

张俊波,印双红,李默,等. PI3K/Akt 信号通路在胞内布鲁氏菌存活中的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):36-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.009

PI3K/Akt 信号通路在胞内布鲁氏菌存活中的作用

张俊波¹, 印双红¹, 李默², 冉辉¹, 罗静¹, 李建新¹, 陆安法³, 郭飞², 陈创夫²

(1. 铜仁学院, 贵州铜仁 554300; 2. 石河子大学, 新疆石河子 832000; 3. 贵州省铜仁市动物疫病控制中心, 贵州铜仁 554300)

摘要:为了检测对 PI3K/Akt 信号通路在巨噬细胞内布鲁氏菌存活的影响,将布鲁氏菌粗糙型菌株 RB51 和光滑型菌株 S2308 分别侵染细胞,应用 Western blot 技术检测 RB51 和 S2308 和对巨噬细胞内 *p-Akt* (S473) 和 *p-Akt* (T308) 表达的影响;用 MTT 法检测抑制剂 LY294002 (LY) 对细胞活性的影响;通过菌落计算法,检测抑制剂 LY 对胞内菌 RB51 和 S2308 存活的影响。结果表明,粗糙型菌株 RB51 和光滑型菌株 S2308 都可激活 PI3K/Akt 信号通路,但粗糙型菌株 RB51 的激活程度显著弱于光滑型菌株 S2308 ($P < 0.01$);抑制剂 LY 在小于或等于 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时不影响细胞活性;抑制剂 LY (20 $\mu\text{mol/L}$) 可显著抑制光滑型菌株 S2308 的存活,但不影响粗糙型菌株 RB51 的存活。本研究表明,PI3K/Akt 信号通路在光滑型菌株存活中发挥重要作用。

关键词:PI3K/Akt 信号通路;布鲁氏菌 RB51 和 S2308;胞内存活

中图分类号:S855.99 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0036-04

布鲁氏菌病是一种严重危害人类和家畜健康的人兽共患传染病^[1-2]。布鲁氏菌为革兰氏阴性的兼性胞内寄生菌,其急性期的临床特点主要为恶寒、发热、关节和肌肉痛等;人感染布鲁氏菌后造成骨关节、神经系统、生殖系统和免疫系统等

损害,慢性期主要症状为骨关节病及包括神经系统在内的多系统多器官的损害,患者一般会表现出神经-精神症状,病程较长,容易复发并再感染,从而导致劳动力的丧失。动物布鲁氏菌病的特点是生殖器官、胎膜及其他多种器官组织发炎、坏死和肉芽肿的形成,引起流产、睾丸炎及关节炎等症状。布鲁氏菌病给人类健康和畜牧业和谐发展带来严重危害^[3]。因此,研究布鲁氏菌及其对宿主细胞的致病机制,为布鲁氏菌疫苗研发和防控提供理论依据,对于国民经济的发展和社会的安全具有重大的意义。

PI3K/Akt 信号转导通路是重要的细胞生存通路之一,Akt 作为 PI3K/Akt 信号转导通路的关键分子,在促进细胞生存、生长、增殖,促进细胞运动、侵袭和转移,抑制细胞凋亡方面起核心作用^[4]。PI3K/Akt 信号通路与肿瘤的发生发展密切相关,在多种肿瘤组织有 Akt 的过度表达和活化。PI3K/Akt 信号通路还与一些病毒的生存繁殖密切相关,然

收稿日期:2015-03-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31502067);博士科研启动基金(编号:trxyDH1504);“野生动植物保护与利用”——省级重点学科[编号:黔学位办(2013)18号];梵净山特色动植物资源保护与利用创新人才团队[编号:黔教合人才团队字(2012)08号];梵净山特色动植物资源重点实验室[编号:黔教合 KY 字(2011)005号];高层次人才启动资金(编号:RCZX201228)。

作者简介:张俊波(1984—),男,河南周口人,博士研究生,副教授,主要从事免疫遗传与抗病机理。E-mail:zhangjunbo666@126.com。
通信作者:印双红,硕士研究生,讲师,主要从事感染免疫学方面研究。E-mail:ysh_hong2006@163.com。

[18] Mullins J G L, Parker J E, Cools H J, et al. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20973.
[19] Podust L M, Stojan JPoulos T L, Waterman M R. Substrate recognition sites in 14 α -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51 [J]. J Inorg Biochem, 2001, 87(4): 227-235.
[20] Cools H J, Fraaije B A. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control [J]. Pest Management Science, 2013, 69(2): 150-155.
[21] Lepesheva G I, Waterman M R. Structural basis for conservation in the CYP51 family [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2011, 1814(1): 88-93.
[22] Fan J, Urban M, Parker J E, et al. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function [J]. The New Phytologist, 2013, 198(3): 821-835.

[23] Cuomo C A, Guldener U, Xu J R, et al. The fusarium graminearum genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization [J]. Science, 2007, 317(5843): 1400-1402.
[24] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. The proteomics protocols handbook [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005: 571-607.
[25] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B, et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: D225-D229.
[26] Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, et al. Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM*) is one of the most ancient and conserved P450 species [J]. Journal of Biochemistry, 1996, 119(5): 926-933.
[27] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story [J]. Genome Biology, 2000, 1(6): 1-9.
[28] Becher R, Weihmann F, Deising H B, et al. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 52.

而,PI3K/Akt 信号通路与布鲁氏菌的生存关系如何,目前尚无相关报道,本研究推测 PI3K/Akt 信号通路在布鲁氏菌致病过程中发挥重要作用,因此,研究 PI3K/Akt 信号通路在布鲁氏菌致病过程中的作用,有助于揭示布鲁氏菌的致病机制,为抗布鲁氏菌药物的研制提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞与质粒 牛种布鲁氏菌参考株 2308 和牛种布鲁氏菌疫苗株 RB51,由石河子大学人畜共患病实验室提供;大肠杆菌 DH5 α ,由铜仁学院生物与农林工程学院细胞生物学实验室保存。

1.1.2 主要试剂 无内毒素质粒大提试剂盒、增强型 HRP-DAB 试剂盒,购自天根生化(北京)科技有限公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;细胞转染试剂 LipofectamineTM2000,购自 Invitrogen 公司;酵母提取物(Yeast Extract)、蛋白胨(Tryptone)、NaCl,购自 Oxoid 公司;琼脂糖购自上海生物工程技术有限公司。MTT、DMSO,且以 DMSO 作为溶剂,购自索莱宝公司;LY 购自碧云天公司;兔抗鼠磷酸化 Akt(Ser473)和 Akt(Thr308)、Akt 单克隆抗体和 HRP-羊抗兔二抗,购自 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 购自 bioworld 公司;ECL 荧光检测试剂盒购自 Thermo 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海生物工程技术有限公司。

1.2.3 布鲁氏菌感染小鼠巨噬细胞 RAW264.7 将 16M 用 PBS 洗脱菌体,利用细菌比浊法计算数量,按比例通过 10 倍稀释菌悬液,然后将悬液涂于固体培养基上,置于 37 $^{\circ}$ C、10% CO₂ 培养箱中培养 3 d,每个稀释浓度重复 3 次,进行计数取平均值确定布鲁氏菌数目。以 50:1(细菌个数:细胞个数)的比例,用 16M 侵染 RAW264.7 细胞,并将侵染后的 RAW264.7 细胞置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱中继续培养。

1.2.4 细胞蛋白质提取 细胞计数并收集 1 \times 10⁶ 个细胞,1 500 r/min 离心 5 min 弃上清收集细胞。加入 1 \times PBS 洗涤 3 次弃上清。细胞沉淀中加入 100 μ L RIPA 裂解液。加入 PMSF (100 mmol/L) 10 μ L/mL、Na₃VO₄ (200 mmol/L) 5 μ L/mL、NaF(0.5 mmol/L) 2 μ L/mL、phosSTOP phosphatase inhibitor (Roche) 150 μ L/mL,细胞悬浮混匀,在冰上静置 20 min。4 $^{\circ}$ C 15 000 r/min 离心 15 min。移出上清置于 1 支新离心管即为含总蛋白的溶液。

1.2.5 BCA 法蛋白浓度测定 吸取 50 μ L 样品于标记好的试管中。加入 1 mL BCA 工作液,轻柔涡旋混匀。标准检测:37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 或室温放置 2~16 h。加强型检测:在 60 $^{\circ}$ C 孵育 15 min,将试管冷却至室温。在 1 个干净的吸光杯中加入 1 mL 水,在波长 562 nm 调零。将待测液加入干净的吸光杯。10 min 内测定并记录所有反应液的吸光度($D_{562\text{nm}}$),校正的吸光度为各标样和试样的读数减去空白样吸光度。结合已知的 BSA 标样的量和校正过的吸光度画出标准曲线。参照标准曲线,根据各蛋白试样的校正吸光度,在标准曲线的线性范围内读出各样品的蛋白浓度。根据样品体积和稀释度计算原来样品中的蛋白量。

1.2.6 Western blot 检测 当 SDS-PAGE 结束时,将含有目的蛋白的凝胶切下,尽量避免用手碰触。同时裁剪 6~7 张大

小和凝胶相同的滤纸和 1 张硝酸纤维素膜(NC 膜),切除凝胶、NC 膜与滤纸 1 角作为标记。将凝胶与 NC 膜在膜转移缓冲液中静置平衡 10 min,NC 膜与滤纸分开浸泡。转膜:将 3 层滤纸放于半干式电转仪中,后放胶,将 NC 膜放于其上,再铺 3 层滤纸,200 mA 20 V 电泳 1~2 h。封闭:小心取出 NC 膜,放在 1 个干净平皿中,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。将 NC 膜放入杂交瓶中,加入 10 mL 膜封闭液,37 $^{\circ}$ C 于杂交仪上封闭 1 h。与一抗的结合:倒去封闭液,将 NC 膜放入盛有 TBST 的平皿中冲膜 3 次,每次 5 min。将 NC 膜放入杂交瓶中,加入用 TBST 稀释的一抗(1:1 000),37 $^{\circ}$ C 于杂交仪上杂交 1~2 h。与二抗的结合:用 TBST 冲膜 3 次,每次 5 min。加入用 TBST 稀释的过氧化物酶标记的山羊抗兔 HRP-IgG 二抗 5 mL(1:3 000),37 $^{\circ}$ C 于杂交仪上杂交 1 h。用 TBST 冲膜 3 次,每次 10 min。加 ECL 底物显色液,避光显色 1 min,照相。

1.2.7 LY 抑制试验 取对数期生长细胞,在 10% FBS 培养基中 2 mL 细胞以 1 \times 10⁶ 个/mL 密度接种于 6 孔培养板中。继续培养 6 h 后,加入 LY,浓度分别选取 10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L,1 h 后观察 p -Akt(S473)和 p -Akt(T308)抑制状态。将细胞混悬液立即置入液氮以终止反应,然后以冰冻 PBS 洗涤细胞 3 次。细胞收集后,采用 1 \times 10⁶ 个/50 μ L RIPA 提取总蛋白质,BCA 法测定总蛋白浓度。

1.2.8 MTT 试验 将抑制剂不同浓度的 LY(10、20、40 μ mol/L)与巨噬细胞共同孵育,以 0.1% DMSO 处理细胞为对照。置 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱,使细胞贴壁培养 6~24 h。加入适当浓度的受试化合物,继续培养适当时间。小心吸取上清,加入 90 L 新鲜培养液,再加入 10 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h。弃去上清,每孔加入 110 L Formazan 溶解液,置床床上低速振荡 10 min,使结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度。同时设置调零孔(培养基、MTT、Formazan 溶解液)、对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、Formazan 溶解液),每组设定 3 复孔。

1.2.9 布鲁氏菌的培养、计数 将保存的冻干布鲁氏菌接种于 10% 小牛血清肝琼脂培养基,置 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C、10% CO₂ 培养 4 d,挑取单菌落,接种于斜面培养基继续培养 4 d,加入 2 mL 生理盐水,用接种环轻轻刮下斜面培养基上的细菌,以 10⁻¹~10⁻¹⁵ 均匀稀释细菌,并取 200 μ L 10⁻¹³、10⁻¹⁴、10⁻¹⁵ 稀释菌液涂布于 120 mmol/L 含有 10% 小牛血清肝琼脂培养基的平板中,每个稀释度涂 2 个平板,置于 10% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 培养箱 4 d,对细菌进行平板计数。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 数据统计软件对试验数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 布鲁氏菌对 PI3K/Akt 信号通路的激活

在布鲁氏菌 RB51 和 S2308 感染巨噬细胞中,其细胞内对应的 p -Akt(S473)与 β -actin 的灰度比值分别为 0.32 \pm 0.034 和 1.12 \pm 0.045,而对照组值为 0.12 \pm 0.035。经统计学分析,在粗糙型 RB51 感染细胞的 p -Akt(S473)灰度比值显著高于对照组(P <0.01),但又显著低于 S2308 感

染的细胞 ($P < 0.01$)。 $p-Akt(T308)$ 与 $\beta-actin$ 的灰度值比值 $p-Akt(S473)$ 比值趋势是一致的(图1)。然后利用抑制剂 LY (20 $\mu\text{mol/L}$) 与巨噬细胞作用 1 h, 然后分别用 RB51 和 S2308 侵染巨噬细胞, 结果发现, RB51 和 S2308 诱导的 $p-Akt(S473/308)$ 的表达与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。结果表明, 在巨噬细胞中, 粗糙型的 RB51 激活 PI3K/Akt 信号通路的程度极显著弱于光滑型的 S2308 ($P < 0.01$), 并且抑制剂 LY 可阻断布鲁氏菌对 PI3K/Akt 信号通路的激活。

2.2 抑制剂 LY 对巨噬细胞活性的影响

抑制剂 LY 和 DMSO 分别与巨噬细胞作用 48 h, MTT 法检测结果: 当抑制剂 LY 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时不影响细胞的活性, 但是在浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞的成活率降至 70%。加 DMSO 后的细胞形态为小圆球形, 与正常细胞形态相同, 因此对照组加 DMSO 不影响细胞的活性。加入 LY 的浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞形态也为小圆球形, 与正常细胞形态相同, 当 LY 的浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞变大, 形态开始呈不规则形(图2)。结果表明, 采用抑制剂 LY 的浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ 不影响巨噬细胞的活性, 可以进行后续试验。

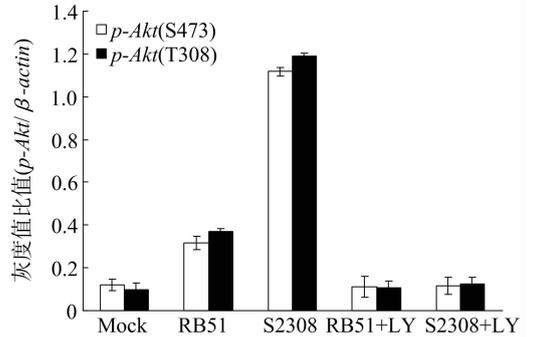
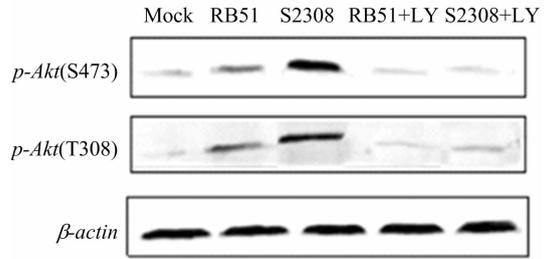


图1 布鲁氏菌对 PI3K/Akt 信号通路的激活

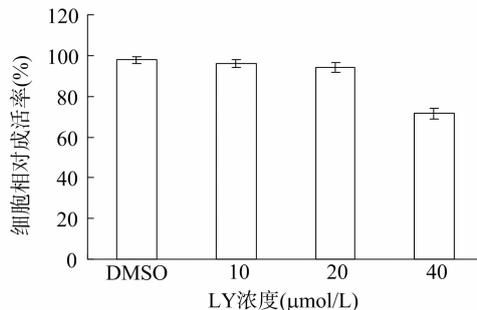
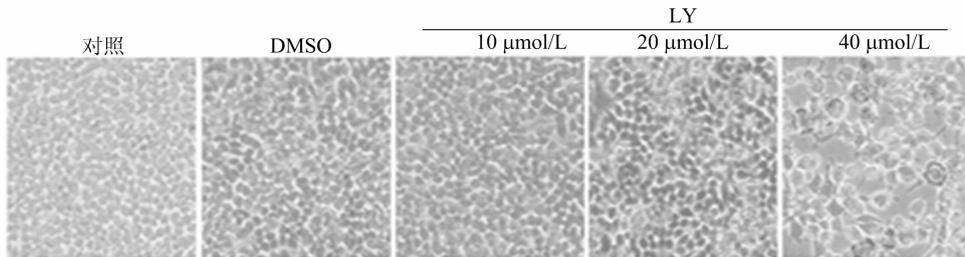


图2 抑制剂 LY 对细胞活性的影响

2.3 阻断 PI3K/Akt 信号通路对胞内布鲁氏菌存活的影响

抑制剂 LY 与巨噬细胞作用 1 h, 然后, 分别用 RB51 和 S2308 侵染巨噬细胞, 分别在 4、12、24 h 检测布鲁氏菌的 CFU, 结果显示 LY 处理细胞中 RB51 的 lgCFU 与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (图3); 而对于 S2308 菌株, LY 处理细胞的 lgCFU 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$) (图3)。结果表明, LY 抑制了巨噬细胞内 S2308 的存活, 但对 RB51 的存活无影响。

3 讨论

PI3K/Akt 信号通路与很多疾病有关, 在细胞内参与调控物质代谢、细胞增殖与存活等生物学行为。PI3K 下游靶蛋白 Akt 具有丝氨酸/苏氨酸残基, 可直接被 PI3K 激活。在 PI3K 途径中, 当上游信号作用于细胞膜表面时, 穿膜受体酪氨酸激

酶自磷酸化或磷酸化其他底物后, 能在细胞膜内表面产生 PI3K 结合点, PI3K 结合后可产生一些磷脂, 然后激活 Akt, 被激活的 Akt 可介导细胞生长和分化, 同时还可提高抗凋亡基因的表达而抑制细胞凋亡, 或活化其他信号转导通路来调控细胞的适应性生存。PI3K/Akt 异常激活与体内许多癌症发生密切相关^[5]。 $p-Akt$ 是 Akt 的功能活化状态, Akt 只有被激活后才具有生物学功能。 $p-Akt$ 在大多数肿瘤组织中过度表达。Akt 的活化同时需要催化结构域的 Thr308 位点和 C 端的调节结构域的 Ser473 位点 2 个位点的磷酸化, 只有 2 个位点的磷酸化才能使 Akt 充分活化从而达到最大活化状态。本研究表明, 光滑型菌株 (S2308) 及可激活 $p-Akt$ 的 Thr308 和 Ser473 2 个位点, 充分活化的 Akt 调控细胞的一系列生理活动; 而粗糙型菌株 (RB51) 也可激活 $p-Akt$ 的 Thr308 和 Ser473 2 个位点, 但是与光滑型菌株相比对 $p-Akt$ 的激活程度显著

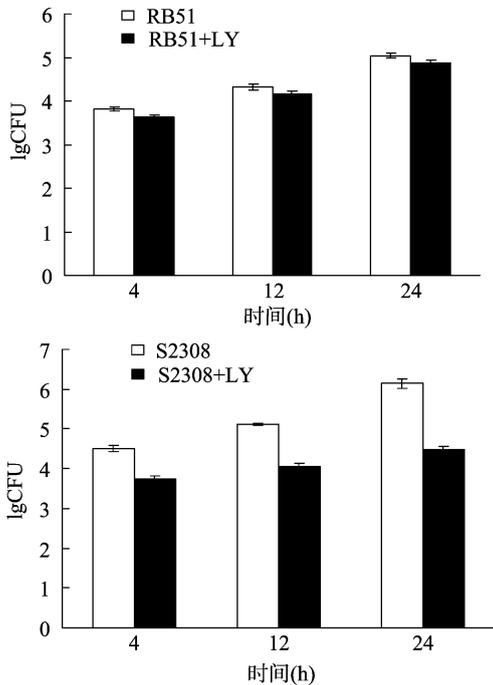


图3 抑制剂 LY 对胞内布鲁氏菌存活的影响

下降。对 $p-Akt$ 的激活程度可能与光滑型菌株的毒力强和粗糙型菌株的毒力弱有关。其具体机制还有待于进一步探索。

LPS 是布鲁氏菌的经典毒力因子,包括类脂 A、核心低聚糖和 O 抗原或 O 链 3 个部分。布鲁氏菌 LPS 的生物学活性与传统的内毒素不同,主要与其特殊的化学结构有关。当布鲁氏菌 LPS 的 O-多聚糖缺失时,布鲁氏菌从光滑型转变为粗糙型,导致细菌的毒力减弱,易于被巨噬细胞杀死^[6-7]。已有研究表明,脂多糖 O-型多糖抑制细胞的吞噬作用,抑制溶酶体溶解和宿主细胞凋亡^[8]。布鲁氏菌与其宿主细胞最开始的接触是始于布鲁氏菌表面和宿主细胞胞质膜的接触,脂多糖缺失的突变株毒力较亲本株减弱,这说明布鲁氏菌 LPS 在细菌毒力上具有很重要的作用^[9]。本研究推测,对 PI3K/Akt 激活的强弱与布鲁氏菌致病性成正相关,光滑型布鲁氏菌致病性强的原因可能与其 LPS 能激活 PI3K/Akt 通路程度较强有关,粗糙型布鲁氏菌致病性弱的原因可能与其 LPS 能激活 PI3K/Akt 通路程度较弱有关。

LY (PI3 Kinase Inhibitor) 体内是一个高度特异性的抑制剂。它可以特异地抑制 PI3 kinase 的活性,但是不抑制其他的脂质和蛋白激酶活性。研究表明 LY 可以抑制 PI3K-依赖的 Akt 磷酸化和激酶活性,它通过和 ATP 竞争 PI3K 催化结构域的结合位点发挥作用^[10],从而有效抑制其下游蛋白 Akt 的磷酸化,已被广泛应用于信号传导通路的作用及靶向治疗的研究中。

布鲁氏菌在宿主细胞中的复制和增殖受到各种因素的影响。为了在宿主细胞中复制和增殖,布鲁氏菌通过激活宿主细胞内信号通路控制宿主细胞的存活、凋亡和自噬,以逃避宿主免疫应答。已有研究表明,某些病毒为了更加有效地进行复制,通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制宿主细胞的早期凋亡、促进细胞自噬和抑制细胞免疫以延长在胞内的复制时间^[11-13],甲型流感病毒的 NS1 蛋白可与 PI3K 的 p85 β 亚基结

合而激活 PI3K/Akt。但是 PI3K/Akt 是否在布鲁氏菌感染中起作用尚无文献报道。本研究发现,LY 抑制 PI3K/Akt 信号通路后,光滑型布鲁氏菌 S2308 存活能力显著下降,而粗糙型菌株 RB51 存活力无显著变化。本研究表明,PI3K/Akt 信号通路抑制后主要影响光滑型菌株的生存,其具体机制还有待于进一步探索。

参考文献:

- [1] Lacerda T L, Cardoso P G, Augusto De Almeida L, et al. Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a brucella abortus rough strain that is attenuated in macrophages and in mice [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (34): 5627 - 5634.
- [2] 尚德秋. 布鲁氏菌病及其防治 [J]. *中华流行病学杂志*, 1998, 19 (2): 67.
- [3] Olsen S C, Palmer M V. Advancement of knowledge of brucella over the past 50 years [J]. *Veterinary Pathology*, 2014, 51 (6): 1076 - 1089.
- [4] Wang J, Yuan L, Xiao H, et al. Momordin Ic induces HepG2 cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt - mediated mitochondrial pathways [J]. *Apoptosis*, 2013, 18 (6): 751 - 765.
- [5] Tao J J, Castel P, Radosevic - Robin N, et al. Antagonism of EGFR and HER3 enhances the response to inhibitors of the PI3K - Akt pathway in triple - negative breast cancer [J]. *Science Signaling*, 2014, 7 (318): ra29.
- [6] Haag A F, Myka K K, Arnold M F, et al. Importance of lipopolysaccharide and cyclic β - 1, 2 - glucans in *Brucella* - Mammalian infections [J]. *International Journal of Microbiology*, 2010, 7: 124509.
- [7] Lapaque N, Forquet F, de Chastellier C, et al. Characterization of *Brucella abortus* lipopolysaccharide macrodomains as mega rafts [J]. *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (2): 197 - 206.
- [8] Fernandez - Prada C M, Zelazowska E B, Nikolich M, et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes; bacterial surface O - polysaccharid inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis [J]. *Infect Immunol/Lun*, 2003, 71: 2110 - 2119.
- [9] Castañeda - Roldán E I, Ouahrani - Bettache S, Saldaña Z, et al. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells [J]. *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (12): 1877 - 1887.
- [10] Walker E H, Pacold M E, Perisic O, et al. Structural determinants of phosphoinositide 3 - kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine [J]. *Molecular Cell*, 2000, 6 (4): 909 - 919.
- [11] Wei L, Zhu S S, Wang J, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3 - Kinase/Akt signaling pathway during porcine circovirus type 2 infection facilitates cell survival and viral replication [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (24): 13589 - 13597.
- [12] Soares J A, Leite F G, Andrade L G, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83 (13): 6883 - 6899.
- [13] Wang P, Guo Q S, Wang Z W, et al. HBx induces HepG - 2 cells autophagy through PI3K/Akt - mTOR pathway [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2013, 372 (1/2): 161 - 168.