中还发现 *miR-125b* 和 *let-7* 的不同亚型在 6 种细胞中表达水平较低。*miR-125b* 位于染色体 11q23-24,这一区域是人类乳腺、卵巢和肺部肿瘤中染色体缺失频率最高的区域之一。到目前为止,还没有在这一区域找到真正参与肿瘤发生的相关基因。这提示 *miR-125b* 的缺乏可能会造成肿瘤细胞分化能力的降低。*Let-7* 是最早发现的 miRNA 之一,与人类许多肿瘤相关基因互补^[10],已有很多研究证实 *Let-7* 和肿瘤的发生、发展存在密切的相关性。例如 Johnson 等^[11]发现,*let-7* 在两种人类肿瘤细胞系 HeLa、HepG2 中对 *RAS* 基因进行负性调节,而且首先用计算机的方法识别出 *Let-7* 的靶基因:人类 *KRAS*、*HRAS* 和 *NRAS*。Calin 等^[10]证实 *let-7* 家族成员定位于各种与肿瘤发生关系密切的染色体。Johnson 等^[11]通过提高肺癌细胞系中 *let-7* 量,发现 *RAS* 蛋白的表达降低;而抑制 *let-7*,*RAS* 蛋白的表达升高,细胞异常增殖。

O'Donnell 等^[12]通过染色质免疫沉淀实验发现 *c-Myc* 可直接与 *miR-17-5p* 集簇位点结合,激活其表达。同时还发现 *miR-17-5p* 对 *c-Myc* 的靶基因 *E2F1* 发挥负性调节作用,构成了 *c-Myc:miR-17-5p:E2F1* 调控途径。文献^[13]报道 *miR-17-5p* 与 *miR-20a* 及其他 4 种 miRNA 成集簇存在于人类第 13 号染色体上。本实验中检测到 *miR-17-5p* 及其集簇中 *miR-20a* 在 ES-2 细胞中表达明显高于其他 5 种细胞,是否提示这两种 miRNA 是乳腺透明细胞癌的特异性表达,有待深入探讨。

MCF-7 和 HeLa 分别来源于人类乳腺和宫颈,它们发育起源类似,共同起源于胚胎内胚层,而且均是上皮组织来源。MCF-7 和 HeLa 两类细胞 miRNA

的表达谱聚为一类,提示在哺乳动物体内特殊的 miRNA 可能参与维持胚胎早期发生过程中的多潜能细胞状态^[14],在器官和组织的发育、形成中发挥重要调控作用^[15],而且可能会影响某器官中细胞或组织类型的建立和维持。两类肿瘤的发生均和女性雌激素水平相关,这些 miRNA 表达特点提示应该对 miRNA 是否参与两类肿瘤的发生或这两个组织的发育作更进一步的研究。

上述实验结果支持了在不同肿瘤细胞中 miRNA 的表达水平可能存在差异的假设,并且这类小分子可能通过发挥类似癌基因或抑癌基因样作用参与肿瘤的发生发展。因此,监控细胞 miRNA 的表达水平,可以更好地了解这类小核酸分子的功能及作用机制;同时从一个全新的角度认识肿瘤,为寻找新的攻克肿瘤的方法提供线索。生物芯片中的寡核苷酸探针可以随着 miRNA 的发现而不断扩展,更可为分析其他疾病状态与正常状态时 miRNA 的表达提供一个极具潜力的工具。

[参 考 文 献]

- [1] 马卓娅,汤华. microRNA 与肿瘤[J]. 生命的化学, 2006, 26 (1): 2-5.
- [2] Bartel DP. microRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs[J]. Nat Genet, 2005, 37(7): 766-770.
- [4] Berezikov E, Guryev V, van de B, et al. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes[J]. Cell, 2005, 120(1): 21-24.
- [5] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often

flanked by adenines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120 (1): 15 -20.

- [6] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing[J]. Cell, 2005, 123(4): 631-640.
- [7] Shingara J, Keiger K, Shelton J, et al. An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling[J]. RNA, 2005, 11(9): 1461-1470.
- [8] Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65 (14): 6029-6033.
- [9] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65 (16): 7065-7070.
- [10] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 2999-3004.
- [11] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. Cell, 2005, 120(5): 635-647.
- [12] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, et al. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression[J]. Nature, 2005, 435 (7043): 745-746.
- [13] Ota A, Tagawa H, Kaman S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13 or f25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 3087-3095.
- [14] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs[J]. Dev Cell, 2003, 5(2): 351-358.
- [15] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12 (9): 735-739.
- [收稿日期] 2006 - 12 - 30 [修回日期] 2007 - 04 - 30
- [本文编辑] 韩丹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- (1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori*。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 *FMR1*、原癌基因 *RAF1*(人)、病毒癌基因 *v-raf-1*(鼠)、抑癌基因 *p53*(鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* H I、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数 \bar{x} 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L*、面积 *A*(或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M_r*、物质的量浓度 *c_B* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*- 等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)