DOI: 10.14188/j.1671-8852.2026.0914

丁酸盐改善肝脏缺血再灌注损伤的机制研究

赵含香　李明伟　罗　明　那淑芳　叶啟发
武汉大学中南医院/武汉大学肝胆疾病研究院/武汉大学移植医学中心/移植医学技术湖北省重点实验室　湖北　武汉　430071

摘要　目的：探讨肠道丁酸代谢对肝脏缺血再灌注损伤（IRI）的作用及其分子机制。方法：通过70%肝脏缺血建立小鼠IRI模型，利用链霉素建立的产丁酸菌缺失模型，外源性给予丁酸盐补充干预，检测不同模型下血清转氨酶、病理、凋亡、炎症及线粒体超微结构，结合转录组测序、Western Blot等验证组蛋白去乙酰化酶3(HDAC3)/NF-κB通路的变化。结果：链霉素处理加重了小鼠IRI，转氨酶ALT和AST水平显著升高，肝脏呈现更为广泛的融合性坏死、肝索断裂及剧烈的炎症细胞浸润，细胞凋亡增多，线粒体嵴的崩解与空泡化加重。外源性补充丁酸盐显著逆转了上述病理表型。机制上，丁酸盐抑制HDAC3活性，稳定IκBα，阻断NF-κB p65核转位及下游炎症因子释放。结论：肠道产丁酸菌的缺失会增加IRI易感性。丁酸盐通过抑制HDAC3/NF-κB通路发挥抗炎和保护线粒体作用，围手术期恢复肠道产丁酸菌生态位或补充丁酸盐有望成为减轻肝脏IRI的新策略。

关键词　丁酸盐；肝脏缺血再灌注损伤；肝移植；HDAC3；NF-κB
中图分类号　R575　　**文献标志码**　A

Mechanistic study on the ameliorative effects of butyrate on hepatic ischemia-reperfusion injury

ZHAO Hanxiang, LI Mingwei, LUO Ming, NA Shufang, YE Qifa
Zhongnan Hospital of Wuhan University, Institute of Hepatobiliary Diseases of Wuhan University, Transplant Center of Wuhan University, National Quality Control Center for Donated Organ Procurement, Hubei Key Laboratory of Medical Technology on Transplantation, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the role of intestinal butyrate metabolism in liver ischemia-reperfusion injury (IRI) and its molecular mechanism. **Methods:** A mouse model of IRI was established by 70% liver ischemia. A butyrate-producing bacteria-deficient model was established by streptomycin treatment. Exogenous butyrate supplementation was used for intervention. Serum enzymes, pathology, apoptosis, inflammation and mitochondrial ultrastructure were detected in different models. The changes of histone deacetylase 3 (HDAC3)/NF-κB pathway were verified by transcriptome sequencing and Western Blot. **Results:** Streptomycin treatment aggravated IRI in mice, with significantly increased ALT and AST levels, more extensive confluent necrosis, disrupted hepatic cords and severe inflammatory cell infiltration in the liver, increased apoptosis, and aggravated mitochondrial cristae disintegration and vacuolization. Exogenous butyrate supplementation significantly reversed the above pathological phenotypes. Mechanistically, butyrate inhibited HDAC3 activity, stabilized IκBα,

作者简介：赵含香，女，1999—，医学硕士，主要从事肝脏缺血再灌注研究，E-mail:2326757946@qq.com。
通信作者：叶啟发，E-mail:yqf_china@163.com。

blocked NF-κB p65 nuclear translocation and the release of downstream inflammatory factors. **Conclusion:** The absence of intestinal butyrate-producing bacteria increases the susceptibility to IRI. Butyrate exerts anti-inflammatory and mitochondrial protective effects by inhibiting the HDAC3/NF-κB pathway. Restoring the intestinal butyrate-producing bacteria niche or supplementing butyrate during the perioperative period may become a new strategy to alleviate liver IRI.

Key Words Butyrate; Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury; Liver Transplantation; HDAC3; NF-κB

肝移植是终末期肝病最有效的治疗手段之一[1],但肝移植的术后并发症仍未得到根本解决。其中肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI),仍是影响受者预后和移植物长期存活的重要因素,严重影响终末期肝病患者的治疗效果[2]。IRI可发生于供肝获取、保存及再灌注的全过程,约40%的病例在移植后1周内出现,是移植物无功能、急性排斥和胆道病变的关键风险因素[3]。IRI通常呈现为移植后24~48 h内血清转氨酶水平的急剧攀升以及胆汁分泌量的显著下降。病理学上则可见肝细胞肿胀、坏死、胆汁淤积及不同程度的炎性细胞浸润,其严重程度与冷、热缺血持续时间、供肝质量及受体状态等因素密切相关[4]。冷缺血主要损伤胆管和肝窦内皮细胞[5],热缺血则以肝细胞ATP耗竭和不可逆坏死为主[6]。在IRI过程中,Kupffer细胞、肝窦内皮细胞及中性粒细胞共同放大无菌性炎症[7-8]。肝脏IRI不仅是肝移植围手术期最关键的病理生理事件之一,也是影响移植物短期功能恢复和长期预后。

近年来,"肠-肝轴"理论揭示了肠道微生态对肝脏的重要影响。其中,短链脂肪酸(short-chain fatty acids,SCFAs)是肠道菌群调节肝脏的关键代谢物[9-10],SCFAs之一的丁酸盐因其高生物活性备受关注,该物质主要来源于结肠中厚壁菌门(如普拉梭菌、直肠真杆菌)对膳食纤维的发酵[11-14],其水平受饮食、益生菌、药物及生活方式等因素调节[15]。丁酸盐通过肠-肝轴发挥抗炎和保护肝功能作用,它可强化肠道屏障、抑制炎症因子扩散,促进调节性T细胞活化、抑制Th17反应,并作为内源性组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases,HDAC)抑制剂,通过表观遗传调控炎症通路[16-17]。已有动物实验[18]提示丁酸盐对大鼠IRI有保护作用。荟萃分析亦显示,肝硬化患者粪便丁酸盐水平下降40%~70%,且横断面研究表明,低丁酸盐水平与患者30 d死亡率相关[19-20]。此外,丁酸盐可改善西方饮食诱导的小鼠脂肪性肝炎,减轻肝脏脂肪蓄积及炎症损伤[21]。这些证据共同提示,肠道菌群代谢产物(尤其是丁酸盐)可能在肝损伤与预后中扮演重要角色。

为此,本研究基于链霉素可显著减少Clostridia(梭菌纲)丰度、进而降低产丁酸菌水平的已有报道[22],通过链霉素介导的菌群干预构建产丁酸菌缺失的小鼠模型,旨在明确产丁酸菌减少与肝脏IRI加重之间的关联,并在此基础上评价外源性丁酸盐的保护效应,从HDAC抑制及炎症信号转导角度阐明其分子机制,以期为临床防治肝脏IRI提供新的理论依据和干预策略。

1 材料与方法

1.1 化学试剂与药物 丁酸盐(货号:S102954-500 g)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硫酸链霉素(货号:S8290)购自北京索莱宝科技有限公司;脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS;货号:BS904-10 mg)购自北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 实验动物与处理 本研究选用无特定病原体(SPF)级8周龄C57BL/6雄性小鼠,平均体质量为(20±2) g,适应性喂养1周后进行处理,小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。本实验所有操作规程均严格遵守国家实验动物福利标准,并经武汉大学动物实验伦理委员会审批通过(审批编号:WP20240352)。所有小鼠在术前禁食12 h,自由饮水。夹闭左、中叶肝蒂60 min,再灌注24 h,建立70%肝脏缺血模型。实验分为两部分:第一部分是肠道产丁酸菌缺乏对肝脏IRI的影响(消耗实验),旨在模拟终末期肝病患者产丁酸菌缺乏的病理状态。小鼠随机分为三组(n=8):Sham组行假手术处理,IRI组术前3 d每日给予等量生理盐水灌胃(i.g.),链霉素(Stre)+IRI组于术前连续3 d给予链霉素(1 g·kg^{-1},i.g.)以特异性杀灭产丁酸菌,随后行肝脏IRI手术[22]。第二部分是外源性补充丁酸盐对肝脏IRI的保护作用(治疗实验),旨在评价丁酸盐的干预价

值。小鼠随机分为三组（n=8）：Sham组行假手术处理，IRI组于术前3 d每日给予等量生理盐水灌胃（i. g.），丁酸盐＋IRI组于术前连续3 d给予丁酸盐（0.7 g•kg^{-1}，i. g.）灌胃，随后行肝脏IRI手术。实验完成后进行肝组织与血清的获取。

1.3 肝细胞缺氧复氧模型建立及分组 本研究选用人正常肝细胞（THLE-2细胞）作为体外模型。将细胞以适宜密度接种于六孔板中，采用高糖DMEM培养基（含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗），在37 ℃、5% CO_2的常规条件下培养至对数生长期后进行实验处理。

缺氧/复氧模型的建立，缺氧/复氧实验设置4组：对照组、丁酸盐处理组、单纯缺氧/复氧组、丁酸盐处理组。其中，对照组始终维持在正常培养条件下；丁酸盐处理组为正常培养条件下给予丁酸钠干预；单纯缺氧/复氧组和丁酸盐处理组则采用缺氧处理6 h（在无糖DMEM中，置于三气培养箱，气体环境为5% CO_2和95% N_2），之后更换为常规高糖DMEM，在正常培养条件下（37 ℃、5% CO_2）进行复氧6 h。丁酸盐处理组在缺氧处理前1 h向培养基中添加终浓度为0.5 mmol•L^{-1}的丁酸钠，并于整个缺氧/复氧处理过程中持续作用。每组设置3个生物学重复。

炎症模型的建立，为构建LPS诱导的炎症模型，设置3组：对照组、LPS刺激组、LPS＋丁酸盐处理组。将细胞接种于六孔板中培养贴壁后，对照组更换为正常高糖DMEM培养基；LPS刺激组更换为含有5 μg•mL^{-1} LPS的高糖DMEM培养基；LPS＋丁酸盐处理组更换为同时含有5 μg•mL^{-1} LPS和0.5 mmol•L^{-1}丁酸钠的高糖DMEM培养基。所有组别均在常规培养条件下（37 ℃、5% CO_2）处理24 h，之后收取细胞样本用于后续检测。每组同样设置3个生物学重复。

1.4 HE、TUNEL及免疫组化染色 肝组织样本经4%缓冲多聚甲醛固定、石蜡包埋后，制成4 μm切片。采用低浓度至高浓度梯度乙醇进行脱水处理，脱水后使用二甲苯冲洗，进行石蜡包埋。将石蜡组织切片，依次使用二甲苯、高浓度至低浓度乙醇进行脱蜡至水，蒸馏水冲洗。行常规HE、TUNEL、免疫组化染色并用中性树胶封片，显微镜下观察肝组织病理损伤。镜检后通过图像分析评估炎症及组织损伤程度。免疫组化抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司，稀释比例如下：CD68（1∶3 000），髓过氧化物酶（MPO，1∶500）。

1.5 实时逆转录聚合酶链反应 使用TRIzol试剂按照制造商的说明从肝脏中提取总RNA，并通过逆转录盒逆转录为cDNA（赛维尔生物，武汉）。使用近岸蛋白试剂盒，通过SYBR Green两步法实时荧光定量PCR对小鼠肝脏组织的肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素-6（interleukin-6，IL-6）、白细胞介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）和核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）的mRNA进行定量，对THLE-2细胞的HDAC2、HDAC3、HDAC8、NF-κB抑制因子α（NFKBIA）的mRNA进行定量，引物序列见表1。

表1 引物序列

目的基因	上游引物（5′—3′）	下游引物（5′—3′）
IL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF-α	CCTGTAGCCCACGTCGTAG	GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
NF-κB	AGCGCGGGGACTATGACTT	GCCCGGTTATCAAAAATCGGAT
HDAC2	ATGGACAAGGCCACCCAATG	TTGGCTTTGTGAGGGCGATAG
HDAC3	TCTGCTACTACTACGACGGTGA	TCATTTCTTCGGCAGTGGCT
HDAC8	AGTTCTGCTCGCGTTACACA	CAGAAGCCAGAGGCCTCAAA
NFKBIA	TCATTTTGGGAGGAGGAGGC	ACCACATGCTTCAGATTCCCT

1.6 血清酶检测 采用丙氨酸氨基转移酶（ALT）/天冬氨酸氨基转移酶（AST）赖氏法试剂盒（建成生物，南京）对小鼠肝脏组织进行酶活性定量检测。

1.7 电镜样本制备及观察 于小鼠肝脏组织在冰上快速取出后，立即投入电镜固定液中，在培养皿内将组织切割成1 mm^{3}小块，随后转移至装有新鲜固定液的EP管中，于4 ℃避光保存及固定，随后经锇酸后固定、梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋、超薄切片及醋酸铀-柠檬酸铅双重染色，于透射电镜下观察肝细胞超微结构。

1.8 免疫荧光 实验采用间接免疫荧光法，主要试剂包括以0.01 mol•L^{-1} PBS配制的3% BSA封闭液和1% BSA抗体稀释液。抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号及稀释比例如下：

p-p65(AP0124,1∶200),p65(A19653,1∶100),IκBα(A1187,1∶100),HDAC3(A19537,1∶100)。二抗稀释比例为1∶200～1∶500。

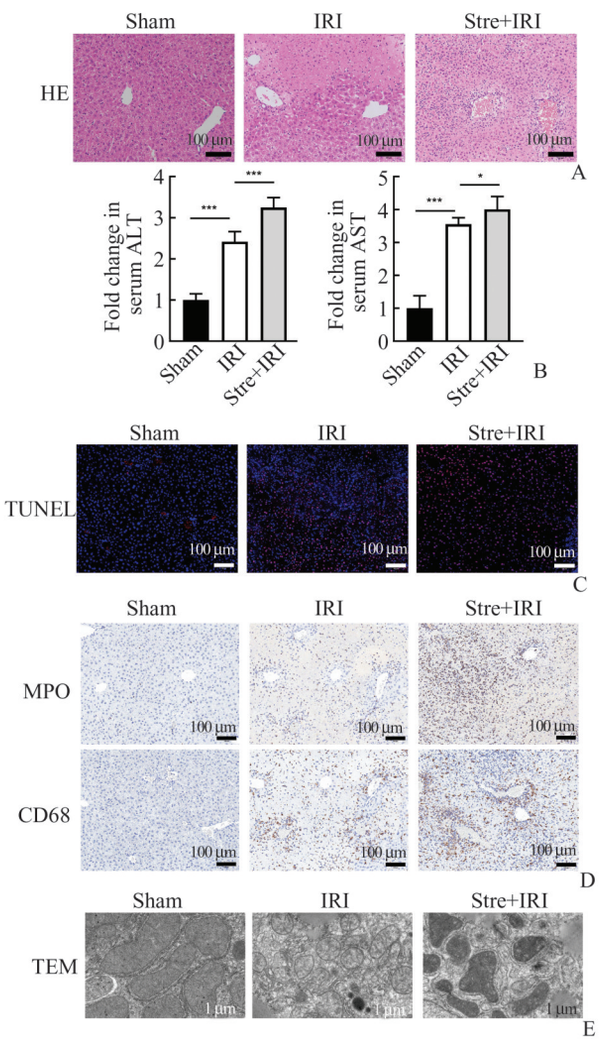
1.9 蛋白质免疫印迹法 本实验采用组织蛋白质提取与Western Blot技术进行蛋白质分析。抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司,稀释比例如下:p-p65(1∶2 000),p65(1∶5 000),IκBα(1∶1 000),GAPDH(1∶5 000)。

1.10 转录组测序 对收集到的肝脏组织进行RNA提取并进行文库构建,使用Illumina等平台对文库进行测序,获得大量短序列(reads),并进行进一步的数据处理与分析。文库构建及测序由武汉百易汇能生物科技有限公司完成。

1.11 统计学方法 本研究采用GraphPad Prism 9统计软件对数据进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA)与Tukey检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 链霉素介导的产丁酸菌缺失显著加重小鼠肝脏缺血再灌注损伤 与Sham组相比,IRI组表现出明显的缺血再灌注病理损伤,包括胞质空泡化、血窦充血以及局灶性肝细胞坏死。研究[22]表明,链霉素可以特异性的杀灭产丁酸菌。在这种产丁酸菌缺乏的情况下,Stre+IRI组病理损伤进一步加重,可检测到大面积的肝细胞融合性坏死、肝索结构严重紊乱以及更为广泛的炎症细胞浸润(图1A)。生化检测结果显示,IRI组小鼠血清中ALT和AST水平显著升高,提示缺血再灌注成功诱导了肝损伤。值得注意的是,与单纯IRI组相比,经链霉素预处理的Stre+IRI组小鼠血清ALT和AST水平升高(图1B)。TUNEL染色结果显示,与Sham组相比,IRI组肝组织内凋亡细胞数量明显增多;而Stre+IRI组TUNEL阳性信号进一步增强,表现为更为密集的荧光红点,提示产丁酸菌缺失显著促进了肝细胞凋亡(图1C)。免疫组化染色显示,与Sham组相比,IRI组肝组织内MPO阳性的中性粒细胞及CD68阳性的巨噬细胞浸润显著增加;而Stre+IRI组炎症细胞浸润进一步加剧,表现为坏死区周围棕褐色颗粒大量聚集且呈簇状分布(图1D)。这一结果表明,肠道菌群失衡导致丁酸盐缺乏,进而诱发了失控的免疫炎症反应并加速了程序性细胞死亡。在细胞超微结构方面,Sham组肝细胞线粒体结构完整,嵴排列整齐;与Sham组相比,IRI组线粒体表现出明显的超微结构损伤,包括线粒体中度肿胀、部分嵴断裂及基质空泡化;而Stre+IRI组线粒体损伤进一步恶化,表现为线粒体极度肿胀甚至崩解、嵴大量消失以及双层膜结构破裂(图1E)。产丁酸菌缺失加重了缺血再灌注诱导的线粒体功能障碍与结构破坏,导致肝细胞能量代谢衰竭并最终促进组织坏死。以上结果表明,清除产丁酸菌群后,肝脏对缺血再灌注激惹的敏感性增加,实质损伤程度显著加剧。

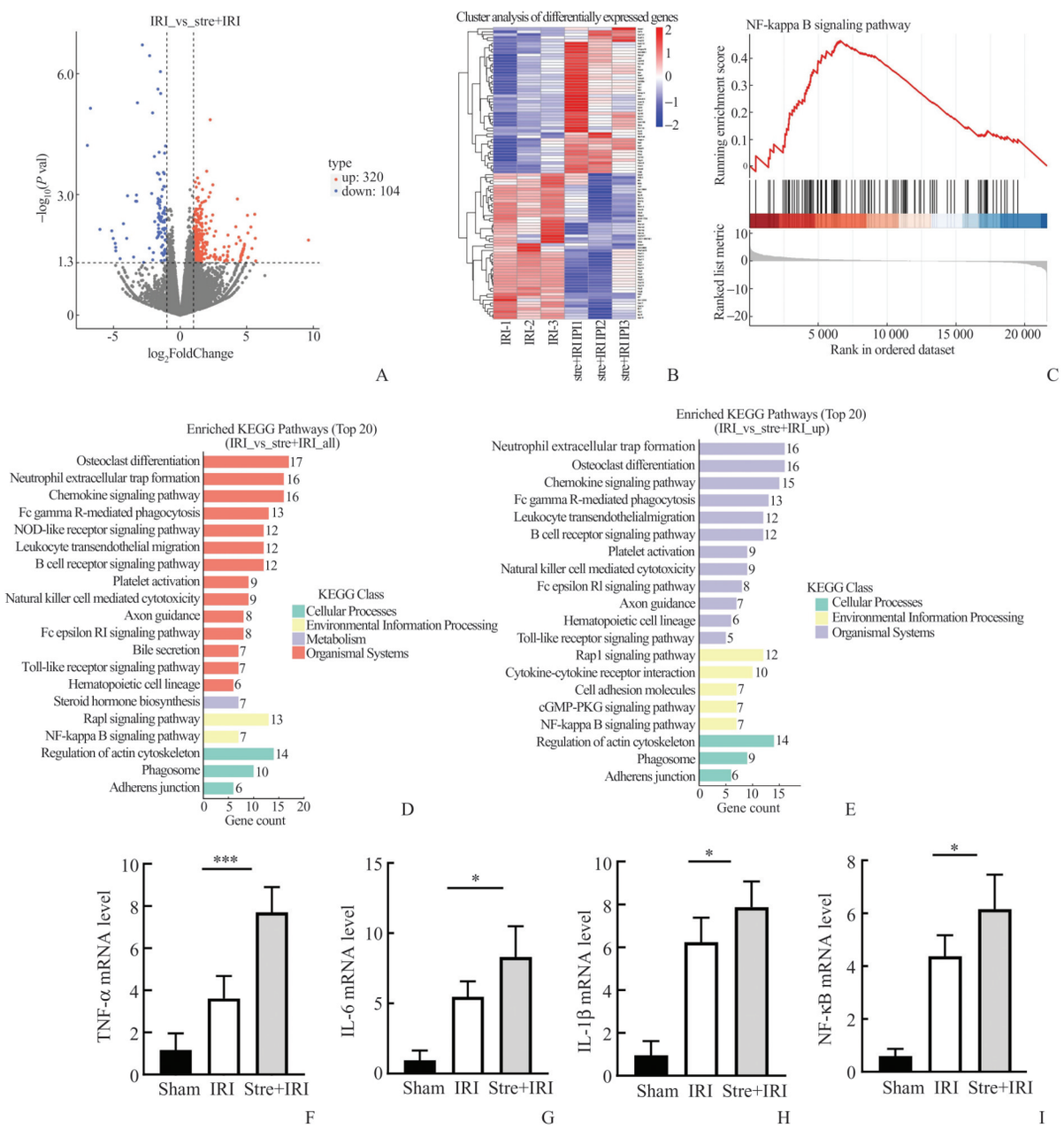


A. 肝组织HE染色;B. 血清ALT、AST水平检测;C. 肝组织TUNEL荧光染色;D. 肝组织MPO及CD68免疫组化染色;E. 肝细胞线粒体电镜扫描图像;$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图1 链霉素介导的产丁酸菌缺失对小鼠肝脏IRI的影响

2.2 产丁酸菌缺失通过激活NF-κB信号通路增强肝脏缺血再灌注后的炎症损伤 为了进一步阐明肠道产丁酸菌缺失加重肝脏IRI的分子机制,进一步对单纯IRI组与Stre+IRI组小鼠的肝组织进行了转录组测序分析。转录组分析结果显示,与单

纯IRI组相比，Stre＋IRI组肝组织的基因表达谱发生了显著改变。火山图显示，两组间共有424个差异表达基因（DEGs），其中320个基因显著上调，104个基因显著下调（图2A）。聚类热图结果进一步证实，Stre＋IRI组与单纯IRI组的差异基因呈现出截然不同的表达模式（图2B）。GSEA富集分析结果显示，NF-κB信号通路在Stre＋IRI组中呈显著富集且高度激活态势（图2C）。Stre＋IRI组上调的差异基因主要集中在炎症与免疫反应相关通路，包括趋化因子信号通路、中性粒细胞胞外陷阱（NETs）形成以及NF-κB信号通路等（图2D、2E）。这一结果表明，清除产丁酸菌导致的肠道微生态失衡，在转录水平上显著诱导了肝脏炎症信号通路的过度激活。



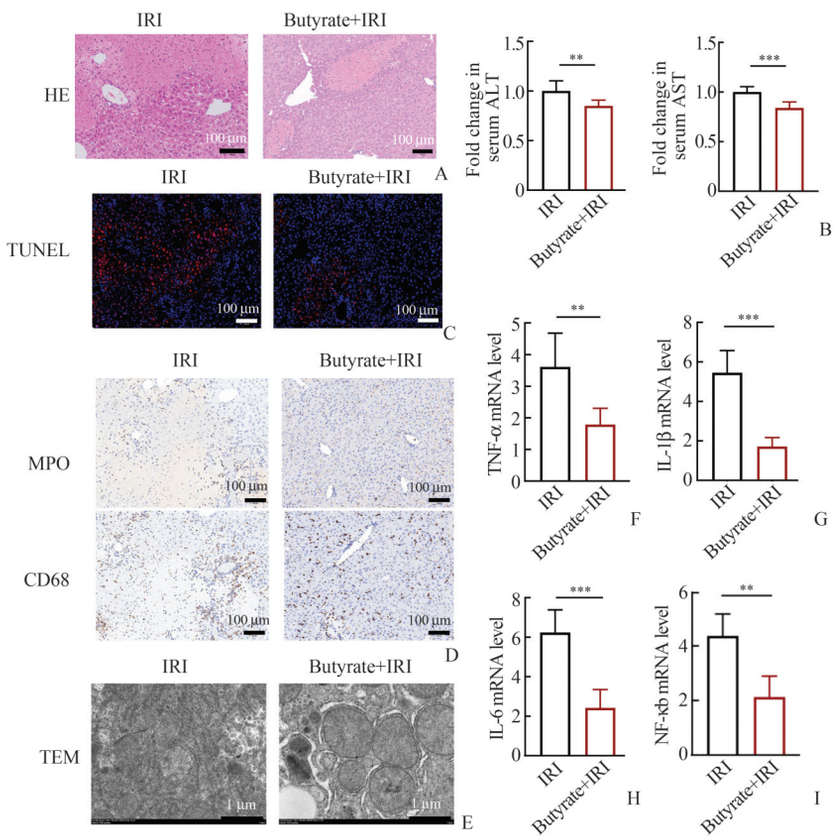
A. 肝脏转录组学火山图；B. 肝脏转录组学聚类热图；C. GSEA富集分析；D、E. KEGG通路图；F～I. 小鼠肝脏组织TNF-α、IL-6、IL-1β及NF-κB的mRNA表达水平；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

图2　产丁酸菌缺失后小鼠肝脏转录组学的变化

与Sham组相比，IRI组小鼠肝组织中促炎因子TNF-α、IL-6、IL-1β及NF-κB的mRNA水平均显著上调，证实了肝脏IRI模型中炎症反应的成功激活。更值得关注的是，与单纯IRI组相比，Stre＋IRI组中

上述促炎因子的表达水平进一步大幅升高(图2F～2I),Stre干预加剧了IRI过程中的炎症损伤。这与转录组测序揭示的信号通路富集特征一致,进一步验证了相关通路在调控炎症反应中的潜在作用。上述结果表明,产丁酸菌缺失显著增强了缺血再灌注诱导的炎症级联反应,与NF-κB信号通路及其下游促炎介质的过度激活相一致。

2.3 外源性补充丁酸盐显著减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤 HE染色结果显示,IRI组表现出明显的肝组织坏死及血窦充血;而丁酸盐+IRI组的病理损伤显著减轻,表现为坏死区域明显缩小、肝细胞排列趋于整齐且空泡化程度减轻(图3A)。与单纯IRI组相比,经丁酸盐预处理的丁酸盐+IRI组小鼠血清ALT和AST水平显著下降(图3B)。外源性补充丁酸盐可有效拮抗缺血再灌注诱导的肝实质损伤,具有显著的肝脏保护作用。



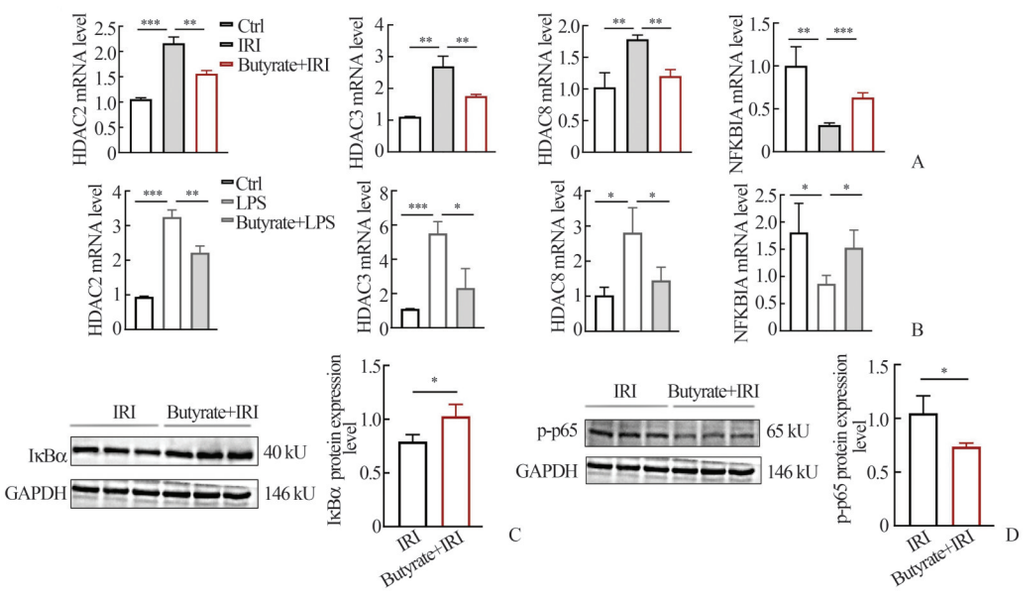
A.肝组织HE染色;B.血清ALT、AST水平检测;C.肝组织TUNEL荧光染色;D.肝组织MPO及CD68免疫组化染色;E.肝细胞线粒体电镜扫描图像;F～I.小鼠肝脏组织TNF-α、IL-6、IL-1β及NF-κB的mRNA水平;$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图3 补充丁酸盐对小鼠肝脏IRI的影响

IRI组肝组织内存在大量的凋亡阳性信号;而丁酸盐+IRI组TUNEL阳性荧光显著减弱,提示丁酸盐有效抑制了缺血再灌注诱导的肝细胞死亡(图3C)。免疫组化染色显示,IRI组肝组织内可见大量MPO阳性的中性粒细胞及CD68阳性的巨噬细胞浸润;而丁酸盐+IRI组的炎症细胞招募显著减少,表现为棕褐色阳性颗粒的数量明显下降且分布稀疏(图3D)。这一结果表明,丁酸盐通过抑制炎症细胞的趋化与激活,在肝脏局部构建了抗炎微环境,从而阻断了炎症级联反应。IRI组线粒体表现出严重的肿胀及嵴断裂;而丁酸盐+IRI组的线粒体超微结构得到了显著改善,表现为线粒体形态基本恢复正常、双层膜结构清晰且嵴排列较为整齐(图3E)。丁酸盐能够有效维持线粒体的结构完整性,保护肝细胞的"能量工厂"免受应激损伤。与单纯IRI组相比,丁酸盐+IRI组小鼠肝组织中促炎因子TNF-α、IL-6及IL-1β及NF-κB mRNA水平显著降低(图3F～3I)。结合前述转录组发现,丁酸盐补充可降低NF-κB信号通路下游促炎因子的转录水平,并减轻肝脏炎症损伤。

2.4 丁酸盐可通过HDAC影响NF-κB来减轻肝脏缺血再灌注损伤 由于丁酸盐是内源性广谱

HDACs抑制剂，首先通过RT-qPCR检测了肝组织中HDAC家族主要成员的表达情况。结果显示，在IRI诱导的肝损伤中，HDAC2、HDAC3和HDAC8的mRNA水平均显著升高（图4A）；然而，在给予丁酸盐干预后，HDAC3的表达下调幅度最为显著。已有文献明确报道HDAC3可通过去乙酰化NF-κB p65亚基负向调控其转录活性[23]。因此，本研究选取HDAC3作为丁酸盐发挥抗炎保护效应的关键靶点，并以此为基础开展后续验证实验。丁酸可通过抑制HDAC3活性，上调NFKBIA（IκBα）的表达，促进p65的胞质滞留，从而抑制其核转位及下游炎症基因的转录，减轻炎症反应。为了排除体内复杂循环系统及多器官相互作用的干扰，进一步引入LPS诱导的肝细胞炎症模型进行体外实验，旨在验证丁酸盐对肝细胞直接的调节作用。结果显示，LPS刺激可显著诱导细胞内HDAC3的高表达，并伴随其下游抑制因子NFKBIA的转录水平下降；而丁酸处理则有效减弱了LPS对NFKBIA的抑制作用（图4B）。



A. THLE-2细胞缺氧复氧（IRI）模型进行丁酸盐干预后各HDAC分子及NFKBIA的mRNA水平变化；B. THLE-2细胞LPS模型HDAC及NFKBIA的mRNA水平变化；C、D. THLE-2细胞缺氧复氧模型进行丁酸盐干预后IκBα及p-p65分子的蛋白表达变化；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

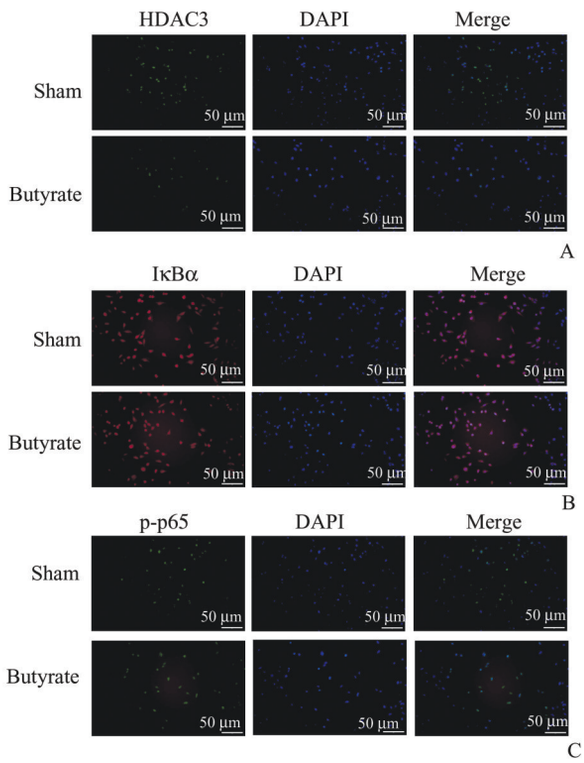
图4　丁酸盐影响NF-κB通路探究

为了揭示HDAC3抑制后如何影响炎症级联反应，后续重点检测了NF-κB通路的激活状态。Western Blot结果显示（图4C、4D），IRI模型中，IκBα蛋白发生大量降解以及p65蛋白的高度磷酸化。而丁酸盐的处理显著逆转了这一过程，表现为IκBα蛋白水平的有效稳固及p-p65水平的显著下降。免疫荧光染色进一步展示，单纯给予丁酸处理可以明显降低HDAC3的蛋白表达，但对IκBα和p65蛋白没有明显影响（图5A～5C）；与Ctrl组相比，IRI组中IκBα的表达明显降低，p65蛋白表现出明显的细胞核聚集（核转位）；而在丁酸盐干预组中，抑制了IκBα的蛋白降解，p65的核转位被显著阻断，蛋白主要留存于细胞质中（图6A、6B）。结果表明丁酸盐通过靶向抑制HDAC3的活性，提升了NFKBIA的转录水平并稳定了IκBα蛋白，从而阻断NF-κB的核转位及下游炎症因子的转录，缓解缺血再灌注诱导的肝脏炎症损伤。

3　讨论

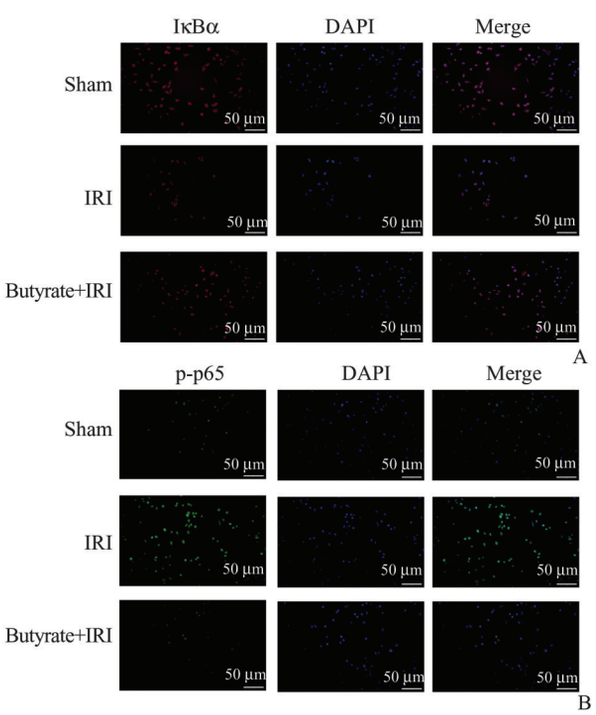
肝脏IRI是肝移植、肝切除等过程中的关键病理事件，涉及氧化应激、炎症级联和细胞死亡。“肠-肝轴”理论提示，肠道菌群代谢物丁酸盐具有肠屏障保护、免疫调节及抗炎作用，从该角度探讨IRI机制具有理论和转化价值[24-27]。

终末期肝病本身已伴随肠屏障受损、内毒素移位及系统性炎症，而丁酸盐缺乏将进一步削弱肠道稳态[28-29]。已有前瞻性研究显示，移植前菌群多样性下降与术后急性排斥、血流感染相关，提示产丁酸菌状态可能与移植预后有关[29-30]，但现有证据多为相关性，菌群差异受抗生素、饮食等多因素影响，尚不能确立独立因果关系。本研究价值在于揭示产丁酸菌缺乏与IRI易感性的内在联系，但其作为



A. THLE-2细胞进行丁酸盐干预后HDAC3分子的免疫荧光结果；B. THLE-2细胞进行丁酸盐干预后IκBα分子免疫荧光结果；C. THLE-2细胞进行丁酸盐干预后p65分子的免疫荧光结果。

图5 丁酸盐通过HDAC3调控NF-κB信号通路



A. THLE-2细胞缺氧复氧模型进行丁酸盐干预后IκBα分子免疫荧光结果；B. THLE-2细胞缺氧复氧模型进行丁酸盐干预后p-p65分子的免疫荧光结果。

图6 细胞IRI模型中丁酸盐对NF-κB信号通路的影响

独立预测指标仍需大样本、多中心队列验证。

在动物实验中，本研究通过链霉素预先模拟产丁酸菌缺失状态，发现其显著加重肝脏再灌注后的生化损伤、细胞凋亡及线粒体超微结构破坏，而外源性丁酸盐可逆转这些改变。尽管既往研究[31]已证实丁酸盐在多种模型中具有抗炎保护效应，但多聚焦于肠道局部。本研究发现其在菌群失衡背景下对肝脏IRI具有保护作用。但在本实验中，链霉素并非特异性针对产丁酸菌，可能影响其他菌群及代谢网络。因此，动物层面的结论支持“产丁酸菌耗竭加重IRI，丁酸盐补充有纠正作用”的观点，但仍需考虑抗生素及菌群重塑等叠加因素。

在机制上，本研究支持HDAC3/NF-κB轴参与丁酸盐的保护作用。IRI过程中NF-κB活化增强并上调TNF-α等炎症基因[32]，而丁酸盐可抑制IκBα降解及p65磷酸化入核，与既往巨噬细胞研究[33]结果一致。丁酸盐对HDAC3/NF-κB轴的调控应视为其抗炎保护的关键环节之一，但NF-κB通路抑制往往伴随氧化应激减轻和细胞死亡减少[34]，这些广泛改善可能是多条通路协同的结果，其它信号可能与丁酸盐一同参与其中。值得注意的是，丁酸盐作为经典的HDAC抑制剂，其对多种HDAC亚型的广谱抑制活性已被证实参与抗炎调控，除HDAC3外，还可通过抑制HDAC1、HDAC2等上调组蛋白乙酰化水平、重塑染色质开放状态，从而调控一系列抗炎基因的表达；此外，丁酸盐亦可通过非HDAC依赖途径（如激活GPR43/GPR109A等短链脂肪酸受体）发挥抗炎效应。因此，丁酸盐的抗炎作用是多重机制共同参与的综合性调控过程，HDAC3/NF-κB轴为其关键组成部分，但并非唯一途径。

电镜结果显示，丁酸盐显著减轻IRI诱导的线粒体肿胀、嵴断裂及膜紊乱，这一结果与综述性证据中炎症减轻与线粒体损伤缓解并行的趋势相一致[5,35]。这一形态学改善可能继发于炎症和氧化应激的整体减轻，尚不能直接证明丁酸盐重塑线粒体代谢程序，其是否通过独立代谢途径发挥作用仍有待深入研究。

从临床转化角度，本研究提示IRI风险评估可适度延伸至肠道微生态与代谢表型。术前评估产丁酸菌状态具有补充现有风险分层体系的潜力。丁酸盐作为生理代谢产物，在通过膳食纤维、益生菌、粪菌移植等恢复产丁酸菌生态位等方面展现出干预前景[25,36]，但其在移植围手术期的真实获益、安

全边界及适用人群仍需大规模前瞻性研究明确。目前更稳妥的立场是：肠道丁酸代谢干预是一个值得深入验证的方向。

本研究在虽验证了HDAC3/NF-κB轴的重要性，但尚未排除HDACs、GPR41/43、PPAR、调节性T细胞等通路的协同作用[36-38]；链霉素模型与临床复杂菌群演变存在差异，未来需借助无菌动物或特定定植模型进一步确证因果链条。此外，本研究未对肠道菌群全貌及产丁酸菌丰度进行系统性检测，这也是当前工作的主要局限性之一。后续研究将进一步结合临床样本与动物模型，深入阐明菌群代谢物在其中的具体作用与机制。

综上所述，肠道产丁酸菌缺失与肝脏缺血再灌注损伤相关。丁酸盐处理与HDAC3下调、IκBα稳定、NF-κB激活受抑及线粒体结构改善相伴发生。这些发现支持丁酸盐通过参与调控炎症放大和细胞器损伤发挥保护作用，为未来针对肠道微生态代谢干预防治肝脏IRI提供了初步的实验依据，其临床应用价值仍有待高质量的前瞻性研究确认。

参考文献

[1] HU X H, CHEN L, WU H, et al. Cell therapy in end-stage liver disease: Replace and remodel[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 141.

[2] DE OLIVEIRA T H C, GONÇALVES G K N. Liver ischemia reperfusion injury: Mechanisms, cellular pathways, and therapeutic approaches[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 150: 114299.

[3] 中华医学会器官移植学分会，中国医师协会器官移植医师分会，中国医师协会器官移植医师分会移植病理学组，等．肝移植常见并发症病理诊断指南(2024版)[J]. 中华消化外科杂志，2024，23(8): 1001-1021.
Chinese Society of Organ Transplantation of Chinese Medical Association, Chinese College of Organ Transplant Physicians of Chinese Medical Doctor Association, Transplant Pathology Group of Chinese College of Organ Transplant Physicians of Chinese Medical Doctor Association, et al. Guidelines for Pathological Diagnosis of Common Complications of Liver Transplantation (2024 Edition)[J]. Chinese Journal of Digestive Surgery, 2024, 23(8): 1001-1021.

[4] DAR W A, SULLIVAN E, BYNON J S, et al. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: Cellular and molecular mechanisms[J]. Liver Int, 2019, 39(5): 788-801.

[5] ZHAI Y, PETROWSKY H, HONG J C, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation: from bench to bedside[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 10(2): 79-89.

[6] ITO T, NAINI B V, MARKOVIC D, et al. Ischemia-reperfusion injury and its relationship with early allograft dysfunction in liver transplant patients[J]. Am J Transplant, 2021, 21(2): 614-625.

[7] CHEN G R, HU X, HUANG Y C, et al. Role of the immune system in liver transplantation and its implications for therapeutic interventions[J]. MedComm, 2023, 4(6): e444.

[8] PENG Y M, YIN Q, YUAN M X, et al. Role of hepatic stellate cells in liver ischemia-reperfusion injury [J]. Front Immunol, 2022, 13: 891868.

[9] GAO Y N, YAO Q Q, MENG L, et al. Double-side role of short chain fatty acids on host health via the gut-organ axes[J]. Anim Nutr, 2024, 18: 322-339.

[10] MUKHOPADHYA I, LOUIS P. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and their role in human health and disease[J]. Nat Rev Microbiol, 2025, 23(10): 635-651.

[11] LOUIS P, FLINT H J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 294(1): 1-8.

[12] COPPOLA S, AVAGLIANO C, CALIGNANO A, et al. The protective role of butyrate against obesity and obesity-related diseases[J]. Molecules, 2021, 26 (3): 682.

[13] ZHOU D, PAN Q, XIN F Z, et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(1): 60-75.

[14] KALKAN A E, BINMOWYNA M N, RAPOSO A, et al. Beyond the gut: Unveiling butyrate′s global health impact through gut health and dysbiosis-related conditions: A narrative review[J]. Nutrients, 2025, 17(8): 1305.

[15] LA ROSA S L, LETH M L, MICHALAK L, et al. The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β-mannans[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 905.

[16] DE VUYST L, LEROY F. Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifdobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production[J]. Int J Food Microbiol, 2011, 149(1): 73-80.

[17] GUO C, CHE X Y, BRIESE T, et al. Deficient butyrate-producing capacity in the gut microbiome is associated with bacterial network disturbances and fatigue symptoms in ME/CFS[J]. Cell Host Microbe, 2023, 31(2): 288-304. e8.

[18] SNODGRASS J L, VELAYUDHAN B T.

Butyrate-producing bacteria as a keystone species of the gut microbiome: A systemic review of dietary impact on gut-brain and host health[J]. Int J Mol Sci, 2026, 27(3): 1289.

[19] CHANG L Y, LIU Y, LI H P, et al. Gut microbiome and its metabolites in liver cirrhosis: Mechanisms and clinical implications[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2025, 15: 1717696.

[20] ODENWALD M A, RAMASWAMY R, LIN H Y, et al. Fecal butyrate and deoxycholic acid concentrations correlate with mortality in patients with liver disease[J]. Gastro Hep Adv, 2025, 4(8): 100695.

[21] JIN C J, SELLMANN C, ENGSTLER A J, et al. Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. Br J Nutr, 2015, 114(11): 1745-1755.

[22] BYNDLOSS M X, OLSAN E E, RIVERA-CHÁVEZ F, et al. Microbiota-activated PPAR-γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion[J]. Science, 2017, 357(6351): 570-575.

[23] LEUS N G, ZWINDERMAN M R, DEKKER F J. Histone deacetylase 3 (HDAC 3) as emerging drug target in NF-κB-mediated inflammation[J]. Curr Opin Chem Biol, 2016, 33: 160-168.

[24] AKHTAR M, CHEN Y, MA Z Y, et al. Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation[J]. Anim Nutr, 2022, 8: 350-360.

[25] PANT K, VENUGOPAL S K, LORENZO PISARELLO M J, et al. The role of gut microbiome-derived short-chain fatty acid butyrate in hepatobiliary diseases[J]. Am J Pathol, 2023, 193(10): 1455-1467.

[26] QIAO Y L, QIAN J M, WANG F R, et al. Butyrate protects liver against ischemia reperfusion injury by inhibiting nuclear factor kappa B activation in Kupffer cells [J]. J Surg Res, 2014, 187(2): 653-659.

[27] HADEM J, KIELSTEIN J T, MANNS M P, et al. Outcomes of renal dysfunction in patients with acute liver failure[J]. U Eur Gastroenterol J, 2019, 7(3): 388-396.

[28] LOUIS P, FLINT H J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota[J]. Environ Microbiol, 2017, 19(1): 29-41.

[29] CHEN J Z, VITETTA L. Gut microbiota metabolites in NAFLD pathogenesis and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5214.

[30] CANFORA E E, JOCKEN J W, BLAAK E E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity[J]. Nat Rev Endocrinol, 2015, 11(10): 577-591.

[31] ARPAIA N, CAMPBELL C, FAN X Y, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation[J]. Nature, 2013, 504(7480): 451-455.

[32] DE OLIVEIRA T H C, MARQUES P E, PROOST P, et al. Neutrophils: A cornerstone of liver ischemia and reperfusion injury[J]. Lab Investig, 2018, 98(1): 51-62.

[33] PERALTA C, JIMÉNEZ-CASTRO M B, GRACIA-SANCHO J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu[J]. J Hepatol, 2013, 59(5): 1094-1106.

[34] XU J, YANG Z, ZENG J H. Role of NF-kappaB in liver ischemia reperfusion injury of rats[J]. Curr Med Sci, 2003, 23(2): 158-160.

[35] ELTZSCHIG H K, ECKLE T. Ischemia and reperfusion: From mechanism to translation[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.

[36] TRIPATHI A, DEBELIUS J, BRENNER D A, et al. The gut-liver axis and the intersection with the microbiome[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(7): 397-411.

[37] ASSIMAKOPOULOS S F, BHAGANI S, AGGELETOPOULOU I, et al. The role of gut barrier dysfunction in postoperative complications in liver transplantation: Pathophysiological and therapeutic considerations[J]. Infection, 2024, 52(3): 723-736.

[38] KATO K, NAGAO M, MIYAMOTO K, et al. Longitudinal analysis of the intestinal microbiota in liver transplantation[J]. Transplant Direct, 2017, 3(4): e144.

(2026-06-02 收稿)
编辑 周 煜