

戊型肝炎病毒感染引起的肝纤维化中 Agap2 的表达变化

户晓霞^{1#}, 薛媛文^{1#}, 黄芬^{1,2*}

1 昆明理工大学 医学院, 云南 昆明

2 云南省临床病毒学重点实验室, 云南 昆明

户晓霞, 薛媛文, 黄芬. 戊型肝炎病毒感染引起的肝纤维化中 Agap2 的表达变化[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2404-2415.
HU Xiaoxia, XUE Yuanwen, HUANG Fen. Changes in Agap2 expression in hepatic fibrosis induced by hepatitis E virus infection[J].
Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2404-2415.

摘要: 【目的】探究戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染后肝脏纤维化进程中具有 GTP 结合蛋白样结构域、锚蛋白重复序列和 PH 结构域 2 的 Arf GAP (ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2, Agap2)的表达变化, 并初步探究 HEV 慢性化感染与 Agap2 表达之间的关联。【方法】通过尾静脉接种 HEV 构建 HEV 感染的 BALB/c 小鼠模型, 并进行全转录组测序。利用免疫组化、免疫荧光和实时荧光定量 PCR 方法检测感染 HEV 的 BALB/c 小鼠肝脏中 HEV 感染情况及 Agap2 表达情况。【结果】研究发现 HEV 感染后 Agap2 表达显著上升(24 hpi 感染组 $P=0.0003$, 48 hpi 感染组 $P=0.0019$)。HEV 慢性化感染会导致小鼠肝纤维化发生, 且经检测发现小鼠肝脏中 Agap2 的表达与 HEV 病毒载量呈正相关($r=0.7974$, $P<0.0001$)。通过体外实验同样发现, Agap2 在 HEV 感染的 Huh 7.5.1 ($r=0.9683$, $P=0.0024$)和 LX-2 ($r=0.6835$, $P=0.0065$)细胞系中表达呈上调趋势, 与 HEV 病毒载量呈正相关。【结论】本研究表明, 在 HEV 慢性化感染后肝脏纤维化进程中 Agap2 的表达与 HEV 病毒载量呈正相关, Agap2 可能是治疗 HEV 感染中肝纤维化的潜在新分子靶标。

关键词: 戊型肝炎病毒; 具有 GTP 结合蛋白样结构域、锚蛋白重复序列和 PH 结构域 2 的 Arf GAP; 肝纤维化; α -平滑肌肌动蛋白

资助项目: 云南省自然科学基金(202401AS070057)

This work was supported by the Yunnan Provincial Natural Science Foundation (202401AS070057).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: huangfen6789@163.com

Received: 2025-10-31; Accepted: 2025-11-28; Published online: 2025-12-11

Changes in Agap2 expression in hepatic fibrosis induced by hepatitis E virus infection

HU Xiaoxia^{1#}, XUE Yuanwen^{1#}, HUANG Fen^{1,2*}

1 Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, China

2 Yunnan Provincial Key Laboratory of Clinical Virology, Kunming, Yunnan, China

Abstract: [Objective] To investigate changes in ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (Agap2) expression during hepatic fibrosis progression following hepatitis E virus (HEV) infection and preliminarily explore the association between chronic HEV infection and Agap2 expression. **[Methods]** A BALB/c mouse model of HEV infection was established through inoculation in tail vein and subjected to RNA sequencing. HEV infection and Agap2 expression in the liver tissue were detected *via* immunohistochemistry, immunofluorescence assay, and real-time qPCR. **[Results]** Agap2 expression was upregulated following HEV infection (24 hpi group: $P=0.0003$, 48 hpi group: $P=0.0019$). Chronic HEV infection induced hepatic fibrosis in mice, and Agap2 expression in the mouse liver was positively correlated with HEV load ($r=0.7974$, $P<0.0001$). Similarly, *in vitro* experiments demonstrated that Agap2 expression was upregulated in HEV-infected Huh 7.5.1 cells ($r=0.9683$, $P=0.0024$) and LX-2 cells ($r=0.6835$, $P=0.0065$), showing a positive correlation with HEV load. **[Conclusion]** The results demonstrate that Agap2 expression is positively correlated with HEV load during hepatic fibrosis progression after chronic HEV infection. Agap2 may serve as a potential molecular target for the treatment of HEV-associated hepatic fibrosis.

Keywords: hepatitis E virus (HEV); ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (Agap2); hepatic fibrosis; alpha-smooth muscle actin (α -SMA)

器官纤维化作为多种疾病的终末病理阶段,已成为全球发病率和死亡率的重要驱动因素。导致纤维化的病因范围广泛,例如环境暴露和慢性病毒感染(如病毒性肝炎)等^[1]。目前,病毒性或代谢性慢性肝病所造成的肝纤维化已成为全球健康的一大挑战^[2]。肝纤维化是一种慢性疾病,会导致细胞外基质沉积以及肝功能持续丧失^[3]。若肝纤维化不及时治疗会发展为肝硬化、门静脉高压症,进一步增加肝细胞癌风险,最终导致器官衰竭和死亡^[4-6]。纤维化相关基因 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)表达增加可明显促进纤维化发生,表明其参与纤维化发病过程^[7]。Agap2, 又被称为

GGAP2^[8], 属于 ADP-核糖基化因子 GTP 酶激活蛋白家族(Arf GTPase-activating proteins, Arf GAP)^[9]。它具有 GTP 酶活性,是协调膜运输和肌动蛋白细胞骨架重塑的 AGAP (ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain)家族成员之一^[10],且涉及细胞凋亡、细胞存活、迁移和受体运输相关的信号通路,对正常生理功能(如发育、伤口愈合和吞噬作用)至关重要^[11]。研究表明,Agap2 的表达水平在几种癌症(前列腺癌、胶质母细胞瘤和其他肿瘤)中升高,且与肿瘤进展有关^[11-12]。超过 90% 的胶质母细胞瘤中 Agap2 表达明显升高,表明它可能是该扩增子的关键靶标,在许多继发于基因扩

增或基因过表达的人类恶性肿瘤中,也可看到 Agap2 活性增加^[13]。同时,研究发现 Agap2 与肝纤维化有关,且有证据表明抑制 Agap2 能够缓解肝纤维化程度^[8],但具体机制尚不明确,这表明 Agap2 可能是治疗肝纤维化的潜在新分子靶标^[14]。

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是全球急性病毒性肝炎的最常见病因,属于肝炎病毒科(Hepeviridae)。HEV 是一种小型无包膜病毒,具有单链核糖核酸(RNA)基因组^[15]。HEV 能够引起急性肝炎和慢性感染,其中大多数慢性感染病例发生于免疫功能低下的患者,感染病原体包括 3 型、4 型 HEV 病毒,后者相关报道来自中国^[16-17]。慢性 HEV 感染定义为持续检测到 HEV 复制,持续时间至少达 3-6 个月。现有研究已证实慢性 HEV 感染会导致肝脏结构性损伤,包括结节形成、纤维化以及肝硬化^[18]。据报道,大约 10% 的慢性感染者在 2-5 年内会发展为肝硬化^[19]。在免疫功能低下的个体中,慢性感染可引起肝损伤,导致炎症和纤维化,进而引发肝硬化和死亡^[20]。因此探究 HEV 慢性感染导致肝纤维化的机制十分重要。

通过对构建的 HEV 感染的 BALB/c 小鼠模型进行全转录组测序发现,HEV 感染显著上调 Agap2。目前已有研究表明,HEV 感染能够导致肝纤维化,但 HEV 慢性化感染造成纤维化的机制尚不可知^[21]。因此,本研究主要探究了 HEV 慢性化感染后肝脏纤维化进程中 Agap2 的变化,以期探究 HEV 感染,特别是在 HEV 慢性化感染的情况下导致肝纤维化的机制提供研究基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞

SPF 级 BALB/c 小鼠购自昆明医科大学,本研究所有动物实验均获得昆明理工大学动物伦理委员会批准。实验用小鼠抗 HEV 抗体(IgG 和 IgM)及 HEV RNA 均呈阴性。Huh 7.5.1 和 LX-2

细胞系储存于昆明理工大学基础医学院病原感染与免疫实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器

TRIzol 试剂, Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录酶、实时荧光定量 PCR 试剂(SYBR Premix Ex TaqTM II), TaKaRa 公司; HEV ORF3, Millipore 公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗,天德悦(北京)生物科技有限责任公司; RNAsolidTM 组织 RNA 稳定保存液,南京诺唯赞生物科技股份有限公司; TruSeq RNA Sample Prep Kit v2, Illumina 公司; Agencourt AMPure XP-PCR Purification Beads, Agencourt SPRiSelect Reagent Kit, Beckman Coulter 公司; SuperScript IV Reverse Transcriptase, ThermoFisher Scientific 公司。

低温高速离心机, Eppendorf 公司; Real-time PCR 仪、PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; NanoDrop 2000、DynaMag2 Magnetic Stand、Invitrogen Qubit Spectrophotometer、ABI 2720 Thermal Cycler、ABI 7300 Real-Time PCR System、自动组织脱水机、Stuart Rotator, ThermoFisher Scientific 公司; 组织包埋机、切片机, Lecia 公司; 扫片机, Olympus 公司; Vortex-Genie 2, Scientific Industries 公司; Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies 公司; Illumina HiSeq/NovaSeq, Illumina 公司。

1.2 动物处理

将 BALB/c 小鼠(共 36 只)平均分为 12 组,每组 3 只。Mock 对照组(3 只):尾静脉注射 200 μ L PBS; HEV 感染组(33 只):尾静脉注射 200 μ L 分离自云南省昆明市的猪粪便 HEV 病毒悬液(HEV 基因 4 型, KM01 株)。在感染后 0、24、48 h (hours post inoculation, hpi) 和 3、7、14、21、28、85、126、184、210、240 d (days post inoculation, dpi), 安乐处死小鼠,收集粪便、血液和肝脏组织。肝脏组织分为 3 份,1 份多聚甲醛固定,2 份 RNAsolidTM 组织 RNA 液保存。采用免疫组化和免疫荧光法检测肝脏组织的 HEV

ORF3, 利用实时荧光定量 PCR 检测病毒拷贝数。

1.3 实时荧光定量 PCR 样品检测

按照说明, 使用 TRIzol 试剂从组织中提取总 RNA, 再按照 M-MLV 逆转录试剂盒的操作步骤将 RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。引物 HEV F: 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3', HEV R: 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3', Agap2 F: 5'-GCAGCTACTATGAGACTTGTGC-3', Agap2 R: 5'-GTGACCAACATTCGGTGAGGA-3'。PCR 反应体系 (10 μ L): SYBR (2 \times F488 SYBR qPCR Mix) 5 μ L, 引物-F 和引物-R (10 μ mol/L) 各 0.2 μ L, ddH₂O 3.6 μ L, cDNA (25 ng/ μ L) 1 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 65 $^{\circ}$ C 31 s, 共 40 个循环; 65 $^{\circ}$ C 5 s。以内参基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为对照, 各目的基因的差异表达倍数采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量。

1.4 免疫组化

将保存于 4% 中性多聚甲醛中的小鼠肝脏组织进行石蜡包埋、切片、脱水、乙醇复水和 Tris-EDTA 修复, 3% H₂O₂ 孵育 10 min, 脱脂奶封闭 2 h; 加入 HEV (ORF3 一抗, 1:200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再加入鼠 HRP 二抗 (1:250), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。苏木精染色 10 min, 盐酸乙醇分化 3 s, 0.5% 氨水反蓝 8 s, 最后用中性树脂封片, 置于显微镜下观察。

1.5 免疫荧光

将切好的组织玻片进行脱蜡、复水、Tris-EDTA 抗原修复, 再用 5% BSA 封闭 2 h; 加入 HEV (ORF3 一抗, 1:100), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再加入鼠 FITC 二抗 (1:200), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。DAPI 避光孵育 30 min 后, 置于显微镜下观察。

1.6 Masson 染色

将组织玻片进行脱蜡、复水, 用 Bouin 液作用过夜, 天青石蓝染色 3 min, Mayer 苏木素染色 3 min, 盐酸乙醇分化后, 再用磷钼酸溶液处

理 10 min, 苯胺蓝染色 5 min, 弱酸处理 2 min 后, 用乙醇梯度脱水, 最后中性树脂封片。

1.7 基因测序

本研究取对照组和 24 hpi、48 hpi 感染组黄豆大小的肝脏组织, 将肝脏保存在 RNAsolidTM 组织 RNA 稳定保存液中, 然后送至上海天昊生物科技有限公司。采用 mRNA-seq 技术对总 RNA 进行质量检测, 并通过 oligo(dT) 富集 mRNA, 随后进行片段化、逆转录合成 cDNA, 构建测序文库。经过末端修复、加 A、接头连接、纯化、片段筛选、PCR 扩增、质检和定量后, 最后进行混样测序。

测序原始数据经 FastQC 和 Trim Galore 进行质量评估和控制, 然后利用 HISAT2 将测序数据比对到参考基因组, 使用 RSeQC 评估转录组整体质量。通过 StringTie 和 DESeq2 进行基因表达定量和差异基因鉴定。同时, 为进一步分析基因功能, 进行了基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析和基因集富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)。此外, 还进行了蛋白互作网络分析 (STRINGdb 和 WGCNA)、可变剪切分析 (rMATS) 和新转录本预测 (Cufflinks)。

1.8 统计分析

应用 Prism 9 软件对试验数据进行统计学分析, 试验结果采用 (mean \pm SD) 表示, 两组间差异采用独立样本 *t* 检验进行比较。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 成功构建 HEV 感染的 BALB/c 小鼠模型

为验证 HEV 感染的 BALB/c 小鼠模型是否构建成功, 本研究利用免疫组化及免疫荧光技术对小鼠肝脏中的 HEV 抗原进行标记并量化分析 (图 1A-1D), 同时采用实时荧光定量 PCR 检

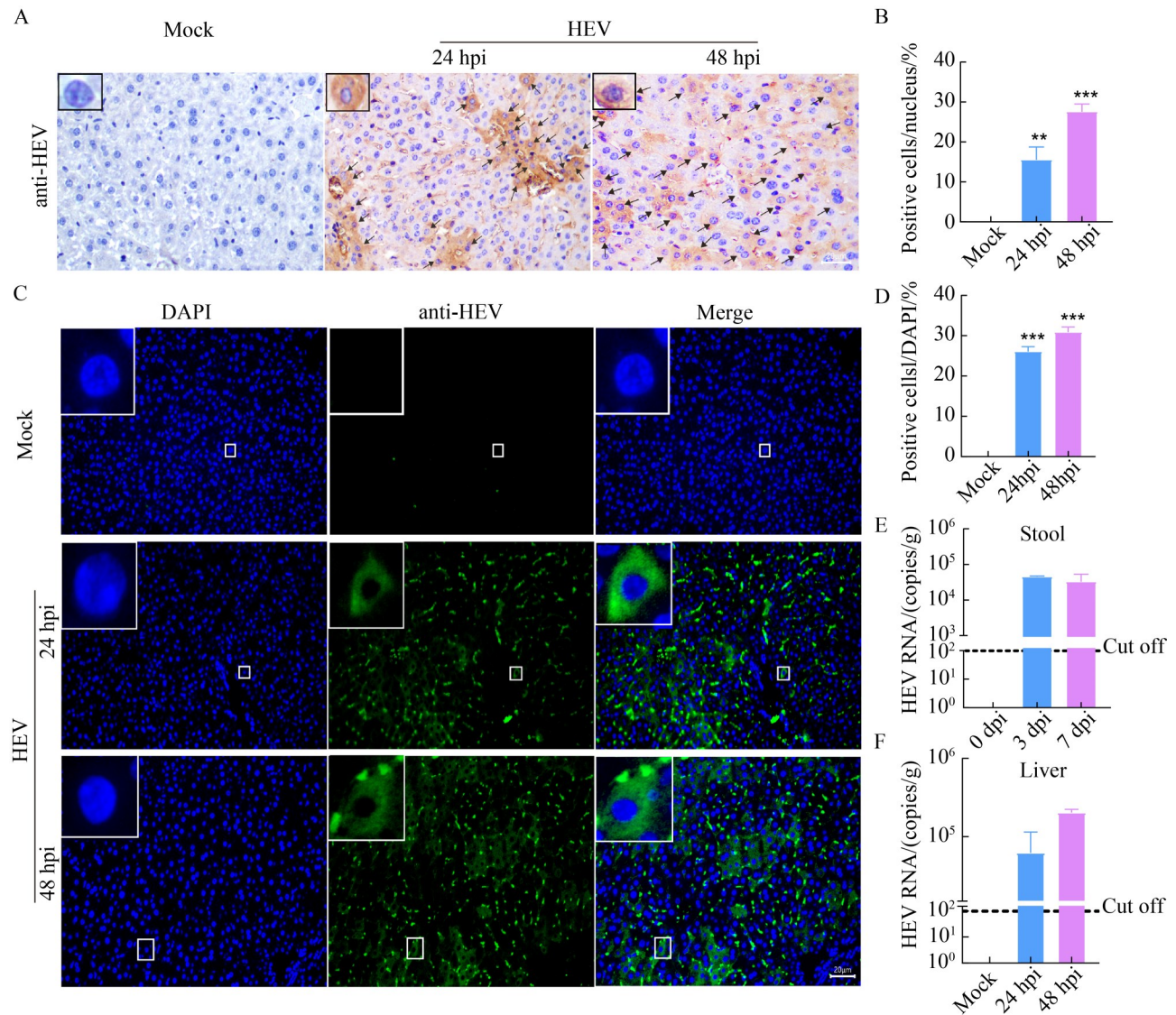


图1 HEV在BALB/c小鼠中成功复制

Figure 1 Successful replication of HEV in BALB/c mice. A: Immunohistochemical detection of HEV ORF3 protein in mouse liver (black arrow); B: Quantification of HEV ORF3-positive cells in immunohistochemistry; C: Immunofluorescence detection of HEV ORF3 protein in mouse liver, with nuclei (blue) stained by DAPI; D: Quantification of HEV ORF3 fluorescence signal intensity; E: Viral load in stool of HEV-infected mice; F: Viral load in liver tissues of HEV-infected mice. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

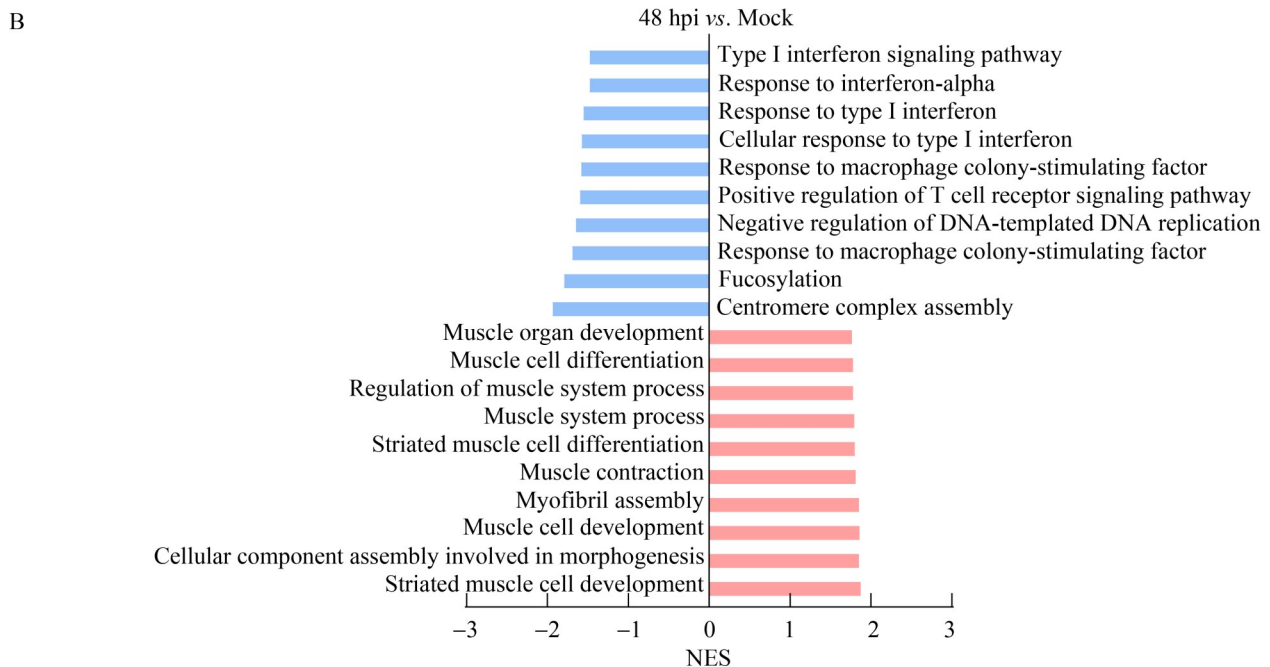
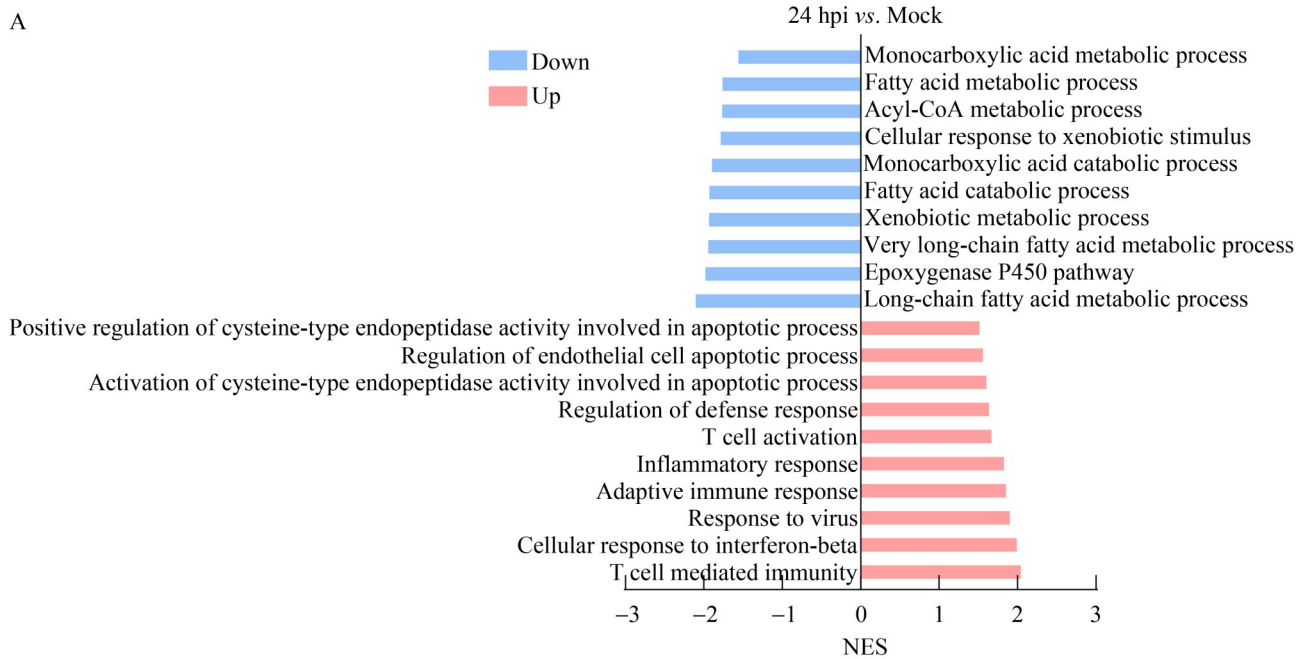
测小鼠粪便及肝脏组织中的 HEV RNA (图 1E、1F)。结果显示, 与对照组相比, HEV 感染组肝脏组织中可检测到 HEV ORF3 蛋白, 且 48 hpi 感染组 BALB/c 小鼠肝脏中检测到的 HEV 抗原多于 24 hpi 感染组(图 1B、1D)。上述结果表明, HEV 感染的 BALB/c 小鼠模型构建成功。

2.2 HEV 感染 BALB/c 小鼠后上调 Agap2 的表达

本研究利用成功构建的 HEV 感染 BALB/c 小鼠模型, 获取全转录组测序结果。通过对 24 hpi 感染组与对照组、48 hpi 感染组与对照组的数据进行 GSEA 富集分析, 探究 2 个时间点

HEV 感染对通路的影响。分析结果显示, 感染早期 T 细胞介导的相关免疫通路反应较为活跃, 脂肪酸代谢、异生物质代谢等相关通路受抑制, 提示肝细胞代谢受到干扰, 可能引发脂毒性、氧化应激, 成为肝细胞凋亡启动的潜在因素。同时, 与凋亡相关的通路也处于激活状态, 提示 HEV 感染早期可能启动了肝细胞凋亡程序。

此外, 炎症反应、干扰素应答等通路处于激活状态, 反映机体抗病毒免疫被激活, 适应性免疫启动, 而持续的炎症和免疫激活可能与后续肝纤维化密切相关(图 2A)。随着感染时间增加富集通路显示肌肉分化相关通路显著富集[标准化富集得分(normalized enrichment score, NES)> 1.5], 提示可能存在肝星状细胞向肌成纤维细胞



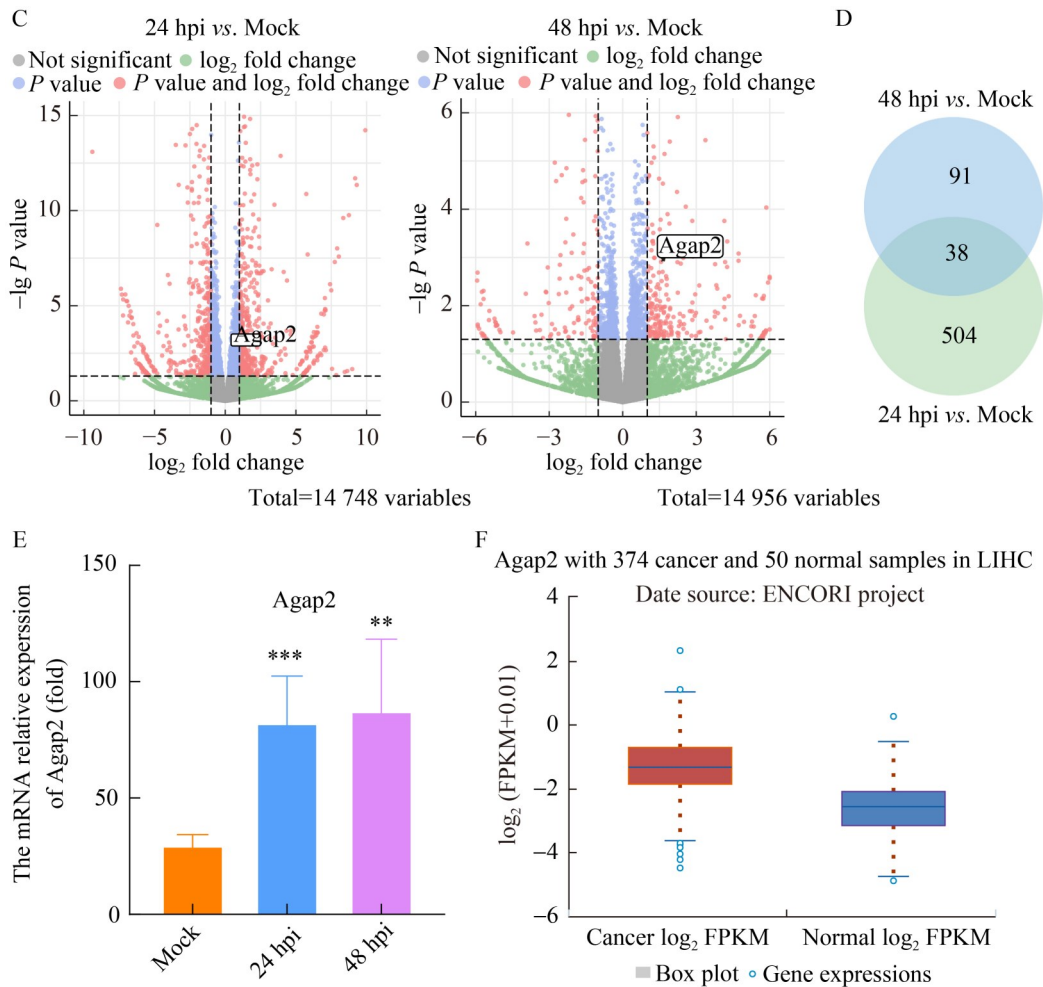


图2 差异基因Agap2的筛选

Figure 2 Gene sequencing screening for differential gene Agap2. A: Gene functional enrichment analysis comparing the 24 hpi infected group with the control group; B: Gene functional enrichment analysis comparing the 48 hpi infected group with the control group; C and D: Volcano plot and Venn diagram highlighting Agap2 as a differentially expressed gene at both infection time points; E: Relative mRNA expression levels of Agap2 at different time points (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$); F: Analysis of the ENCORI database indicating upregulated Agap2 expression in patients with liver hepatocellular carcinoma (LIHC).

的转分化，这是肝纤维化进程中的重要节点(图 2B)。

为确定 HEV 感染影响的关键基因，基于转录组测序数据绘制火山图。与对照组相比，24 hpi 感染组鉴定出 542 个显著上调的差异表达基因，48 hpi 感染组鉴定出 129 个显著上调的差异表达基因(图 2C)。进一步通过韦恩分析发现，HEV

感染后共有 38 个上调的差异表达基因，其中与纤维化密切相关的 Agap2 表达显著升高(图 2D)。Agap2 mRNA 水平在 24 hpi 感染组和 48 hpi 感染组的肝脏组织中均显著上升($P=0.0003$, $P=0.0019$) (图 2E)。此外，根据 ENCORI 数据库的分析结果，Agap2 在肝癌组织样本中的基因表达同样高于正常组织样本(图 2F)。另一项关于人类纤维

化的基因芯片研究也表明, Agap2 的敲低能够部分阻止 TGF β 1 介导的纤维化基因 ACTA2、COL1A2、PDGFB 的表达^[14]。综上所述, 提示 Agap2 或许在 HEV 感染后的肝脏病变进程中发挥重要的调控作用。

2.3 HEV 慢性感染导致小鼠肝纤维化, 其病毒载量与 Agap2 的表达呈正相关

为探究小鼠经 HEV 慢性感染后是否会导致肝纤维化, 本研究构建了 HEV 持续性感染 BALB/c 小鼠模型。对 HEV 感染不同时间的 BALB/c 小鼠肝脏进行 HEV 抗原标记, 发现 HEV 成功感染并持续性感染小鼠(图 3A)。同时, 采用实时荧光定量 PCR 检测 HEV RNA 及 Agap2 的表达, 对二者进行相关性分析发现, HEV 载量与 Agap2 的表达呈正相关($r=0.797\ 4$, $P<0.000\ 1$) (图 3B)。此外, 利用 Huh 7.5.1 和 LX-2 细胞系进行体外实验验证, 通过实时荧光定量 PCR 检测 HEV RNA 及 Agap2 的表达, 对二者进行相关性分析发现与 HEV 感染小鼠模型中相似的结果, 即 HEV 载量与 Agap2 的表达呈正相关($r=0.968\ 3$, $P=0.002\ 4$; $r=0.683\ 5$, $P=0.006\ 5$) (图 3C、3D)。

对未感染 HEV 的 BALB/c 小鼠, 以及 85、126、184、210、240 dpi 感染组的小鼠肝脏进行免疫组化检测, 发现发生肝纤维化, 肝星形细胞激活的标志蛋白质 α -SMA 的表达随着 HEV 感染时间增加而增加(图 4A、4B)。为进一步检测小鼠肝脏的纤维化情况, 对小鼠肝脏进行 Masson 染色, 发现 HEV 慢性感染后小鼠肝组织逐渐发生纤维化, 且随着 HEV 感染时间延长, 小鼠肝脏的纤维化程度逐渐增强(图 4C、4D), 同时, 肝脏的凋亡程度也随之增加(图 4E、4F)。雷达图显示出对照组与慢性感染组以上指标的整体变化情况(图 4G)。上述结果表明, HEV 慢性感染导致小鼠发生肝纤维化, 体内外实验中 HEV 载量与 Agap2 的表达呈正相关。

3 讨论与结论

HEV 是一种单链 RNA 病毒, 是全球急性病毒性肝炎的主要病原体^[22]。然而, 在免疫功能低下的个体中它可能会发展为慢性肝炎^[23], 最终进展为肝纤维化、肝硬化, 甚至增加患肝细胞癌的风险^[21,24], 严重时可能导致死亡。目前, HEV 导致纤维化的致病机制尚不明确, 因此亟需研究病毒与宿主的相互关系, 进而揭示病毒导致纤维化的机制, 为深入研究 HEV 致纤维化提供新方向。Agap2 通过介导不同的信号调控途径参与多种生物学功能, 如细胞增殖、细胞存活、细胞迁移和受体运输等, 其表达已在多种人类肿瘤及其他病理情况中进行了研究^[25]。研究发现 Agap2 的表达水平在几种癌症(前列腺癌、胶质母细胞瘤及其他肿瘤)中升高, 且与肿瘤进展相关^[11]。同时, 也有报道指出 Agap2 与肝纤维化有关^[8], 但具体机制尚不清楚。

本实验室成功构建了 BALB/c 小鼠感染 HEV 模型, 并对 24 hpi、48 hpi 感染组的小鼠肝脏进行全转录组测序, 分析发现 Agap2 表达异常升高, 结合 GO 数据库 GSEA 富集分析发现 HEV 感染后富集到免疫反应、炎症、肝纤维化以及凋亡等相关通路。进一步构建 BALB/c 小鼠 HEV 慢性化感染模型, 结果显示 HEV 成功持续性感染小鼠, 并导致小鼠肝脏纤维化。因此, 本研究揭示了 HEV 感染造成的肝纤维化中 Agap2 表达量的变化情况。首先, 通过免疫组化与 Masson 染色证明 HEV 慢性感染可导致小鼠肝脏纤维化, 且随着 HEV 感染时间的延长, 纤维化程度逐渐加重。此外, 根据实时荧光定量 PCR 检测不同时间点小鼠肝组织中 Agap2 的表达与 HEV 载量, 结果发现 Agap2 的表达与 HEV 载量呈正相关。随后在体外实验中, 利用 Huh 7.5.1 和 LX-2 细胞系进一步验证 Agap2 表达与 HEV 载量的关系, 发现与体内实验结果一致, 表明 HEV 载量与 Agap2 的表达存在一定关联。以往研究报道表明, Agap2 参与调控纤维化

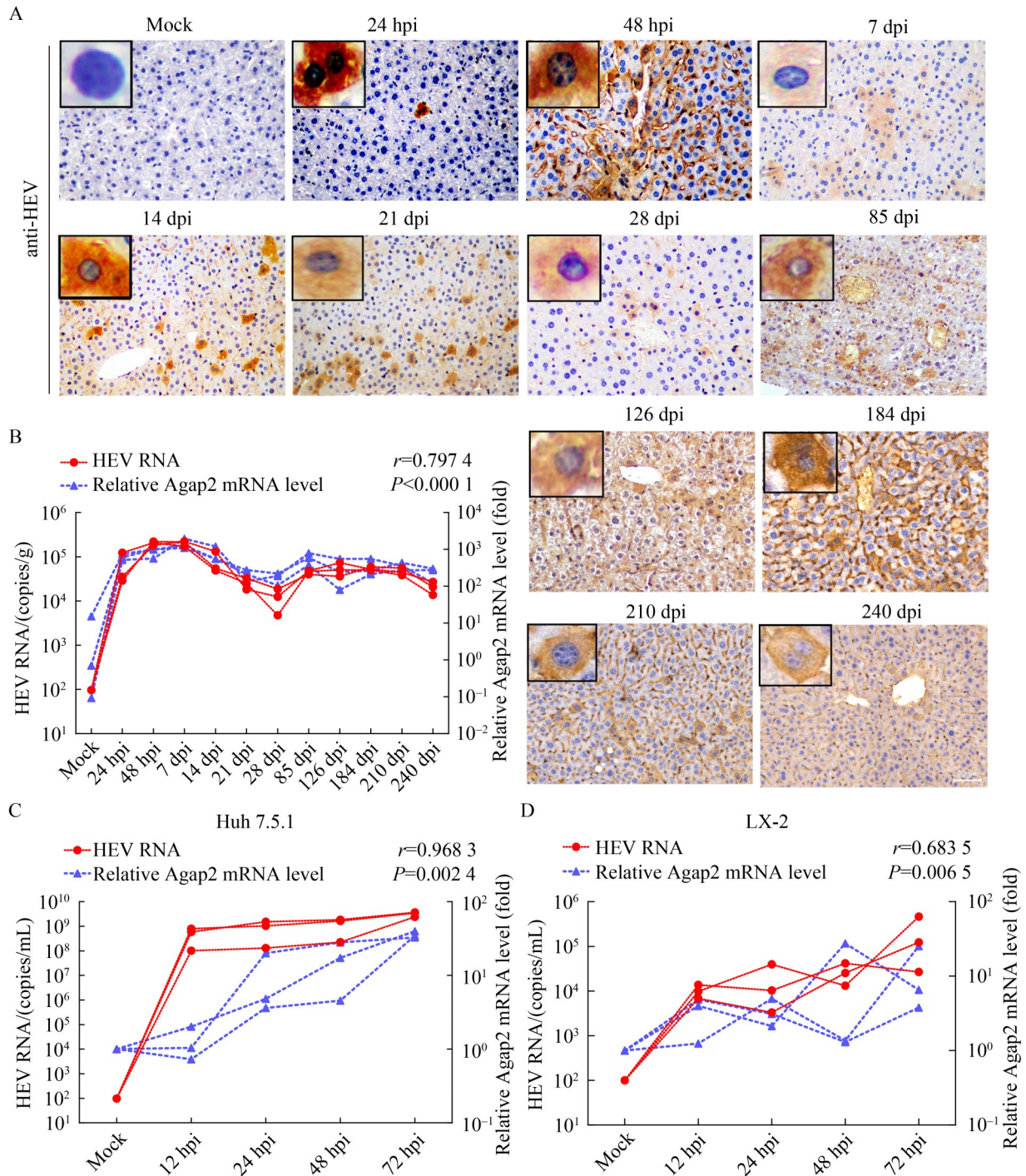


图3 HEV慢性感染小鼠模型

Figure 3 Chronic HEV infection mode. A: BALB/c mouse model of chronic HEV infection was successfully established; B: Correlation analysis between hepatic HEV RNA levels and relative Agap2 mRNA expression at different time points; C and D: *In vitro* validation of the correlation between viral load and Agap2 expression in cell experiments (Huh 7.5.1 and LX-2 cell lines).

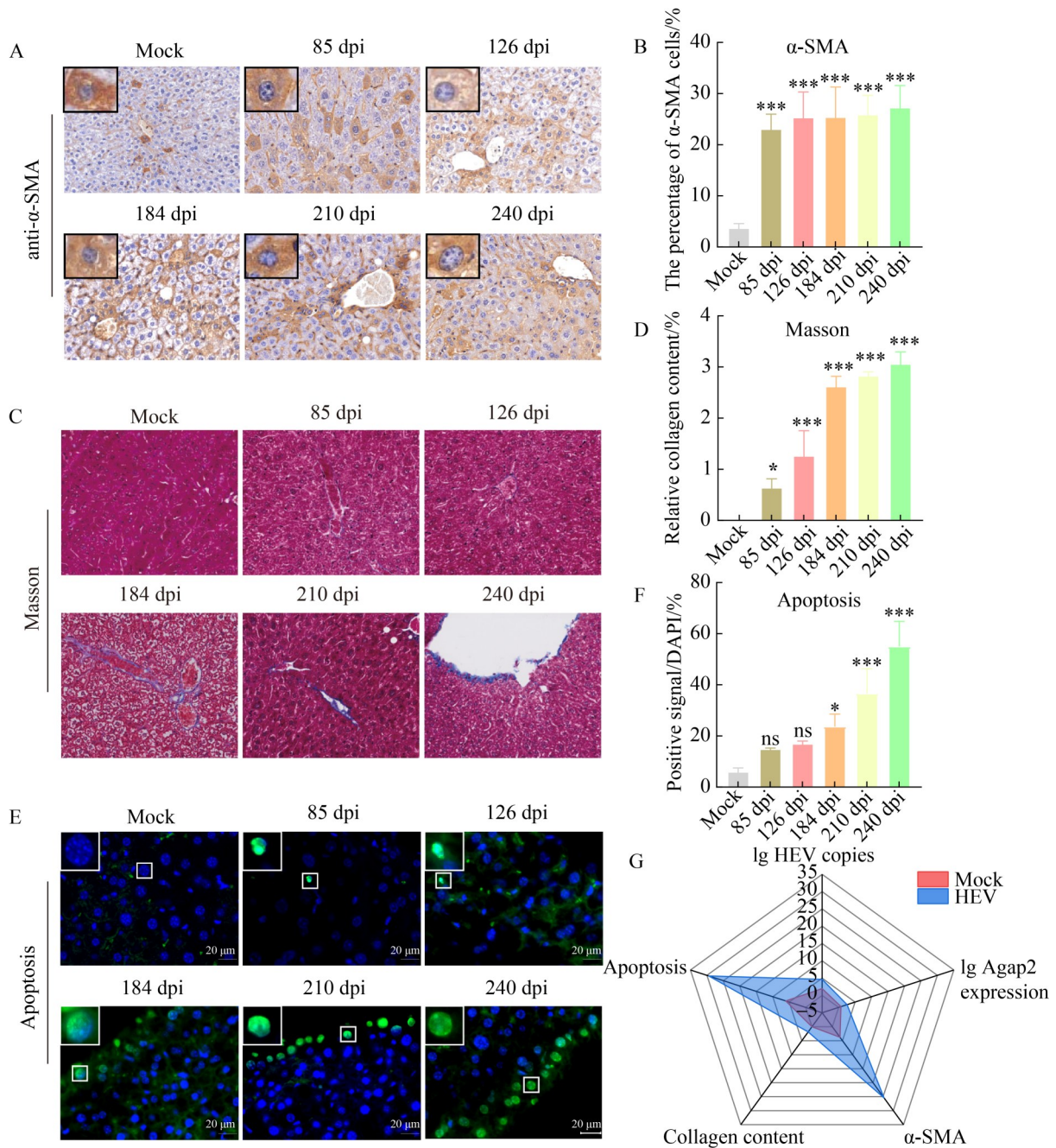


图4 HEV慢性感染小鼠肝纤维化

Figure 4 Liver fibrosis in mice with chronic HEV infection. Immunohistochemistry, Masson's trichrome staining, and immunofluorescence were used to detect α -SMA in the livers of BALB/c mice from the control group and the HEV chronically infected group (A), perform liver histopathological analysis (C), and conduct apoptosis detection (E); B: Percentage of α -SMA-positive cells; D: Masson's trichrome staining score; F: Percentage of apoptosis-positive signals, with nuclei (blue) labeled by DAPI staining; G: Radar chart comparing overall features between control and infected groups (85–240 dpi). ***: $P < 0.001$; *: $P < 0.05$; ns: No significant difference.

的 TGF β 信号通路^[8]。在 LX-2 细胞中, Agap2 沉默可抑制 TGF β 1 诱导的 I 型胶原蛋白水平上升, 而过表达则增强其表达^[25]。在药物诱导的肝纤维化动物模型中, 硫代乙酰胺、四氯化碳处理可上调 Agap2 的表达^[14,25]。然而, Agap2 在 HEV 慢性化感染过程中的具体作用尚未明确。一方面, 受限于 HEV 对 C57/BL6 小鼠不易感, 且目前缺乏 Agap2 条件性敲除或全身性敲除的 BALB/c 小鼠; 另一方面, 慢性 HEV 感染需持续 3–6 个月检测到 HEV 复制, 造模周期较长。因此, 后续拟筛选出可长期使用、低毒性的药物抑制剂和激活剂对小鼠进行处理, 然后开展进一步检测以深入探究 Agap2 在 HEV 慢性感染中表达调控及功能执行的分子机制。

总体而言, 本研究发现在 HEV 慢性感染引起的小鼠肝脏纤维化中 Agap2 的表达与 HEV 载量呈正相关性, 这为今后研究 Agap2 与 HEV 的相互作用, 明确 HEV 导致纤维化的具体致病机制提供了新的思路。

作者贡献声明

户晓霞: 提出概念, 实验验证, 数据收集与数据分析, 撰写文章; 薛媛文: 实验验证, 数据收集与数据分析, 撰写文章; 黄芬: 项目管理, 提供资源, 获取基金, 监督管理。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Lurje I, Gaisa NT, Weiskirchen R, Tacke F. Mechanisms of organ fibrosis: emerging concepts and implications for novel treatment strategies[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2023, 92: 101191.
- [2] Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [3] Wang Z, Du KL, Jin NK, Tang B, Zhang WW. Macrophage in liver fibrosis: identities and mechanisms[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 120: 110357.
- [4] Zhang CY, Yuan WG, He P, Lei JH, Wang CX. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(48): 10512-10522.
- [5] Cheng D, Chai J, Wang HW, Fu L, Peng SF, Ni X. Hepatic macrophages: key players in the development and progression of liver fibrosis[J]. *Liver International*, 2021, 41(10): 2279-2294.
- [6] Chen L, Brenner DA, Kisseleva T. Combatting fibrosis: exosome-based therapies in the regression of liver fibrosis[J]. *Hepatology Communications*, 2018, 3(2): 180-192.
- [7] Vesković M, Pejović M, Šutulović N, Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stanojlović O, Mladenović D. Exploring fibrosis pathophysiology in lean and obese metabolic-associated fatty liver disease: an in-depth comparison[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(13): 7405.
- [8] Navarro-Corcuera A, Ansorena E, Montiel-Duarte C, Iraburu MJ. AGAP2: modulating TGF β 1-signaling in the regulation of liver fibrosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1400.
- [9] Chouinard FC, Davis L, Gilbert C, Bourgoin SG. Functional role of AGAP2/PIKE-a in fc γ receptor-mediated phagocytosis[J]. *Cells*, 2022, 12(1): 72.
- [10] Xu ZK, Wang YX, Xu JN, Ang XJ, Ge NX, Xu M, Pei CS. Identify AGAP2 as prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma based on bioinformatics and IHC staining[J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e13543.
- [11] Doush Y, Surani AA, Navarro-Corcuera A, McArdle S, Billett EE, Montiel-Duarte. SP1 and RAR α regulate AGAP2 expression in cancer[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 390.
- [12] Yu L, Gui S, Liu YW, Qiu XY, Zhang GZ, Zhang XA, Pan J, Fan J, Qi ST, Qiu BH. Exosomes derived from microRNA-199a-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit glioma progression by down-regulating AGAP2[J]. *Aging*, 2019, 11(15): 5300-5318.
- [13] Cai Y, Wang JH, Li RL, Ayala G, Ittmann M, Liu MY. GGAP2/PIKE-a directly activates both the Akt and nuclear factor-kappaB pathways and promotes prostate cancer progression[J]. *Cancer Research*, 2009, 69(3): 819-827.
- [14] Navarro-Corcuera A, López-Zabalza MJ, Martínez-Irujo JJ, Álvarez-Sola G, Ávila MA, Iraburu MJ, Ansorena E, Montiel-Duarte C. Role of AGAP2 in the profibrogenic effects induced by TGF β in LX-2 hepatic stellate cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research*, 2019, 1866(4): 673-685.
- [15] Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome[J]. *Virology*, 1991, 185(1): 120-131.
- [16] Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Clinical manifestations, pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infections[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(2): 331.
- [17] Li YL, Long FY, Yang CC, Hao XH, Wu J, Situ JW, Chen SF, Qian ZY, Huang F, Yu WH. BALB/c mouse is a potential animal model system for studying acute and

- chronic genotype 4 hepatitis E virus infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1156.
- [18] Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(8): 859-860.
- [19] Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, Otal P, Esposito L, Durand D, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients[J]. *American Journal of Transplantation*, 2008, 8(8): 1744-1748.
- [20] Damiris K, Aghaie Meybodi M, Niazi M, Pysopoulos N. Hepatitis E in immunocompromised individuals[J]. *World Journal of Hepatology*, 2022, 14(3): 482-494.
- [21] 卢捷, 谢青. 慢性戊型肝炎的诊治进展[J]. *诊断学理论与实践*, 2024, 23(1): 16-22.
- [22] Qian ZY, Li TY, Xia YP, Cong C, Chen SF, Zhang YK, Gong SL, Wang WJ, Liu HC, Chen DX, Zhao WQ, Zhong G, Deng YL, Yu WH, Wei DQ, Yu XW, Huang F. Genotype 4 hepatitis E virus replicates in the placenta, causes severe histopathological damage, and vertically transmits to fetuses[J]. *Journal of Infection*, 2023, 87(1): 34-45.
- [23] Janik MK, Kempńska-Podhorodecka A, Raszeja-Wyszomirska J, Krawczyk M, Milkiewicz M, Milkiewicz P. Previous hepatitis E virus infection is associated with increased liver stiffness in patients with autoimmune hepatitis[J]. *Polish Archives of Internal Medicine*, 2024, 134(5): 16733.
- [24] Xu LD, Xu YF, Zhang F, Xu PL, Wang L. Immunological pathways in viral hepatitis-induced hepato-cellular carcinoma[J]. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences*, 2024, 53(1): 64-72.
- [25] Chen K, Guo WR, Li RX, Han YQ, Gao Q, Wang SZ. Demethylzeylasteral attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by inhibiting AGAP2 mediated signaling[J]. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154349.