

SINDBIS 病毒对宿主细胞基因表达的影响^{*}

王小忠 谢建新 许晓洁 梁凤霞 丁明孝

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘要 Sindbis 病毒(SBV)的感染能迅速地抑制宿主细胞的基因表达(mRNA 合成与蛋白质合成),但细胞 rRNA 的合成水平与正常细胞接近。同时 SBV 还诱导产生一种细胞特异的核基质结合蛋白 P105。用放线菌素 D 处理细胞,导致感染细胞中病毒结构蛋白的合成量及有感染力的子代病毒产量明显下降。实验结果不仅显示了 SBV 对宿主细胞基因表达的复杂调控关系,而且还表明 SBV 的非结构蛋白 nsP2 和衣壳蛋白 C 可能直接参与这一过程。

关键词 Sindbis 病毒,非结构蛋白,核基质,基因表达

病毒如何关闭宿主细胞的大分子合成进而完成自身的复制,这是一个非常复杂而又十分重要的课题。Sindbis virus(简称 SBV)是一种有囊膜的正链 RNA 病毒,作为披膜病毒科甲病毒属的代表种,近十年来人们对 Sindbis 病毒的繁殖过程进行了广泛而深入的研究^[1],从而使得 Sindbis 病毒成为研究上述问题的较理想的实验模式。Sindbis 病毒侵染宿主细胞能迅速关闭宿主细胞的基因表达,这早已为人们所认识,并已有的一些初步的研究^[2]。但由于早期的工作缺乏对病毒自身复制机制的了解,未能较深入地阐明病毒对细胞代谢合成的影响。为此,我们在研究 SBV 与宿主细胞关系的基础上^[3],从病毒对细胞 RNA 与蛋白质合成影响的角度探讨病毒对细胞基因表达的调控,并取得了一些有意义的结果。

1 材料和方法

1.1 细胞与病毒的培养

本实验所用 SBV 由美国华盛顿大学医学院 Milton Schlesinger 教授惠赠。培养细胞为 BHK-21 传代细胞系或鸡胚成纤维原代细胞。

将病毒接种于长成良好单层的细胞上,于 37℃ 感染 1 小时,病毒感染复数(m. o. i.) 为 100 PFU/细胞,然后加入含 2% 血清的维持液继续培养。

1.2 显微与电镜放射自显影

在病毒感染 1, 3, 5 和 7 小时后,分别用³H-尿嘧啶核苷(³H-U, 北京原子能研究所产品,比强 43.3Ci/ml)于 37℃ 脉冲标记 10 分钟。显微放射自显影的标记液中³H-U 的浓度为 4 μCi/ml。电镜放射自显影的标记液中的³H-U 浓度为 50 μCi/ml。标记后经洗涤,固定,并按常规方法制备光学显微镜和电子显微镜自显影样品^[4,5],曝光时间分别为 4℃ 曝光 3

• 高等学校博士学科点专项科研基金和国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 7 月 14 日收到。

天(光学显微镜)或45天(电子显微镜)。

1.3 细胞组分的分级分离

1.3.1 细胞核的分离:病毒感染3小时后,依据 Perann 等人的方法分离得到纯化的细胞核^[6]。细胞经匀浆,低速离心和低浓度 Triton X-100(0.1% W/V)作用等步骤制备细胞核,细胞破碎及核的纯度在相差显微镜下检测。

1.3.2 核仁的分离:参照 Muramatsu 的方法制备核仁样品^[7]。首先按方法 1.3.1 制备细胞核样品,然后将其悬浮于10倍原细胞体积的0.34 mol/L的蔗糖溶液中,轻微匀浆数次后,冰浴中用超声波破碎细胞核(时间:45—60秒;功率输出:200 W;频率:10或20kHz),然后将超声波破碎物加在等体积的蔗糖垫(0.88 mol/L 蔗糖内含0.05 mmol/L 的 $MgCl_2$)上,2200 g 离心15分钟,沉淀即为核仁。

1.3.3 核基质的分离:参照 Fey 等人的方法^[8]进一步抽提得到核基质组分。其主要步骤是:纯化的细胞核经含有0.5%(V/V) Triton X-100的CSK缓冲液(10 mmol/L PIPES, pH6.8, 100 mmol/L KCl, 300 mmol/L Sucrose, 3 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L PMSF)于4℃作用10分钟。离心沉淀物经DNase I(终浓度200 μg/ml)在室温消化30分钟然后向反应体系中加入2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 至终浓度为0.25 mol/L,于4℃作用5分钟,离心所得沉淀即为核基质组分。

1.4 蛋白质合成的分析

1.4.1 细胞的标记:在病毒感染后2,4,6小时,加入4 mol/L NaCl,使维持液中的NaCl终浓度为0.25 mol/L,于37℃培养30分钟,然后对细胞进行甲硫氨酸饥饿培养(于37℃培养10分钟),以消耗细胞代谢库中的甲硫氨酸。然后用终浓度为20 μCi/ml的³⁵S-甲硫氨酸(³⁵S-Met, NEN公司生产,比强1000 μCi/mmol)的标记液于37℃脉冲标记20分钟,并在含过量未标记的甲硫氨酸(1 mmol/L)培养基中追踪20分钟。

1.4.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和IEF-SDS双向电泳技术:SDS-PAGE依据 Laemmli 的方法^[9]进行,分离胶的凝胶浓度为10%。

IEF-SDS双向电泳依据 O'Farrell 的方法^[10]进行,其中 ampholine 的浓度为2%(pH3—9.5 : pH 5—7 为1 : 4)。

1.4.3 蛋白质免疫印迹分析(Western Blotting):电泳后按 Towbin 的方法^[11]进行电转移,将蛋白质转至硝酸纤维素膜(NC membrane)上,NC膜经3%的BSA封闭后,与兔抗nsP2抗体或抗SBV抗体在37℃反应3小时,再与生物素化的羊抗兔IgG二抗反应,最后用 avidin 偶联的碱性磷酸酯酶以BCIP和NBT为底物进行显色。本文实验中使用的兔抗SBV非结构蛋白抗体及抗SBV抗体由美国华盛顿大学医学院 Dr. C. M. Rice 和 Prof. M. Schlesinger 提供。

2 结果

2.1 SBV对细胞RNA合成的影响

2.1.1 病毒感染过程中细胞RNA合成的动态:在SBV感染BHK-21细胞后1—5小时,光学显微镜下可见到细胞在形态上没有明显的病变特征,病毒感染6小时后,细胞开始出现病变(cpe),感染后7小时,50—70%的细胞出现cpe,细胞圆缩,进入SBV感染的晚

期。

为了研究病毒感染后细胞 RNA 合成的状况,分别在病毒感染 1,3 和 5 小时后,用³H-U 对细胞进行脉冲标记,然后对标记细胞进行半定量显微放射自显影的研究(图版 I)。通过对细胞质,细胞核及核质和核仁内分布的银粒数进行统计(每个样品随机计数 50 个细胞),并对计数结果进行格兰布斯统计检验,结果表明在置信度为 0.01 的区间内上述统计数据是可靠的,据此绘出图 1。

图 1 的结果清楚地显示:随着细胞质内标记银粒数的增加,细胞核内标记银粒数迅速减少(图 1-1),即在病毒感染后 1 小时直至 5 小时,胞质中病毒 RNA 的合成明显增加(图 1-4),细胞 RNA 合成明显减少;病毒感染后 1 小时,细胞核内 RNA 的合成略有减少;感染后 3 小时,核内 RNA 的合成明显地被抑制,其合成量仅相当于对照细胞的 25%;感染 5 小时,核内 RNA 合成仅维持在很低的水平上。显然病毒对宿主细胞 RNA 合成的抑制与病毒 RNA 的大量合成是同步进行的。

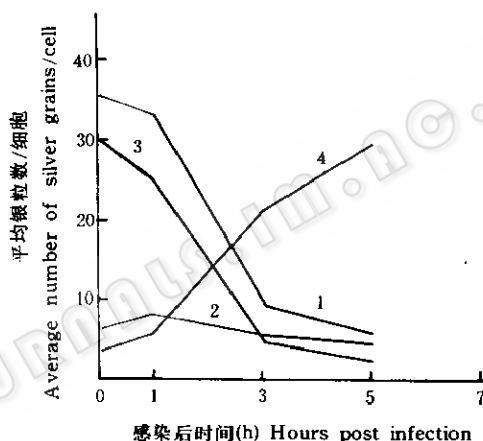


图 1 标记银粒在细胞不同部位的动态分布的统计图

对 SBV 感染 0,1,3 和 5 小时后,显微放射自显影的样品中细胞质(4),细胞核(1)及核质(3)和核仁(2)内分布的银粒数进行统计,每个时相随机计数 50 个细胞。

Fig. 1 Kinetic distribution of silver grains in the different cellular locations

At 1, 3, and 5 h postinfection, the cells were subjected to microscopic autoradiography. The numbers of grains in different cellular locations of each cell were counted and an average number of 50 cells at each time is shown in this figure. 1. Nucleus; 2. Nucleolus; 3. Nucleoplasm; 4. Cytoplasm.

进一步分析细胞核内银粒的分布,结果表明病毒感染对核质里 mRNA 的合成与核仁处 rRNA 的合成有着显著不同的影响,核质内 RNA 的合成被强烈地抑制,与细胞核的 RNA 合成抑制趋势一致(图 1-2);而核仁处 rRNA 合成始终看不出有明显的变化,几乎维持在同一水平上(图 1-3)。这一结果显示 SBV 对细胞 RNA 合成的影响主要体现在对 mRNA 合成的抑制作用。

电镜放射自显影的结果所显示的宿主细胞的 RNA 合成动态与显微放射自显影结果具有相同的趋势,且进一步显示出在 SBV 感染 7 小时的细胞中,核仁的超微结构保存完

好,细胞核内银粒主要标记在核仁的丝状区。这一结果表明,即使在 SBV 感染的晚期,细胞病变效应已经很明显,但在感染细胞内核仁结构依然完好地存在并活跃地转录 rRNA。

2.1.2 细胞 RNA 转录对病毒蛋白质合成及病毒滴度的影响:为了探讨 SBV 感染后 rRNA 持续合成对病毒复制的影响,病毒感染后用放线菌素 D(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理细胞,显微放射自显影的结果表明,放线菌素 D 能有效地抑制包括 rRNA 在内的细胞 RNA 的合成,但不抑制病毒 RNA 的合成。用³⁵S-甲硫氨酸脉冲标记和 SDS-PAGE 对病毒结构蛋白的合成进行了研究,发现病毒结构蛋白的合成也受到药物处理的影响,病毒的 3 种基本结构蛋白,衣壳蛋白(C)和囊膜蛋白(E1,E2)的合成量约为未加药物对照组细胞的 50%(图 2)。感染后 7 小时收集病毒并测定滴度,结果显示放线菌素 D 处理使得病毒的滴度由 $1 \times 10^9 \text{PFU}/\text{ml}$ 降至 $2 \times 10^7 \text{PFU}/\text{ml}$ 。

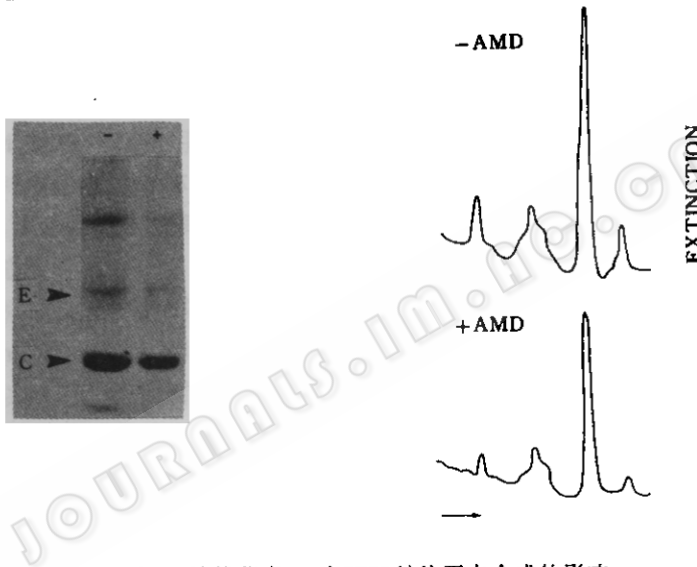


图 2 放线菌素 D 对 SBV 结构蛋白合成的影响

病毒感染 1 小时后,用放线菌素 D 处理细胞,在感染后 3 小时,加入³⁵S-甲硫氨酸进行脉冲标记,SDS-PAGE 及放射自显影分析,并对自显影结果进行扫描定量测定。“+”放线菌素 D 处理 BHK-21 细胞;“-”不用药物处理的细胞。

Fig. 2 Effect of actinomycin D on SBV structural protein synthesis

After virus adsorption for 1 h, the cells were subjected to actinomycin D treatment, at 3 h p. i., the cells were pulse-labeled with ³⁵S-methionine and the samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. And the relative amount of viral proteins were evaluated by densitometric tracing.

“+” Actinomycin D treated BHK-21 cells;“-” Untreated control cells.

2.1.3 SBV 的 nsP2 在核内积聚动态与病毒对细胞 mRNA 合成抑制相关:我们已有的工作表明,SBV 感染后 nsP2 能够特异性地进入宿主细胞核内^[12],在病毒感染后 1,3,5 小时,分别分离纯化等量的细胞核进行蛋白质免疫印迹分析,并用薄层扫描法分析 nsP2 相对含量。结果如图 3 所示。

在感染后 1 小时核内便可检测到少量的 nsP2,从感染后 1—5 小时,细胞核内 nsP2 含量持续增加。在感染后 1—3 小时,核内 nsP2 含量增加约 4 倍,而从感染后 3—5 小时仅增加 30%。这一结果表明病毒 nsP2 在核内的积聚主要发生在病毒感染的早期,且其积聚

动态在时态上与病毒对细胞 mRNA 合成的抑制作用(图 1-2)具有明显的相关性。

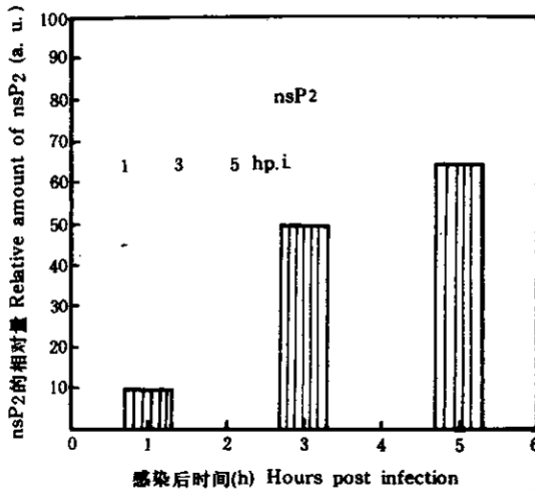


图 3 病毒感染过程中 nsP2 在核内的积累动态

在病毒感染后不同时间,分离得到细胞核组分,然后对等量样品进行 SDS-PAGE 及蛋白质免疫印迹分析,其中 nsP2 的相对含量通过光密度测定并以任意单位(a. u.)表示。

Fig. 3 Nuclear accumulation of nsP2 during the course of infection

At various times postinfection, the nuclear fractions were isolated from SBV-infected BHK cells. And the nuclear samples from equal amount of cells were analyzed by SDS-PAGE and western blotting. Amounts of nsP2 were quantitatively evaluated by reflection densitometric tracing and given in arbitrary unit (a. u.).

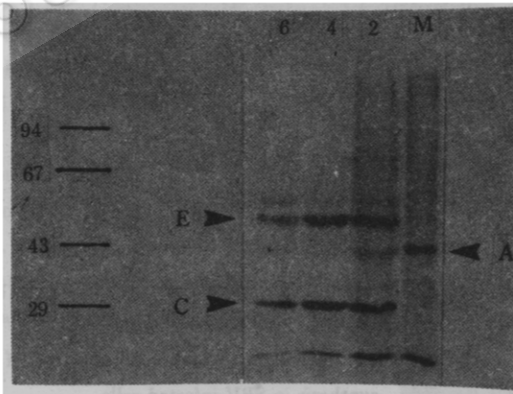


图 4 SBV 感染过程中蛋白质合成的动态

在病毒感染后不同时间,用³⁵S-Met 对细胞进行脉冲标计和追踪,然后进行 SDS-PAGE 及放射自显影分析。M. 未感染对照;2. 感染后 2 小时;4. 感染后 4 小时;6. 感染后 6 小时。

Fig. 4 Protein synthesis during the course of SBV infection

At various time postinfection, the cells were pulse-labeled with ³⁵S-Methionine and chased for 20 min, and then the cells were collected and subjected to SDS-PAGE and autoradiography. Lane M. Mock-infected control; Lane 2. 2 h p. i.; Lane 4. 4 h p. i.; Lane 6. 6 h p. i.

2.2 SBV 感染对细胞蛋白质合成的影响

2.2.1 病毒感染对细胞蛋白质合成的影响:在病毒感染后 2, 4, 6 小时用³⁵S-甲硫氨酸对细胞进行脉冲标记和追踪, 然后进行 SDS-PAGE 及放射自显影分析。结果(图 4)显示与不接病毒的对照细胞(lane M)相比, SBV 感染细胞后能够快速抑制宿主细胞的蛋白质合成, 感染后 2 小时, 细胞的蛋白质合成即受到抑制, 同时病毒蛋白也开始大量合成, SBV 的结构蛋白 E1 (~55 kD), E2 (~55 kD) 和 C 蛋白 (30 kD) 可以非常明显地显示(lane 2), 感染后 4 小时, 细胞的蛋白质合成即几乎全部被抑制, 病毒蛋白大量合成(lane 4), 而且这种趋势一直持续到病毒感染后 6 小时。

进一步用 IEF-SDS-PAGE 双向电泳分析上述样品可以更清楚地显示病毒感染对细胞蛋白质合成的抑制作用(图 5), 在对照细胞中细胞蛋白质大量合成(图 5a), 其中以 actin(A)的合成量最大; 到感染后 4 小时, 细胞内病毒蛋白(E 和 C)大量合成(图 5b), 几乎检测不到细胞蛋白的合成, 即使是对照细胞中大量合成的 actin 在感染后 4 小时合成量也已很少。

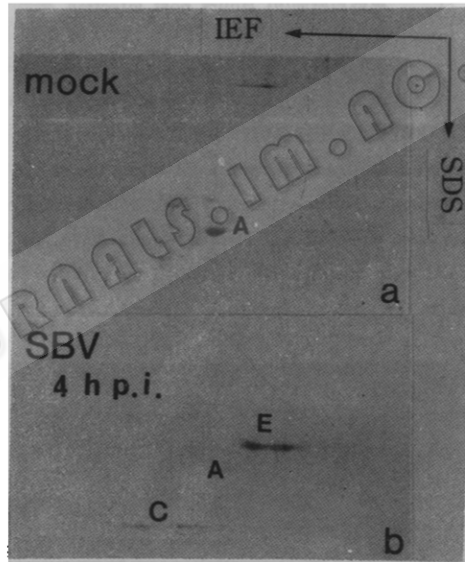


图 5 SBV 感染细胞中蛋白合成的 IEF-SDS-PAGE 双向电泳分析

a. 未感染对照; b. 感染 4 小时后。

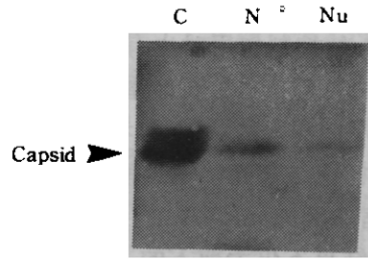
Fig. 5 IEF-SDS-PAGE two-dimensional electrophoresis analysis of protein synthesis in SBV-infected cells

a. Mock-infected control; b. 4 h p.i.

2.2.2 病毒衣壳蛋白在核仁的定位:在病毒感染早期(3 h p.i.), 分别制备细胞核, 核仁样品, 进行 SDS-PAGE 并用抗 SBV 的全抗进行免疫印迹反应。结果显示(图 6), 在细胞核(N)和核仁(Nu)组分中均有一定量的 C 蛋白存在。

图 6 蛋白质免疫印迹分析证实核仁组分中存在衣壳蛋白 C 病毒感染后, 分别制备得到细胞核组分, 核仁组分, 然后对其进行 SDS-PAGE 及蛋白质免疫印迹分析。C. SBV 感染细胞; N. 细胞核; Nu. 核仁。

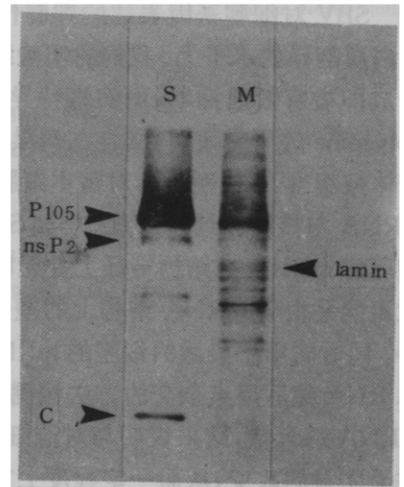
Fig. 6 Western-Blotting analysis for the existence of C protein in nucleolar fraction
Nuclear and nucleolar samples were prepared and then analysed by SDS-PAGE and western blotting using rabbit anti-SBV Ab. C. SBV-infected cells; N. Nuclei; Nu. Nucleoli.



2.2.3 病毒感染后诱导细胞产生核基质蛋白 P105 蛋白: 在 Sindbis 病毒感染后 3 小时, 用³⁵S-甲硫氨酸对细胞进行脉冲标记和追踪, 然后经选择性抽提得到核基质, 对其成份进行 SDS-PAGE 及放射自显影分析(图 7), 发现与未感染对照细胞相比, 宿主细胞核基质特异蛋白(如 Lamin A, B, C. 等)的合成被有效地抑制; 而在核基质上大量地富集病毒的非结构蛋白 nsP2 以及结构蛋白 C 蛋白, 同时发现一种分子量约为 105 kD 的蛋白大量积聚在核基质处。用放射免疫沉淀及蛋白质免疫印迹分析进一步证实了 nsP2 和 C 蛋白在核基质的存在; 对 P105 蛋白的初步鉴定表明, 病毒的所有非结构蛋白以及结构蛋白的抗体都不能识别上述 105 kD 蛋白(P105), 说明该蛋白不是病毒蛋白或其前体而很可能是病毒感染后诱导细胞所产生的; 延长标记后追踪时间并不导致其含量的减少, 进一步说明它不是病毒蛋白前体; 病毒感染后用放线菌素 D 处理细胞则导致该蛋白的量明显降低, 进一步支持了 P105 由病毒感染诱导产生的推测。

图 7 SBV 感染后核基质蛋白成分的改变
感染细胞(3 h p. i.) 及对照细胞经标记后制备核基质样品, 并对其进行分析。S. SBV 感染细胞; M. 对照细胞。

Fig. 7 Alteration of the protein composition in the nuclear matrix fraction subsequent to SBV infection
Both SBV-infected (3 h p. i.) and mock-infected BHK cells were labeled and chased. Then the nuclear matrix samples were prepared and subjected to SDS-PAGE and autoradiography. S. SBV-infected; M. Mock-infected control.



3 讨论

病毒感染伴随着病毒对宿主细胞基因表达的抑制或调控。从 60 年代末人们就注意到某些披膜病毒, 如 SBV, Semliki 森林病毒(SFV), 西部马脑炎(WEE)病毒等, 在病毒感染后都能很快地关闭细胞的基因表达^[2]。但是这些研究受到当时技术条件特别是对甲病毒

复制机理认识的限制,例如在研究病毒对细胞蛋白质合成的影响时,未能对病毒蛋白;前体蛋白,特别是非结构蛋白有明确的认识,而难于区分细胞和病毒的蛋白;在研究病毒对细胞 RNA 的抑制作用时也有类似的问题,由于病毒 RNP 的特征峰和细胞 RNP 的特征峰在密度梯度超离心分析时重叠而难于分析。我们的研究工作立足于目前对 SBV 繁殖过程有较详尽而深入的认识,且考虑到 SBV 在胞质中复制的特点,从而用³H-U 对感染细胞进行脉冲标记结合光学显微镜和电子显微镜自显影的方法即可清楚地显示 SBV 感染 3 小时后,宿主细胞 mRNA 的合成即受到明显的抑制,而细胞 rRNA 的合成却几乎不受影响。这一结果不仅为前人的工作提供新的补充,而且也为我们进一步探讨 SBV 对宿主 RNA 合成的选择性抑制的生物学意义提供了线索。

用放线菌素 D 抑制宿主核内包括 rRNA 在内的 RNA 合成,导致病毒结构蛋白的合成量以及病毒滴度降低,说明了尽管 SBV 可以在去核的胞质体内增殖^[13,14],但它的高效繁殖仍依赖于宿主细胞的核功能。Barton 等人 and Pardigon 等人最近的研究都表明某些宿主特异蛋白参与构成 SBV 复制复合物^[15,16]。我们的结果进一步表明,很可能 SBV 在某些细胞体系中的增殖,还一定程度上依赖于宿主细胞 rRNA 的持续合成。

一般认为病毒 RNA 合成的抑制与病毒早基因编码的非结构蛋白有关。通过对 SBV 的四种非结构蛋白在细胞内定位的研究,我们发现 SBV 的非结构蛋白 nsP2 在病毒感染的早期特异性地进入细胞核内并与核基质相结合^[12]。从 nsP2 在细胞核内的积聚动态看,nsP2 在核内的积聚过程主要发生在病毒感染的早期(感染后 1—3 小时),且其积聚动态与 SBV 对细胞 mRNA 合成的抑制过程在时态上相关,表明 nsP2 有可能参与病毒的抑制宿主细胞 mRNA 合成的功能。

SBV 对细胞基因表达的抑制作用不仅表现为对细胞 RNA 转录的抑制,而且表现在蛋白质翻译的水平上。我们的实验结果清楚地显示:在 SBV 感染后 3 小时,细胞的蛋白质合成即被有效地抑制,而病毒特异蛋白却大量合成。Tuomi 等人对 SFV 感染细胞内的 polysome 的研究表明,结合在病毒 mRNA 上的核糖体数与在正常细胞中 mRNA 上的核糖体数相当^[2],说明病毒对宿主细胞蛋白质合成的抑制很可能通过病毒 mRNA 取代细胞 mRNA 与核糖体结合所致。已知 SBV 的 49S 基因组 RNA 和 26S 亚基因组 RNA 与真核细胞的 mRNA 在结构特征上并无明显的区别,都具有 5'端 Cap 结构和 3'端 polyA 尾,不太可能是由于 mRNA 结构上的差别导致病毒 mRNA 在翻译水平上对细胞 mRNA 的优势。同时病毒感染后的细胞的 mRNA 的半衰期也未发生明显的改变^[2]。我们提取细胞的总 RNA 然后用点杂交的方法检测细胞内一些 mRNA 的含量的变化,如肌动蛋白(actin) mRNA 的含量,结果表明与对照细胞相比,actin mRNA 的含量在病毒感染后(4 h p. i.) 并无明显的改变,从而一定程度上支持他的推论。病毒 mRNA 在胞质内的大量复制,可能在数量上对细胞 mRNA 具有竞争优势,但这并未排除另一种可能性,即病毒感染使得细胞蛋白质合成装置发生有利于病毒 RNA 的改变的可能性。事实上 McGuire 等人用同位素标记物交联的方法研究 SBV 感染 BHK 细胞后核糖体拓扑结构的变化,证明在 SBV 感染细胞中核糖体特别是大亚基拓扑结构发生了明显的变化^[17];而 Ulmanen 等人的实验表明,SBV 的衣壳蛋白可与核糖体的大亚基相结合^[18]。我们的工作则表明 SBV 衣壳蛋白特异性地富积在细胞的核仁处,1990 年 Michel 等人对 SFV 衣壳蛋白的研究^[19]也证实了

这一点,这表明甲病毒的衣壳蛋白在感染细胞中进入细胞核并特异性地在核仁处聚集可能与病毒特异的核糖体的组装有关。Michel 等人及 Elgizoli 等人的研究还表明,高浓度的衣壳蛋白通过脂质体转入细胞内可以抑制细胞的蛋白质翻译^[20]。这进一步支持我们的推测:SBV 衣壳蛋白与核糖体大亚基相互作用引起其拓扑结构的变化进而影响细胞的蛋白质翻译。我们知道 SBV 的 C 蛋白与病毒 RNA(49S 和 26S RNA)具有很强的亲合性,病毒 C 蛋白与核糖体大亚基结合可能有利于病毒 RNA 与核糖体的结合,从而使得病毒 mRNA 较细胞 mRNA 具有翻译的优势。而 SBV 感染细胞中持续的 rRNA 的合成及病毒衣壳蛋白在核仁处特异定位又使得病毒特异的核糖体的组装成为可能。用放线菌素 D 抑制细胞 RNA 的合成(包括 rRNA 合成)则可能抑制了病毒特异核糖体的合成和组装,从而影响了病毒蛋白质的合成进而影响病毒的滴度。

值得注意的是,SBV 感染后在抑制绝大多数细胞蛋白合成的同时,还诱导细胞产生一种核基质结合蛋白 P105。近年来实验证据表明,核基质在真核细胞基因表达调控过程中起着极为重要的作用^[21],而且很多与 DNA/RNA 代谢合成密切相关的酶类,细胞的调控因子以及病毒特异的调控蛋白等都能够紧密结合在核骨架结构上^[22],这表明:P105, nsP2 等有可能共同参与 SBV 对细胞 RNA 的选择性抑制作用。

参 考 文 献

- [1] Strauss E G, Strauss J H. Structure and replication of the alphavirus genome. In: Schlesinger S *et al* ed. The Togaviridae and Flaviviridae. New York: Plenum, 1986. 35.
- [2] Simizu B. *Compr Virol*, 1984, **19**:465—499.
- [3] 梁凤霞, 谢建新, 丁明孝, 等. 微生物学报, 1993, **33**(3): 161—165.
- [4] Willians M A. In: Glauret A M ed. Practical Methods in Electron Microscopy. Amsterdam: North-Holland Publishing Co, 1977. 77.
- [5] 丁明孝, 程中和. 电子显微学报, 1982, **1**:60—64.
- [6] Peranen J R M, Liljestrom P, Kaariainen P. *J Virol*, 1990, **64**:1888—1896.
- [7] Muramatsu M, Onishi T. Methods in Cell Biology XV. New York: Academic Pr, 1977. 221—234.
- [8] Fey E G, Wan K M, Penman S. *J Cell Biol*, 1984, **98**:1973—1984.
- [9] Laemmli U K. *Nature (London)*, 1970, **277**:680—685.
- [10] O' Farrell P Z, Goldman H M, O' Farrell P H. *Cell*, 1977, **25**:1133—1142.
- [11] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:4350—4354.
- [12] Wang X, Ding M. *Cell Res*, 1993, **3**:27—37.
- [13] Erwin C, Brown D T. *J Virol*, 1983, **45**:792—799.
- [14] Follet E A C, Pringe C R, Pennington T H. *J Gen Virol*, 1975, **26**:183—196.
- [15] Barton D J, Sawicki S G, Sawicki D L. *J Virol*, 1991, **65**:1486.
- [16] Pardigon N, Strauss J H. *J Virol*, 1992, **66**:1007—1015.
- [17] McGuire R P, Eaton B T, Kisilevsky R. *Biochim Biophys Acta*, 1983, **741**:258—268.
- [18] Ulmanen L, Soderlund H, Kaariainen L. *J Virol*, 1976, **20**:203.
- [19] Michel M R, Elgizoli Y, Dai R *et al*. *J Virol*, 1990, **64**:5123—5131.
- [20] Elgizoli M, Dai Y, Kempf C *et al*. *J Virol*, 1989, **45**:792—799.
- [21] Jackson D A. *BioEssays*, 1991, **13**:1—10.
- [22] 王小忠, 丁明孝, 程中和. 核基质蛋白与核基质结合蛋白的研究进展. 见:程中和等主编. 细胞生物学新动态. 上海:上海科学技术出版社, 1994. 85.

THE EFFECT OF SINDBIS VIRUS MULTIPLICATION ON GENE EXPRESSION OF HOST CELLS

Wang Xiaozhong Xie Jianxin Xu Xiaojie Liang Fengxia Ding Mingxiao
(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Sindbis virus (SBV) infection mediated a rapid shutoff of host cellular gene expression (mRNA synthesis and protein synthesis); however the synthesis of cellular rRNA remained at the same level as the uninfected cells. Meanwhile a cellular protein P105 was shown to be enriched in the nuclear matrix. Actinomycin D treatment after virus infection resulted in an apparent reduce in the production of viral structural proteins and infectious virions. The results presented here not only demonstrated the complexity of SBV-mediated regulation of host gene expression, but also suggested SBV nonstructural protein nsP2 and capsid protein C were possibly involved in this process.

Key words Sindbis virus (SBV), Nonstructural protein, Nuclear matrix, Gene expression

图版说明

Explanation of plate

SBV 感染 BHK-21 细胞的显微放射自显影研究。在 SBV 感染后不同时间用 $^3\text{H-U}$ 对细胞进行脉冲标记 10 分钟, 然后进行显微放射自显影分析。A. 未感染病毒的对照细胞; B. 感染 1 小时后的细胞; C. 感染 3 小时后的细胞; D. 感染 5 小时后的细胞。

Light microscope autoradiography of SBV-infected BHK-21 cells. At various times postinfection (p. i.), the cells were pulse-labeled with $^3\text{H-U}$ and then subjected to LM autoradiography. A. Mock-infected control; B. 1 h p. i.; C. 3 h p. i.; D. 5 h p. i.