

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2017.08.002

· 研究快报 ·

组成活化型 Rac1 GTP酶通过上调促血小板生成素受体的表达促进白血病细胞的静息

李欢, 王继英, 于沛, 陈树英, 邢海燕, 田征, 唐克晶, 王敏, 饶青(中国医学科学院 北京协和医学院血液学研究所 血液病医院 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘要] **目的:** 研究 Rac1 GTP酶的活化对白血病细胞静息的影响, 并探索其机制。 **方法:** 构建 Rac1 组成活化型慢病毒载体, 以此感染急性髓系白血病 KG-1a 细胞, 比较感染了组成活化型 Rac1 的 KG-1a (Rac1-V12-KG-1a) 细胞和感染空载体的 KG-1a (pCDH-KG-1a) 细胞在 G0 期的比例差异。以 Rac1 特异性抑制剂 NSC23766 处理感染后 KG-1a 细胞, 4 d 后检测两组细胞 G0 期比例的变化。实时定量 PCR 检测两组细胞中与细胞周期和细胞静息相关分子的表达。流式细胞术检测小鼠 Rac1 GTP酶高度活化的 AML1-ETO9a 白血病细胞模型中促血小板生成素受体 (myeloproliferative leukemia MPL) 和 MPL⁺ 细胞群在 G0 期的比例。 **结果:** 感染了组成活化型 Rac1 的 Rac1-V12-KG-1a 细胞的 G0 期细胞比例显著高于感染空载体的 pCDH-KG-1a 细胞的比例 [(15.30±0.60)% vs (11.50±0.17)%, $P<0.05$]; 抑制剂处理 KG-1a 细胞后, 随着抑制剂浓度的增加 G0 期细胞比例显著下降 ($P<0.05$)。实时定量 PCR 检测结果显示, 周期抑制因子 *P21*、*P27*、*P57* 的 mRNA 表达水平在 Rac1-V12-KG-1a 细胞表达均有不同程度的上调, 静息相关调节分子 *N-Cadherin* 和 *MPL* mRNA 表达水平均显著升高 ($P<0.05$); 流式检测结果显示, MPL⁺ 白血病细胞群的比例在 G0 期显著高于 MPL⁻ 组 [(40.3±3.5)% vs (19.05±7.65)%, $P<0.05$]。 **结论:** 白血病细胞中 Rac1 GTP酶的活化通过上调 MPL 等细胞外在调节因子的表达增加休眠期细胞的比例, 从而促进白血病细胞维持静息状态。

[关键词] Rac1 GTP酶; 白血病细胞; 静息; 促血小板生成素受体; 微环境

[中图分类号] R733.7; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0828-05

Constitutively active Rac1 GTPase confers leukemia cells quiescence through upregulating myeloproliferative leukemia

LI Huan, WANG Jiying, YU Pei, CHEN Shuying, XING Haiyan, TIAN Zheng, TANG Kejing, WANG Min, RAO Qing (State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Blood Disease Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the role of Rac1 GTPase activation in the regulation of leukemia cell quiescence and investigate the possible mechanism. **Methods:** Constitutively active Rac1 lenti-virus vector was constructed to transfect KG-1a leukemia cells (Rac1-V12-KG-1a). The G0 phase cell ratio in sorted Rac1-V12-KG-1a and KG-1a cells transfected with empty vector (pCDH-KG-1a) was compared. Furthermore, after 4 days treatment with NSC23766, the Rac1-specific inhibitor, the G0 phase cell ratio in KG-1a cells was also detected. The expression levels of cell quiescence and cell cycle associated moleculars were then determined by RT-PCR. The G0 phase cell ratio of MPL⁻ and MPL⁺ leukemia cells in AML1-ETO9a leukemia mouse was detected by flow cytometry. **Results:** The results showed that the G0 phase cell ratio in Rac1-V12-KG-1a cells was significantly higher than that in pCDH-KG-1a cells [(15.30±0.60)% vs [11.50±0.17]%, $P<0.05$). After the treatment of Rac1-specific inhibitor, the G0 phase cell ratio of the KG-1a cells was decreased significantly ($P<0.05$), and the effect was concentration dependent. RT-PCR showed that mRNA transcription levels of cell cycle related factors (*P21*, *P27*, *P57*) were up-regulated in Rac1-V12-KG-1a cells at different level; moreover, the expressions of *N-Cadherin* and *MPL* were also significantly higher in Rac1-V12-KG-1a cells ($P<0.05$). Flow cytometry analysis showed that the percentage of G0 phase

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81370599)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81370599)

[作者简介] 李欢(1990-), 女, 博士生, 主要从事白血病微环境研究, E-mail: lihuanyao@126.com

[通信作者] 饶青(RAO Qing, corresponding author), 硕士, 研究员, 主要从事肿瘤微环境方面的研究, E-mail: raoqing@ihcams.ac.cn

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.1054.014.html>

MPL⁺ leukemia cells was significantly higher than that of MPL⁻ leukemia cells ([40.3±3.5]% vs [19.05±7.65]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** Activation of Rac1 GTPase could increase the ratio of leukemia cells at G0 phase, and promote leukemia cells quiescence by up-regulating MPL.

[Key words] Rac1 GTPase; leukemia cell; quiescence; myeloproliferative leukemia (MPL); microenvironment

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 828-832. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.002]

Rac蛋白是Rho GTP酶中的重要成员,能够调节造血干细胞与骨髓微环境的相互作用,对造血干细胞在骨髓中的迁移具有重要作用^[1-3]。与造血干细胞相似,白血病干细胞存在于微环境系统中,微环境能够调节白血病干细胞的静息和维持造血干细胞的自我更新能力^[4-5],这也间接影响了白血病干细胞在骨髓微环境中的存活能力及其对化疗药物的抗药性^[6-8]。白血病干细胞静息状态是白血病干细胞的重要特征,也是其抵抗化疗药物的主要机制之一。本课题组前期研究^[9-12]发现,Rac1在白血病患者中高表达,而Rac1 GTP酶的活化与白血病细胞的迁移、自我更新、抵抗凋亡相关。为确定Rac1是否通过调节白血病细胞的静息来影响细胞对化疗药物的抵抗,本研究采用负载持续活化型突变体Rac1-V12的慢病毒表达载体感染或Rac1抑制剂NSC23766处理急性髓系白血病细胞系KG-1a后,观察细胞静息程度的变化,并分析其可能的分子机制,尤其观察造血干细胞静息相关分子促血小板生成素受体(myeloproliferative leukemia, MPL)在其间所起的作用,为探讨临床白血病化疗药物抵抗的作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

KG-1a及293T细胞为本实验室液氮保存。KG-1a细胞使用含有10%胎牛血清RPMI 1640培养液、293T细胞使用含有10%胎牛血清的DMEM培养液,培养于37℃、5% CO₂培养箱中。AML1-ETO9a小鼠白血病模型由本实验室构建。Rac1的抑制剂NSC23766为Calbiochem公司的产品。Anti-Rac1的抗体为BD Biosciences (San Jose, CA)公司的产品,PE-anti-Ki-67、7-AAD为Biolegend公司产品。

1.2 持续活化型Rac1-V12慢病毒感染KG-1a细胞

用含10%小牛血清、1%双抗的1640培养基培养KG-1a细胞。持续活化型突变体Rac1-V12的慢病毒表达载体pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Rac1-V12为本实验室构建^[10],利用293T包装的病毒感染处于对数生长期的KG-1a细胞,感染72 h后流式分选出GFP⁺的KG-1a细胞,GST-pull down实验检测Rac1-GTP酶活化水平。

1.3 GST-pull down实验检测Rac1-GTP酶活化水平

细胞裂解液冰上裂解细胞30 min,4℃、12 000×g,离心5 min,将细胞裂解液转移至新EP管内,加入glutathion-Sepharose GST-融合蛋白,4℃孵育1 h,结束后用GST-Fish缓冲液洗3次,4℃、2 000×g离心3 min,GST-Fish缓冲液重悬,加入4×的蛋白上样缓冲液,进行蛋白质凝胶电泳。

1.4 流式细胞仪检测细胞G0期比例

收集感染后的细胞约1×10⁶个细胞,用无菌PBS洗涤2次,弃上清,用500 μl PBS重悬,加入5 μl 7-AAD(1 mg/ml),室温避光孵育20 min,250×g离心5 min,保留100 μl上清,加入5 μl Ki-67-PE抗体,室温避光孵育30 min,加入1 ml PBS,250×g离心5 min,弃上清,用0.5 ml PBS重悬细胞,加入5 μl 7-AAD(1 mg/ml),置于冰上,避光静置10 min,进行流式细胞仪检测。

1.5 实时定量PCR检测细胞周期和细胞静息相关调节分子mRNA的表达

提取细胞的总RNA并逆转录为cDNA作为实时定量PCR的模板。实时定量PCR反应体系包括:2×SYBR Premix Ex Taq 10 μl,Rox Dye II 0.4 μl,上下游引物各0.4 μl,cDNA 2 μl,补水至总体积20 μl。反应的条件:90℃预变性10 s,90℃变性5 s,60℃退火40 s;40个循环。*GAPDH*正向引物序列为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3',反向为5'-GAA-GATGGTGATGGGATTTC-3';*p21*正向引物序列为5'- tccagegaccttctcatcca- 3',反向为5'- TC-CATAGCCTCTACTGCCACCAT-3';*p27*正向引物序列为5'- cctcccttccaccgccatattg- 3',反向为5'-AACCCAGCCGCTCTCCAAAC-3';*p57*正向引物序列为5'-CGCTTTCGCTGTCTCTCTTAT-3',反向为5'-AGTGGTACAGACGGCTCAGGAA-3';*Tie-2*正向引物序列为5'-TGCTTGGACCCCTTAGTGA-3',反向为5'-CCTTGTAACGGATAGTAATAGA-3';*MPL*正向引物序列为5'-CCCATAGAGTTGTGACGAG-3',反向为5'-AAATCATGTTTCCTTCCCT-3';*N-Cadherin*正向引物序列为5'-CGGTGCCATCATTGCCATCCT-3',反向为5'-AGTCATAGTCCTGGTCTTCTTCTCCT-3'。

1.6 统计学处理

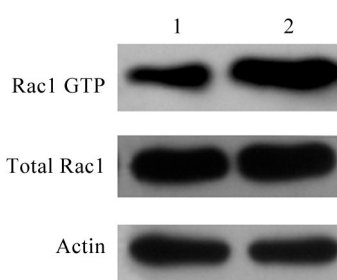
采用SPSS 12.0统计学软件,两配对均数比较进行配对*t*检验,多组均数比较进行单因素方差分析,

以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组慢病毒感染后 KG-1a 细胞 Rac1 GTP 酶的活性

构建持续活化型突变体 Rac1-V12 的慢病毒表达载体, 包装病毒后将其感染 KG-1a 细胞, GST-pull down 检测感染细胞中 Rac1 GTP 酶的表达活性, 结果(图 1)表明, Rac1-V12-KG-1a 细胞中 Rac1-GTP 酶的活化水平是 pCDH-KG-1a 细胞的 2.97 倍, 与 pCDH-KG-1a 细胞相比, Rac1-V12-KG-1a 细胞的 Rac1-GTP 酶处于高度活化状态。



1: pCDH-KG-1a; 2: Rac1-V12-KG-1a

图 1 感染后 KG-1a 细胞 Rac1 GTP 蛋白的表达

Fig. 1 Expression of Rac1 GTP protein in KG-1a cells after transfection

2.2 Rac1 GTP 酶的活化对细胞静息的作用

筛选出高表达 Rac1 GTP 酶的 KG-1a 细胞后, 检测 Rac1-V12-KG-1a 细胞和 pCDH-KG-1a 细胞在 G0 期细胞比例。实验结果(图 2)显示, Rac1-V12-KG-1a 细胞的 G0 期细胞比例为 $(15.30 \pm 0.60)\%$, 而 pCDH-KG-1a 细胞的 G0 期细胞比例为 $(11.50 \pm 0.17)\%$, Rac1-V12-KG-1a 细胞的 G0 期细胞比例显著高于 pCDH-KG-1a 细胞 ($P < 0.05$)。

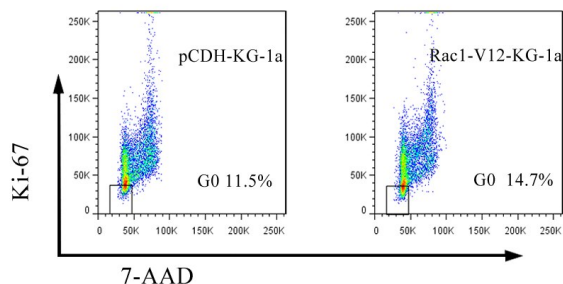


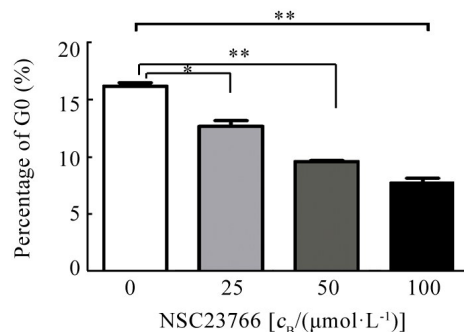
图 2 KG-1a 细胞 G0 期的比例

Fig. 2 Percentage of KG-1a cells in the G0 phase

2.3 Rac1 GTP 酶抑制剂 NSC23766 对细胞 G0 期的影响

2.2 中结果显示, Rac1 GTP 酶的活化能够提高静息的白血病细胞比例, 为验证此作用, 用 0、25、50、

100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rac1 特异性抑制剂 NSC23766 处理 KG-1a 细胞 4 d, 然后检测各组细胞 G0 期比例变化。结果(图 3)显示, 随着 Rac1 抑制剂浓度的上升, KG-1a 细胞在 G0 期比例也随之下降, 从 16% 下降到 8% 左右 ($P < 0.01$)。结果表明, 用 Rac1 特异性抑制剂 NSC23766 抑制 Rac1 的活性, 能够降低白血病细胞的 G0 期细胞比例, 验证了前面的实验结果。



** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

图 3 Rac1 抑制剂 NSC23766 处理后 KG-1a 细胞 G0 期的比例

Fig. 3 Percentage of KG-1a cells in the G0 phase after treatment of Rac1 inhibitor NSC23766

2.4 Rac1 GTP 酶的活化对 G0 期相关基因的影响

对重要的细胞周期抑制分子 *p21*、*p27*、*p57* mRNA 表达进行检测, 结果(图 4A)发现, 与空载体相比, 所检测的周期抑制分子在 Rac1-V12-KG-1a 细胞中表达均有不同程度的升高 ($P > 0.05$)。进一步对微环境相关的调节造血干细胞静息的细胞表面分子 *N-Cadherin*、*Tie-2* 和 *MPL* 的 mRNA 表达进行了检测, 结果显示, *N-Cadherin* 和 *MPL* 高表达于 pCDH-KG-1a 细胞中 ($P < 0.05$), *Tie2* mRNA 表达高于 Rac1-V12-KG-1a 细胞中的表达, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 活化的 Rac1 GTP 酶通过上调 MPL 的表达调节白血病细胞的静息水平

目前认为 MPL 与其配体是调节造血干细胞的静息的重要分子, 为了探讨活化的 Rac1 GTP 酶是否通过上调 MPL 调节白血病细胞的静息, 进一步以 Rac1 GTP 酶高度活化的 AML1-ETO9a 小鼠白血病细胞为研究对象, 检测分选出的 MPL^+ 和 MPL^- 白血病细胞的 G0 期比例。实验结果(图 5)发现, MPL^+ 白血病细胞 G0 期细胞比例为 $(40.3 \pm 3.5)\%$, 显著高于 MPL^- 细胞群的 $(19.05 \pm 7.65)\%$ ($P < 0.05$), 表明 MPL 在白血病细胞的静息中起重要作用, 提示 MPL 介导了 Rac1 GTP 酶对白血病细胞静息的调节。

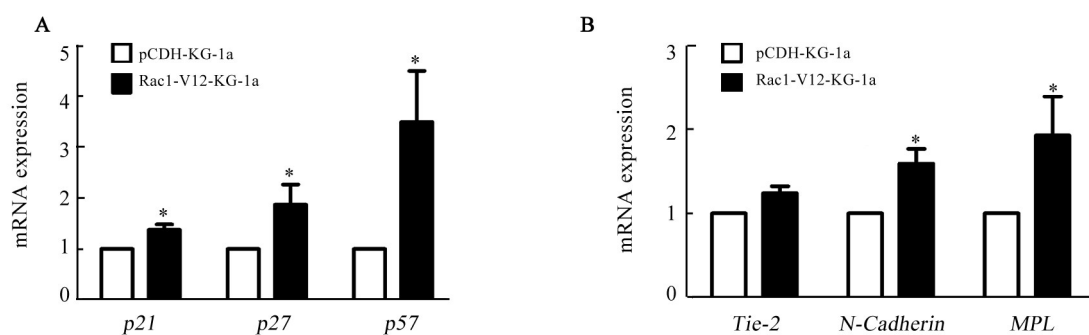
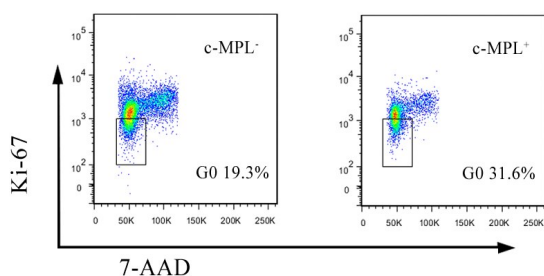
A: Expression levels of cell cycle regulator *p21*, *p27* and *p57* mRNAB: The mRNA levels of quiescence intrinsic regulator *N-cadherin*, *MPL* and *Tie-2* mRNA* $P < 0.05$ vs pCDH-KG-1a

图4 细胞周期和细胞静息相关调节分子的mRNA表达水平

Fig. 4 The mRNA levels of cell cycle inhibitors and quiescence intrinsic regulators

图5 MPL⁻和MPL⁺细胞G0期的比例Fig. 5 Percentage of MPL⁻ and MPL⁺ cells in the G0 phase

3 讨论

自我更新、多向分化和静息状态是正常造血干细胞的重要特征,其中静息状态是维持造血干细胞数量及造血干细胞池稳定的重要机制。由内皮细胞、成骨细胞、脂肪细胞等组成的造血微环境是造血干细胞赖以生存的场所,是维持造血干细胞静息必要的土壤,调节着造血干细胞的静息、增殖和分化。近年来研究发现,Rac1 GTP酶能够通过多种信号途径调节造血干细胞与骨髓微环境之间的相互作用,促进造血干细胞的迁移及黏附,从而调节造血干细胞在骨髓微环境中的定居及休眠的维持。

与造血干细胞相似,白血病干细胞也定居在微环境中,受到微环境中多种信号调节分子的调节。白血病干细胞通过与微环境相互作用维持其静息状态保持其自我更新的能力。处于休眠期的这类白血病细胞,对于化疗药物不敏感,化疗后一段时间会快速增殖,是导致白血病的复发的主要原因。本实验室前期研究^[9-12]发现,在白血病患者中,Rac1 GTP酶

高表达,并且发现Rac1 GTP酶的活化对于白血病细胞的迁移及抵抗凋亡具有重要作用。

为了进一步明确Rac1 GTP酶的活化介导的骨髓微环境与白血病细胞的相互作用是否调节白血病细胞静息,本研究通过在白血病细胞KG-1a中表达活化型Rac1 GTP酶,检测Rac1 GTP酶活化后细胞G0期的比例,以及用Rac1 GTP酶抑制剂处理KG-1a后检测G0期的比例变化。结果发现,Rac1 GTP酶的活化能够增加细胞G0期的比例,促进白血病干细胞的静息;当加入Rac1 GTP酶抑制剂后,随着Rac1 GTP酶抑制剂剂量的增加,处于G0期的比例呈浓度依赖性减少。实时定量PCR检测周期相关分子mRNA的表达,发现周期抑制分子*p21*、*p27*、*p57*表达水平均有升高。为了初步阐明Rac1 GTP酶的活化调节白血病细胞静息的机制,对调节造血干细胞静息相关的分子的表达进行检测,发现N-Cadherin和MPL表达显著上调。前期研究^[13]利用流式细胞术测定N-cadherin阳性和N-cadherin阴性细胞中G0期比例的差异,结果显示N-cadherin阳性的KG-1a细胞G0期比例高于N-cadherin阴性的细胞;诱导KG1a细胞进入细胞周期后,G0期细胞比例明显下降,KG-1a细胞对VP16的敏感性显著升高。在本研究中,进一步对白血病细胞MPL⁻和MPL⁺白血病细胞群的G0期比例进行检测,发现MPL⁺白血病细胞群的比例显著高于MPL⁻细胞群,提示MPL在白血病细胞静息中也起到重要作用。对Rac1-V12-AML1-ETO9a、AML1-ETO9a的小鼠白血病细胞以及Rac1抑制剂处理白血病细胞前后的MPL表达及与G0期的相关性做了分析,结果均显示MPL表达高,则G0期细胞比例高,提示MPL表达与G0期细胞比例具有一定的相关性。本课题将进一

步对白血病原代细胞中MPL表达与G0期细胞比例的相关性做深入研究。

综上,本实验的研究结果显示,Rac1 GTP酶的活化能够维持白血病细胞的静息状态,上调与微环境相关的黏附静息相关分子MPL等的表达,这可能是白血病干细胞对化疗药物的抗药能力增强的机制之一。

[参考文献]

- [1] WILLIAMS D A, ZHENG Y, CANCELAS J A. Rho GTPases and regulation of hematopoietic stem cell localization[J/OL]. *Methods Enzymol*, 2008, 439: 365-393[2017-03-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687907004272?via%20Iihub>. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)00427-2.
- [2] NGUYEN T M, ARTHUR A, ZANNETTINO A C, et al. EphA5 and EphA7 forward signaling enhances human hematopoietic stem and progenitor cell maintenance, migration, and adhesion via Rac1 activation[J/OL]. *Exp Hematol*, 2017, 48: 72-78[2017-03-10][http://www.exphem.org/article/S0301-472x\(16\)30768-8/fulltext](http://www.exphem.org/article/S0301-472x(16)30768-8/fulltext). DOI:10.1016/j.exphem.2016.12.001.
- [3] GU Y, FILIPPI M D, CANCELAS J A, et al. Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases[J]. *Science*, 2003, 302(5644): 445-459. DOI: 10.1126/science.1088485.
- [4] LANE S W, SCADDEN D T, GILLILAND D G. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities[J]. *Blood*, 2009, 114(6): 1150-1157. DOI:10.1182/blood-2009-01-202606.
- [5] SCHOFIELD R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 1978, 4(1/2): 7-25.
- [6] ISHIKAWA F, YOSHIDA S, SAITO Y, et al. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1315-1321. DOI:10.1038/nbt1350.
- [7] MATSUNAGA T, TAKEMOTO N, SATO T, et al. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia [J]. *Nat Med*, 2003, 9(9): 1158-1165. DOI:10.1038/nm909.
- [8] TABE Y, KONOPLEVA M. Role of microenvironment in resistance to therapy in AML[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2015, 10(2): 96-103. DOI:10.1007/s11899-015-0253-6.
- [9] WANG J, RAO Q, WANG M, et al. Overexpression of Rac1 in leukemia patients and its role in leukemia cell migration and growth [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(4): 769-774. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.125.
- [10] CHEN S, LI H, LI S, et al. Rac1 GTPase promotes interaction of hematopoietic stem/progenitor cell with niche and participates in leukemia initiation and maintenance in mouse[J]. *Stem Cells*, 2016, 34(7): 1730-1741. DOI:10.1002/stem.2348.
- [11] HINTERLEITNER C, HUELSENBECK J, HENNINGER C, et al. Rac1 signaling protects monocytic AML cells expressing the MLL-AF9 oncogene from caspase-mediated apoptotic death[J]. *Apoptosis*, 2013, 18(8): 963-979. DOI:10.1007/s10495-013-0842-6.
- [12] WANG J, Yu P, Chen S, et al. Activation of Rac1 GTPase promotes leukemia cell chemotherapy resistance, quiescence and niche interaction[J]. *Mol Oncol*, 2013, 7(5): 907-916. DOI:10.1016/j.molonc.2013.05.001.
- [13] YOSHIHARA H, ARAI F, HOSOKAWA K, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6): 685-697. DOI: 10.1016/j.stem.2007.10.020.
- [14] KOHLSCHNEEN S, WINTTERLE S, SCHWARZER A, et al. Inhibition of thrombopoietin/mpl signaling in adult hematopoiesis identifies new candidates for hematopoietic stem cell maintenance[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131866[2017-03-12]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/articles/PMC4493002>. DOI: 10.1371/journal.pone.0131866.
- [15] 何侃, 于沛, 邢海燕, 等. N-cadherin 阳性的 KG1a 细胞系在 G0 抵抗 VP16 杀伤中的作用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2011, 19(5): 1102-1106.

[收稿日期] 2017-02-10

[修回日期] 2017-05-23

[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* 等。(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的符号为 *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*(*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*、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 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)