

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.04.016

## 实验研究

肠激安方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征模型大鼠结肠组织 miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK 轴的影响王永福<sup>1</sup>, 柯威<sup>2</sup>, 谢翔雨<sup>3</sup>, 唐洪梅<sup>4</sup>, 司刘哲<sup>1</sup>, 柴玉娜<sup>1</sup>✉

1. 郑州大学第一附属医院, 河南省郑州市建设东路1号, 450052; 2. 佛山市中医院; 3. 广州中医药大学第一临床医学院;  
4. 广州中医药大学第一附属医院

**[摘要]** **目的** 从微小 RNA-29b-3p (miR-29b-3p) /肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF3) /核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) /肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 轴探究肠激安方对肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征 (IBS-D) 肠道通透性影响的可能机制。**方法** 取出生 1 天的雄性 SD 大鼠 24 只, 采用三因素法 (母婴分离+醋酸刺激+束缚应激) 共 6 周制备肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型。造模成功后随机分为模型组、匹维溴铵组和肠激安方低、高剂量组, 每组 6 只, 另取 6 只同龄未造模 SD 大鼠作为对照组。肠激安方低、高剂量组分别给予肠激安方溶液 16.74、33.48 g/(kg·d) 灌胃, 匹维溴铵组大鼠给予匹维溴铵片 0.018 g/(kg·d) 灌胃, 对照组同时予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水灌胃。每日 1 次, 连续 14 天。灌胃结束后, 检测各组大鼠粪便含水量, 采用 ELISA 法检测大鼠血清肠道通透性指标 D-乳酸 (D-LA)、二胺氧化酶 (DAO) 和脂多糖 (LPS) 含量, 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠结肠组织 miR-29b-3p、TRAF3、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、p65、p50、MLCK mRNA 表达, Western Blot 法检测结肠组织 TRAF3、TNF- $\alpha$ 、p65、磷酸化 p65 (p-p65)、MLCK、肌球蛋白轻链 (MLC)、磷酸化肌球蛋白轻链 (p-MLC) 及紧密连接蛋白 [连接黏附因子 A (JAM-A)、闭锁蛋白 (Occludin)、紧密连接蛋白 1 (Claudin-1)] 蛋白水平。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠粪便含水量和血清 D-LA、DAO、LPS 含量均升高, 结肠组织 JAM-A、Occludin、Claudin-1 蛋白水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 结肠组织 miR-29b-3p、TNF- $\alpha$ 、p65、p50、MLCK mRNA 表达升高, TRAF3 mRNA 及蛋白表达降低, TNF- $\alpha$ 、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值升高 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 各给药组大鼠粪便含水量及血清 D-LA、DAO、LPS 含量降低, 结肠组织 miR-29b-3p、TNF- $\alpha$ 、p65、p50、MLCK mRNA 表达降低, TRAF3 mRNA 表达升高; 匹维溴铵组、肠激安方高剂量组大鼠结肠组织 Occludin、Claudin-1、TRAF3 蛋白水平升高, TNF- $\alpha$ 、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与肠激安方低剂量组比较, 肠激安方高剂量组粪便含水量和血清 DAO、LPS 含量降低 ( $P<0.01$ )。与匹维溴铵组比较, 肠激安方高剂量组大鼠血清 DAO 含量降低 ( $P<0.01$ )。**结论** 肠激安方可能通过调控 miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK 轴, 从而降低肝郁脾虚型 IBS-D 模型大鼠肠道通透性, 恢复肠道屏障功能。

**[关键词]** 腹泻型肠易激综合征; 肝郁脾虚型; 肠道通透性; 微小 RNA-29b-3p; 肿瘤坏死因子受体相关因子 3; 核因子  $\kappa$ B; 肌球蛋白轻链激酶; 肠激安方

腹泻型肠易激综合征 (diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, IBS-D) 是一种常见的慢性消化道疾病, 以腹胀、腹痛、腹泻为主要临床特征。现代研究显示, 肠道通透性改变是 IBS-D 的重

要病理机制<sup>[1]</sup>, 血清二胺氧化酶 (DAO)、D-乳酸 (D-LA) 和脂多糖 (LPS) 水平被广泛用来评估肠道细胞损伤和功能障碍<sup>[2]</sup>。微小 RNA (miRNA) 为表观遗传的重要组成部分, 其中微小 RNA-29b-3p (miR-29b-3p) 已被证明与 IBS-D 肠通透性有关<sup>[3]</sup>。miR-29b-3p 及其靶基因肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF3) 能通过调控核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) /肌球蛋

基金项目: 河南省自然科学基金 (242300420397, 242300421271);  
河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20230254)

✉ 通讯作者: yuna999@126.com

白轻链激酶(MLCK)通路影响 IBS-D 肠道通透性<sup>[4]</sup>。IBS-D 的发病机制复杂,而目前西医治疗无法达到根治目的。近年来国内外越来越认识到中医药治疗复杂难治性疾病的优势,中医药在治疗 IBS-D 方面具有综合全面、临床效果好、治疗费用低等优势<sup>[5]</sup>。IBS-D 属于中医学“脾虚”“肠郁”“泄泻”等范畴,肝郁脾虚是其主要证型,疏肝健脾法是 IBS-D 的重要治疗法则<sup>[6]</sup>。肠激安方是我们治疗肝郁脾虚型 IBS-D 的临床验方,动物实验已证明其可显著降低 IBS-D 模型大鼠肠敏感性<sup>[7]</sup>,改善肠道高通透性<sup>[8]</sup>。因此,本研究基于 miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK 轴角度探讨肠激安方对肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠肠道通透性影响的可能作用机制,为肠激安方治疗肝郁脾虚型 IBS-D 的临床应用提供依据。本实验方案经过广州中医药大学第一附属医院伦理审批,伦理审批号:TCMF<sub>1</sub>-2020010。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

出生 1 天的 SPF 级雄性 SD 窝鼠 30 只,购自南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤):2024-0041。动物饲养于广州中医药大学第一附属医院实验动物中心,哺乳期保持母鼠和乳鼠同笼,12 h 光照、黑暗交替环境,温度(23±3)℃,相对湿度(60±5)%,实验期间动物自由摄食饮水。

### 1.2 药物

肠激安方组成:白术 30 g(货号:C200829011)、白芍 15 g(货号:C200817008)、黄芪 15 g(货号:C201218002)、石榴皮 30 g(货号:C200831005)、延胡索 10 g(货号:C200829002)、茯苓 20 g(货号:C200609003)、枳壳 10 g(货号:C200722009)、黄连 5 g(货号:C200806004)、乌梅 15 g(货号:C20101025)、防风 15 g(货号:C200624001)、北柴胡 10 g(货号:C201215014)、陈皮 5 g(货号:C201123014)、甘草 6 g(货号:C201017010)。中药饮片由广州至信中药饮片有限公司生产,经广州中医药大学第一附属医院药检室鉴定合格后使用。取肠激安方饮片,加 4 倍水浸泡 30 min,开始武火煎煮,沸腾后调成文火继续煎煮 40 min,过滤后取药渣用 3 倍水同法煎煮,合并两次滤液,浓缩至生药量为 3.35 g/ml,灌胃前用蒸馏水稀释成所需浓度。匹维溴铵片(50 mg/片,法国 Mylan Laboratories SAS 公司,国药准字 HJ20160396),取匹维溴铵粉末加

入纯水稀释成 1.8 mg/ml 溶液。

### 1.3 主要试剂与仪器

RNA 提取试剂(货号:AG21102)、qPCR 试剂盒(货号:AG11701)、反转录试剂预混液(货号:AG11706),深圳瑞真生物技术有限公司;十二烷基硫酸钠(货号:BS088),碧云天生物技术有限公司;甘氨酸(货号:1275GR500)、琼脂糖(货号:1110GR500)、乙二醇四乙酸(货号:1340GR500),赛国生物科技有限责任公司;醋酸(货号:CB39-AR-0.5L),广州化学试剂厂;戊巴比妥钠(货号:F20030816),中国医药集团上海化学试剂公司;DAO ELISA 试剂盒(货号:ml003420)、D-LA ELISA 试剂盒(货号:ml974725)、LPS ELISA 试剂盒(货号:ml061109),上海酶联生物科技有限公司;磷酸化 p65(p-p65)抗体(货号:AF2006)、TRAF3 抗体(货号:AF5380)、肌球蛋白轻链(MLC)抗体(货号:AF5423)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:AF7021),江苏亲科生物研究中心有限公司;紧密连接蛋白 1(Claudin-1)抗体(货号:ab180158)、闭锁蛋白(Occludin)抗体(货号:ab216327)、连接黏附因子 A(JAM-A)抗体(货号:ab180821),艾博抗(上海)贸易有限公司;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )抗体(货号:BS6000)、p65 抗体(货号:BA0610)、MLCK 抗体(货号:BS71057)、磷酸化肌球蛋白轻链(p-MLC)抗体(货号:BS4845)、抗山羊 IgG 抗体(货号:BS13278),安诺伦(北京)生物科技有限公司。

多功能酶标仪(型号:1510)、PCR 反转录仪(型号:20190403YQ),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96)、电泳仪(型号:552BR),伯乐(上海)生命科学研究发展有限公司;化学发光成像系统(型号:20193445YQ),北京百晶生物技术有限公司;数字病理切片扫描系统(型号:Pannoramic MIDI),匈牙利 3DHISTECH 公司。

### 1.4 造模方法

采用三因素法(母婴分离+醋酸刺激+束缚应激)复制肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型<sup>[9]</sup>。采用随机数字表法选取新生雄性 SD 窝鼠 24 只,从第 2 天起每天母婴分离 3 h,为避免窝鼠对母婴分离操作形成固定时间记忆,故每天分离开始时间随机。2 周后,对幼鼠进行醋酸刺激,将液状石蜡润滑过的导管(直径 1 mm)插入大鼠肛门 2 cm,注入 0.087 mol/L 醋酸,每天 1 次。醋酸起始用量为 0.2 ml,以后每

隔 1 天增加 0.1 ml, 第 7 天开始维持 0.5 ml 用量。每天醋酸刺激之后, 立即用扎带束缚大鼠的前肩、前上肢、胸部 1 h。醋酸刺激和束缚应激共持续 2 周。干预结束之后, 进行 2 周时间的自主恢复。造模 6 周后通过腹部回缩反射 (AWR) 对模型大鼠进行评分<sup>[10]</sup>: 0 分, 球囊扩张刺激无明显反应; 1 分, 刺激时偶尔头动不安; 2 分, 刺激时腹部肌肉开始回缩, 但腹部并未抬离桌面; 3 分, 刺激时腹部肌肉较收缩强烈, 腹部抬离桌面; 4 分, 刺激时腹部肌肉强烈收缩, 腹部弓起。得分 $\geq 2$ 分为造模成功。

1.5 分组及给药方法

24 只窝鼠造模 6 周后全部造模成功, 通过随机数字表法分为模型组、匹维溴铵组和肠激安方低、高剂量组, 每组 6 只。另取 6 只同龄未造模 SD 大鼠作为对照组。造模成功后次日开始给药, 给药剂量依据大鼠临床等效剂量换算<sup>[11]</sup>, 肠激安方低、高剂量组分别给予肠激安方溶液 16.74、33.48 g/ (kg·d) 灌胃, 其中低剂量为临床等效剂量; 匹维溴铵组大鼠给予匹维溴铵片 0.018 g/ (kg·d) 灌胃; 对照组同时予 10 ml/ (kg·d) 蒸馏水灌胃。各组均每天灌胃 1 次, 连续灌胃 14 天。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 粪便含水量 通过粪便含水量评价腹泻程度。最后 1 次给药后, 各组大鼠每笼 1 只分别在代谢笼中放置 60 min, 收集各笼大鼠粪便, 称重记录粪便湿重。待粪便完全干燥后, 再称重记录粪便干重, 计算粪便含水量。粪便含水量= [粪便湿重-粪便干重] ÷粪便湿重×100%。

1.6.2 ELISA 法检测血清肠道通透性指标含量 粪便含水量检测结束后, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 麻醉大鼠。腹主动脉采血 10 ml, 室温静置 60 min, 4℃、3000×g 离心 15 min 取血清。取大鼠血清 200 μl, 按 ELISA 试剂盒说明书进行检测。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔的吸光度值。根据标准品浓度及其对应的吸光度值绘制标准曲线, 并据此计算出血清 D-LA、DAO、LPS 含量。

1.6.3 实时荧光定量 PCR 法检测结肠组织 *miR-29b-3p*、*TRAF3*、*TNF-α*、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达 从结肠末端 1 cm 处向上剪取结肠 2 cm, 称取约 100 mg 放入加有 1 ml RNA 提取试剂的 EP 管, 用 RNA 提取试剂提取总 RNA, 并通过微量分光光度计检测 RNA 的浓度与纯度。随后进行反转录: 对于 *miR-29b-3p*, 采用茎环法结构的特异性引物将其反转录为 cDNA; 对于 *TRAF3*、*TNF-α*、*p65*、*p50*、*MLCK*, 则使用

Oligo dT 或随机引物进行反转录。以 cDNA 为模板, 于实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应, 扩增条件为: 95℃ 10 s, 63℃ 15 s, 68℃ 1 min, 共 40 个循环。扩增结果用 CT 值表示, *miR-29b-3p* 以小核仁 RNA U6(U6) 作为内参基因, *TRAF3*、*TNF-α*、*p65*、*p50*、*MLCK* 以 *GAPDH* 作为内参基因, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各 mRNA 相对表达量。引物序列由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成, 见表 1。

表 1 大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TRAF3*、*TNF-α*、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences of *miR-29b-3p*, *TRAF3*, *TNF-α*, *p65*, *p50*, and *MLCK* mRNA in colon tissue of SD rats

| 基因                | 序列 (5'→3')                     | 长度 /bp |
|-------------------|--------------------------------|--------|
| <i>miR-29b-3p</i> | 上游: CGCGCGCGTAGCACCATTGAAATCAG | 65     |
|                   | 下游: AACGCTTCACGAATTTGCGT       |        |
| <i>U6</i>         | 上游: CTCGCTTCGGCAGCACA          | 82     |
|                   | 下游: AACGCTTCACGAATTTGCGT       |        |
| <i>TRAF3</i>      | 上游: ACTGAGGAGAGACTTGCGGGATC    | 138    |
|                   | 下游: GACACCACCACACAGGGACAATC    |        |
| <i>TNF-α</i>      | 上游: TCAGTTCCATGGCCCAGAC        | 164    |
|                   | 下游: GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT   |        |
| <i>p50</i>        | 上游: GATGGGACGACACCTCTACACATA   | 130    |
|                   | 下游: CCCAAGACTCGTCCAGGTCA       |        |
| <i>p65</i>        | 上游: CGACGTATTGCTGTGCCTTC       | 158    |
|                   | 下游: TTGAGATCTGCCCAGGTGCTA      |        |
| <i>MLCK</i>       | 上游: ATGGGATGTCAGGAGTTTCAG      | 121    |
|                   | 下游: CCTTCTCAGTCAGCACATTAAGT    |        |
| <i>GAPDH</i>      | 上游: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG     | 143    |
|                   | 下游: ATGGTGCTGAAGACGCCAGTA      |        |

注: *miR-29b-3p*, 微小 RNA-29b-3p; *U6*, 小核仁 RNA U6; *TRAF3*, 肿瘤坏死因子受体相关因子 3; *TNF-α*, 肿瘤坏死因子 α; *MLCK*, 肌球蛋白轻链激酶; *GAPDH*, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.6.4 Western Blot 法检测结肠组织 *TRAF3*、*TNF-α*、*p65*、*p-p65*、*MLCK*、*MLC*、*p-MLC* 及紧密连接蛋白 (Claudin-1、Occludin、JAM-A) 蛋白水平 每组采用随机数字法选取 3 只大鼠结肠组织 100 mg, 提取组织蛋白, 用 BCA 法测定其总蛋白含量。蛋白变性后, 经 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 室温下于半干式电转仪上进行转膜, 用 5% 脱脂奶粉封闭后, 加入一抗 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 然后用抗山羊 IgG 抗体 (1:5000) 进行孵育; 最后利用增强型化学发光试剂显影, 在化学发光成像系统 (版本: 20193445YQ) 下采集信号, 目标条带与内参条带的灰度值的比值为目标蛋白相对表达量。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布，以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示，方差齐的多组数据比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 分析；若方差不齐，则用 Dunnett's  $T_3$  法。以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠粪便含水量比较

表 2 示，与对照组比较，模型组大鼠粪便含水量升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，各给药组大鼠粪便含水量均降低 ( $P<0.01$ )；与肠激安方低剂量组比较，肠激安方高剂量组大鼠粪便含水量降低 ( $P<0.05$ )；肠激安方高剂量组和匹维溴铵组大鼠粪便含水量差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 2 各组大鼠粪便含水量比较

Table 2 Comparison of fecal water content of rats in each group ( $\%$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | 粪便含水量                             |
|----------|----|-----------------------------------|
| 对照组      | 6  | 58.17 $\pm$ 2.44                  |
| 模型组      | 6  | 73.37 $\pm$ 2.55 <sup>a)</sup>    |
| 匹维溴铵组    | 6  | 64.16 $\pm$ 1.09 <sup>b)</sup>    |
| 肠激安方低剂量组 | 6  | 65.08 $\pm$ 2.56 <sup>b)</sup>    |
| 肠激安方高剂量组 | 6  | 62.29 $\pm$ 1.89 <sup>b) c)</sup> |

注：a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与肠激安方低剂量组比较， $P<0.05$ 。

### 2.2 各组大鼠血清肠道通透性相关指标比较

表 3 示，与对照组比较，模型组大鼠血清 D-LA、DAO、LPS 含量均升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，各给药组大鼠血清 D-LA、DAO、LPS 含量均降低 ( $P<0.01$ )；与肠激安方高剂量组比较，肠激安方低剂量组大鼠血清 DAO、LPS 含量升高，匹维溴铵组大鼠血清 DAO 含量亦升高 ( $P<0.01$ )。

### 2.3 各组大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TRAF3*、*TNF- $\alpha$* 、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达比较

表 4 示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TNF- $\alpha$* 、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达升高，*TRAF3* mRNA 表达降低 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，各给药组大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TNF- $\alpha$* 、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达降低，*TRAF3* mRNA 表达升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )；各给药组大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TRAF3*、*TNF- $\alpha$* 、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

### 2.4 各组大鼠结肠组织 TRAF3、TNF- $\alpha$ 、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值比较

表 5 示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织 TRAF3 蛋白水平降低，TNF- $\alpha$ 、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，匹维溴铵组、肠激安方高剂量组大鼠结肠组织 TRAF3 蛋白水平升高，TNF- $\alpha$ 、MLCK 蛋

表 3 各组大鼠血清肠道通透性相关指标比较

Table 3 Comparison of serum intestinal permeability-related indicators in each group of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | D-LA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | DAO/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ | LPS/EU $\cdot\text{L}^{-1}$      |
|----------|----|-----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 对照组      | 6  | 4.98 $\pm$ 0.27                         | 5.67 $\pm$ 0.16                     | 1.41 $\pm$ 0.45                  |
| 模型组      | 6  | 8.19 $\pm$ 0.41 <sup>a)</sup>           | 9.66 $\pm$ 0.22 <sup>a)</sup>       | 4.45 $\pm$ 0.37 <sup>a)</sup>    |
| 匹维溴铵组    | 6  | 5.85 $\pm$ 0.35 <sup>b)</sup>           | 6.90 $\pm$ 0.28 <sup>b) c)</sup>    | 2.50 $\pm$ 0.39 <sup>b)</sup>    |
| 肠激安方低剂量组 | 6  | 5.74 $\pm$ 0.30 <sup>b)</sup>           | 7.05 $\pm$ 0.21 <sup>b) c)</sup>    | 2.74 $\pm$ 0.33 <sup>b) c)</sup> |
| 肠激安方高剂量组 | 6  | 5.57 $\pm$ 0.38 <sup>b)</sup>           | 6.45 $\pm$ 0.20 <sup>b)</sup>       | 2.10 $\pm$ 0.23 <sup>b)</sup>    |

注：D-LA，D-乳酸；DAO，二胺氧化酶；LPS，脂多糖。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与肠激安方高剂量组比较， $P<0.01$ 。

表 4 各组大鼠结肠组织 *miR-29b-3p*、*TRAF3*、*TNF- $\alpha$* 、*p65*、*p50*、*MLCK* mRNA 表达比较

Table 4 The mRNA expressions of *miR-29b-3p*, *TRAF3*, *TNF- $\alpha$* , *p65*, *p50* and *MLCK* in the colon tissues ( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 鼠数 | <i>miR-29b-3p</i>             | <i>TRAF3</i>                  | <i>TNF-<math>\alpha</math></i> | <i>p65</i>                    | <i>p50</i>                    | <i>MLCK</i>                   |
|----------|----|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 对照组      | 6  | 1.00 $\pm$ 0.31               | 1.02 $\pm$ 0.20               | 1.00 $\pm$ 0.43                | 1.00 $\pm$ 0.18               | 1.00 $\pm$ 0.13               | 1.00 $\pm$ 0.11               |
| 模型组      | 6  | 3.77 $\pm$ 0.67 <sup>a)</sup> | 0.43 $\pm$ 0.16 <sup>a)</sup> | 3.54 $\pm$ 0.73 <sup>a)</sup>  | 5.41 $\pm$ 1.54 <sup>a)</sup> | 5.12 $\pm$ 0.81 <sup>a)</sup> | 3.72 $\pm$ 0.35 <sup>a)</sup> |
| 匹维溴铵组    | 6  | 1.99 $\pm$ 0.44 <sup>b)</sup> | 0.77 $\pm$ 0.11 <sup>c)</sup> | 1.39 $\pm$ 0.65 <sup>c)</sup>  | 1.99 $\pm$ 0.41 <sup>b)</sup> | 2.02 $\pm$ 0.40 <sup>c)</sup> | 2.55 $\pm$ 0.48 <sup>c)</sup> |
| 肠激安方低剂量组 | 6  | 2.60 $\pm$ 0.34 <sup>b)</sup> | 0.68 $\pm$ 0.20 <sup>b)</sup> | 2.76 $\pm$ 0.61 <sup>b)</sup>  | 2.63 $\pm$ 1.15 <sup>b)</sup> | 3.71 $\pm$ 0.52 <sup>b)</sup> | 2.86 $\pm$ 0.29 <sup>c)</sup> |
| 肠激安方高剂量组 | 6  | 2.13 $\pm$ 0.54 <sup>b)</sup> | 0.79 $\pm$ 0.10 <sup>c)</sup> | 1.89 $\pm$ 0.68 <sup>c)</sup>  | 2.00 $\pm$ 0.91 <sup>b)</sup> | 2.38 $\pm$ 0.66 <sup>c)</sup> | 2.40 $\pm$ 0.38 <sup>c)</sup> |

注：*miR-29b-3p*，微小RNA-29b-3p；*TRAF3*，肿瘤坏死因子受体相关因子3；*TNF- $\alpha$* ，肿瘤坏死因子 $\alpha$ ；*MLCK*，肌球蛋白轻链激酶。

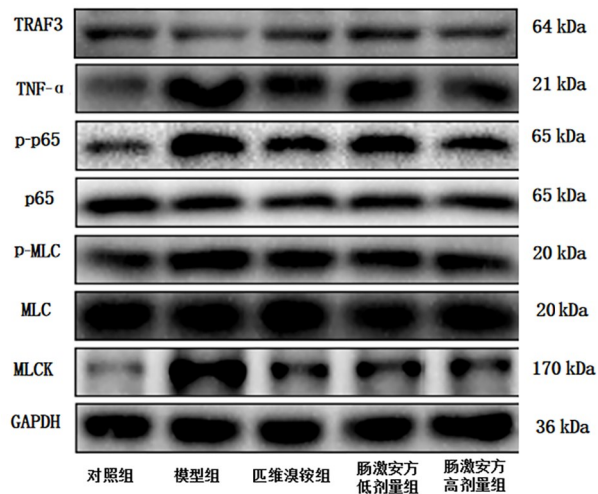
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠结肠组织 TRAF3、TNF-α、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值比较  
Table 5 Comparison of TRAF3, TNF-α and MLCK protein levels, and p-p65/p65, p-MLC/MLC ratios in colonic tissues of rats among different groups (x̄±s)

| 组别       | 鼠数 | TRAF3                   | TNF-α                   | MLCK                    | p-p65/p65               | p-MLC/MLC               |
|----------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 3  | 1.37±0.17               | 0.96±0.08               | 0.29±0.03               | 0.21±0.01               | 0.57±0.09               |
| 模型组      | 3  | 0.93±0.06 <sup>a)</sup> | 1.55±0.15 <sup>a)</sup> | 0.84±0.17 <sup>a)</sup> | 0.61±0.11 <sup>a)</sup> | 0.94±0.05 <sup>a)</sup> |
| 匹维溴铵组    | 3  | 1.26±0.13 <sup>b)</sup> | 1.20±0.07 <sup>b)</sup> | 0.48±0.02 <sup>c)</sup> | 0.38±0.08 <sup>c)</sup> | 0.74±0.05 <sup>b)</sup> |
| 肠激安方低剂量组 | 3  | 1.08±0.21               | 1.34±0.22               | 0.46±0.09 <sup>c)</sup> | 0.43±0.11 <sup>b)</sup> | 0.78±0.14               |
| 肠激安方高剂量组 | 3  | 1.17±0.04 <sup>b)</sup> | 1.17±0.28 <sup>b)</sup> | 0.42±0.00 <sup>c)</sup> | 0.36±0.06 <sup>c)</sup> | 0.76±0.07 <sup>b)</sup> |

注：TRAF3，肿瘤坏死因子受体相关因子 3；TNF-α，肿瘤坏死因子 α；p-MLC，磷酸化肌球蛋白轻链；MLC，肌球蛋白轻链；MLCK，肌球蛋白轻链激酶；p-p65，磷酸化 p65。  
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值降低；肠激安方低剂量组仅 MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65 比值降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。各给药组大鼠结肠组织 TRAF3、TNF-α、MLCK 蛋白水平及 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。各组大鼠结肠组织 TRAF3、TNF-α、p-p65、p65、p-MLC、MLC、MLCK 蛋白电泳图见图 1。



注：TRAF3，肿瘤坏死因子受体相关因子 3；TNF-α，肿瘤坏死因子 α；p-p65，磷酸化 p65；p-MLC，磷酸化肌球蛋白轻链；MLC，肌球蛋白轻链；MLCK，肌球蛋白轻链激酶。

图 1 各组大鼠结肠组织 TRAF3、TNF-α、p-p65、p65、p-MLC、MLC、MLCK 蛋白电泳图  
Figure 1 Electrophoretogram of TRAF3, TNF-α, p-p65, p65, p-MLC, MLC and MLCK proteins in colonic tissues of rats in each group

2.5 各组大鼠结肠组织 JAM-A、Occludin、Claudin-1 蛋白水平比较

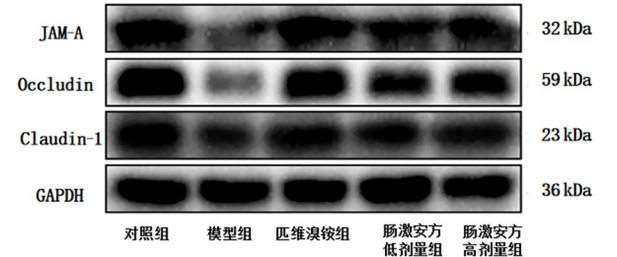
表 6 示，与对照组比较，模型组大鼠结肠组织 JAM-A、Occludin、Claudin-1 蛋白水平降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )；与模型组比较，匹维溴铵组、肠激

安方高剂量组大鼠结肠组织 Occludin、Claudin-1 蛋白水平升高，肠激安方低剂量组大鼠结肠组织 Occludin 蛋白水平升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )；各给药组大鼠结肠组织 Claudin-1、Occludin、JAM-A 蛋白水平差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。各组大鼠结肠组织 Claudin-1、Occludin、JAM-A 蛋白电泳图见图 2。

表 6 各组大鼠结肠组织 JAM-A、Occludin、Claudin-1 蛋白水平比较  
Table 6 The protein expressions of JAM-A, Occludin, Claudin-1 in the colon tissues of rats in each group (x̄±s)

| 组别       | 鼠数 | JAM-A                   | Occludin                | Claudin-1               |
|----------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照组      | 3  | 1.99±0.17               | 1.29±0.09               | 1.89±0.18               |
| 模型组      | 3  | 1.23±0.48 <sup>a)</sup> | 0.52±0.06 <sup>b)</sup> | 1.18±0.06 <sup>b)</sup> |
| 匹维溴铵组    | 3  | 1.71±0.23               | 1.09±0.23 <sup>c)</sup> | 1.65±0.08 <sup>c)</sup> |
| 肠激安方低剂量组 | 3  | 1.35±0.24               | 0.86±0.26 <sup>d)</sup> | 1.32±0.17               |
| 肠激安方高剂量组 | 3  | 1.52±0.63               | 1.08±0.09 <sup>c)</sup> | 1.41±0.08 <sup>d)</sup> |

注：JAM-A，连接黏附因子 A；Occludin，闭锁蛋白；Claudin-1，紧密连接蛋白-1。  
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。



注：JAM-A，连接黏附因子 A；Occludin，闭锁蛋白；Claudin-1，紧密连接蛋白-1。

图 2 各组大鼠结肠组织 JAM-A、Occludin、Claudin-1 蛋白电泳图  
Figure 2 The expressions of JAM-A, Occludin, and Claudin-1 in the colon tissues

### 3 讨论

肠激安方是我们临床治疗肝郁脾虚型 IBS-D 的有效验方, 全方由四君子汤、痛泻要方加减化裁而来。方中白术、白芍补脾燥湿, 柔肝缓急止痛共为君药; 黄芪、茯苓、枳壳行气止痛为臣药; 延胡索、石榴皮、黄连、乌梅、防风清热利湿, 止痛止泻为佐药; 使以柴胡、陈皮、甘草疏肝理气和中, 全方共同达成疏肝健脾止泻的功效。本方已经通过临床前开发获得成果转化<sup>[12]</sup>。前期研究结果<sup>[13]</sup>显示, 肠激安胶囊对肝脾失调型 IBS-D 有一定的治疗效果, 具有止泻、止痛等功效。

目前肠道高通透性及屏障功能受损已成为 IBS-D 发病机制研究的焦点<sup>[14]</sup>。D-LA 及 DAO 水平升高, 反映肠黏膜结构完整性受损<sup>[15]</sup>。同时, LPS 易位也与肠道菌群失调及屏障功能障碍密切相关<sup>[16]</sup>。近年来, miRNAs 作为诊断生物标记物和潜在的治疗靶点已在多种疾病中成为研究热点, 研究<sup>[17]</sup>发现 IBS-D 结肠组织中存在多个差异表达 miRNA。本课题组前期在 IBS-D 患者结肠组织中也筛选出多个差异表达 miRNA, 结果显示 miR-29b-3p 有较大可能性参与 IBS-D 疾病的发生发展<sup>[18]</sup>。既往有研究<sup>[19-20]</sup>显示, miR-29b-3p 可通过靶向 TRAF3 参与 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控, 而该通路在炎症及细胞凋亡中具有核心地位。p65 和 p50 是 NF- $\kappa$ B 信号通路中最经典、最常见的一对功能亚基, 它们通常以二聚体形式 (p65/p50) 构成最主要的 NF- $\kappa$ B 转录因子; NF- $\kappa$ B 激活后可促进 TNF- $\alpha$  等促炎因子表达, 进而激活 MLCK, 诱导 MLC 磷酸化, 破坏紧密连接结构, 最终导致肠道通透性增加<sup>[21-23]</sup>。因此, miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK 轴可能成为 IBS-D 肠道屏障功能障碍的关键调控通路。p65 与 MLC 蛋白发生磷酸化是 NF- $\kappa$ B/MLCK 通路激活的表征, 故本研究通过计算 p-p65/p65、p-MLC/MLC 比值来评估 NF- $\kappa$ B/MLCK 通路激活状态。Claudin-1、Occludin、JAM-A 属于紧密连接蛋白, 其在 IBS-D 黏膜屏障的结构和功能异常有关<sup>[24]</sup>。

本研究采用的三因素造模法 (母婴分离+醋酸刺激+束缚应激) 为本实验室沿用多年的成熟肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠模型制备方法。结果显示, IBS-D 模型大鼠表现出肠道通透性增高, 粪便含水量及血清 DAO、D-LA、LPS 水平升高, 提示肠道屏障受损。同时, 模型组大鼠结肠组织 miR-29b-3p mRNA 表达升高, TRAF3 mRNA 及其蛋白水平均降低, NF- $\kappa$ B/MLCK 通路相关指标如 TNF- $\alpha$ 、MLCK mRNA 及其蛋

白水平升高, p65、MLC 磷酸化水平均升高, 提示该通路被异常激活。此外, 紧密连接蛋白 JAM-A、Occludin、Claudin-1 的表达也降低, 进一步解释了肠道通透性增高的结构基础。经肠激安方干预后, 大鼠肠道通透性指标明显改善, 粪便含水量及血清生物标志物水平趋于正常。在分子层面, 肠激安方可下调 miR-29b-3p mRNA 表达, 提升 TRAF3 mRNA 及其蛋白水平, 并抑制 NF- $\kappa$ B/MLCK 通路的活化, 表现为 TNF- $\alpha$ 、MLCK、p-p65、p-MLC 蛋白的相对水平下降; 同时肠激安方还能上调 Occludin 和 Claudin-1 蛋白水平, 且高剂量效果更为显著, 说明该方对恢复肝郁脾虚型 IBS-D 大鼠结肠组织紧密连接结构具有积极作用。

综上所述, 本研究证实肠激安方可通过调节 miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK 轴, 减轻肠道炎症反应, 修复紧密连接蛋白表达, 最终改善肠道屏障功能, 这可能是该方降低肝郁脾虚型 IBS-D 内脏高敏感性、缓解腹痛腹泻症状的重要机制之一。但该机制通路的关联性及特异性还需要通过模型动物注射相关靶标及其激动剂、抑制剂, 检测上下游相关分子水平的变化来进一步验证其确切调控机制。

所有作者均声明不存在利益冲突。

### 参考文献

- [1] HANNING N, EDWINSON AL, CEULEERS H, et al. Intestinal barrier dysfunction in irritable bowel syndrome: a systematic review[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2021, 14: 1756284821993586. doi: 10.1177/1756284821993586.
- [2] INCZEFI O, EUTAMENE H, PLACIDE F, et al. Translational evaluation of Gelsectan® effects on gut barrier dysfunction and visceral pain in animal models and irritable bowel syndrome with diarrhoea [J]. United European Gastroenterol J, 2024, 12(8): 1102-1113.
- [3] CHEN LJ, PLANTINGA AM, BURR R, et al. Exploration of cytokines and microbiome among males and females with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Dig Dis Sci, 2025, 70(3): 1043-1051.
- [4] WANG YF, KE W, GAN JF, et al. microRNA-29b-3p promotes intestinal permeability in IBS-D via targeting TRAF3 to regulate the NF- $\kappa$ B-MLCK signaling pathway [J]. PLoS One, 2023, 18(7): e0287597.
- [5] 冯奕钧, 焦召华, 李岩. 腹泻型肠易激综合征中医药治疗进展[J]. 中医药学报, 2024, 52(10): 109-114.
- [6] 中华中医药学会脾胃病分会. 肠易激综合征中医诊疗专家共识(2024)[J]. 中医杂志, 2024, 65(18): 1948-1956.

- [7]唐洪梅,黄樱华,李得堂,等. 肠激安方对腹泻型肠易激综合征模型大鼠T淋巴细胞和5-羟色胺的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 164-168, 200.
- [8]石玉莹,唐洪梅,吴映秀,等. 肠激安方对IBS-D大鼠肠道通透性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 80-85.
- [9]涂星. 疏肝健脾止泻复方中药对IBS-D模型大鼠神经-内分泌-免疫网络的调控机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [10]AL-CHAER ED, KAWASAKI M, PASRICHA PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development[J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [11]黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12]唐洪梅,刘友章,曾惠芳,等. 肠激安肠溶胶囊治疗腹泻型IBS临床前开发[Z/OL]. (2008-05-12)[2025-09-04]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=dK-cr\\_PZ1zctzXqtQCxUWTTpS03rqjAMlisqmgCaTNDhQH-vtNoXa3qGbWUJ1kHDL\\_c6gEs99hiVJhZkhynQT3Ig-nrRhgf8NNDc838cYw3Kh\\_VP21LyXpjnBQiXsp0SMH-O4XSODff29IUikWRtnGqX-NZjckaERkFUHQvkdDNB-kT-KS-y81MQDDg==&uniplatform=NZKPT&language=CHS](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=dK-cr_PZ1zctzXqtQCxUWTTpS03rqjAMlisqmgCaTNDhQH-vtNoXa3qGbWUJ1kHDL_c6gEs99hiVJhZkhynQT3Ig-nrRhgf8NNDc838cYw3Kh_VP21LyXpjnBQiXsp0SMH-O4XSODff29IUikWRtnGqX-NZjckaERkFUHQvkdDNB-kT-KS-y81MQDDg==&uniplatform=NZKPT&language=CHS).
- [13]廖小红. 肠激安胶囊对肝脾不调型IBS-D的药理毒理研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [14]MAHURKAR-JOSHI S, RANKIN CR, VIDELOCK EJ, et al. The colonic mucosal microRNAs, microRNA-219a-5p, and microRNA-338-3p are downregulated in irritable bowel syndrome and are associated with barrier function and MAPK signaling [J]. Gastroenterology, 2021, 160(7): 2409-2422.
- [15]LI MY, LIU NH, ZHU JF, et al. Engineered probiotics with sustained release of interleukin-2 for the treatment of inflammatory bowel disease after oral delivery [J]. Biomaterials, 2024, 309: 122584. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2024. 122584.
- [16]ZHOU SY, GILLILLAND M 3RD, WU XY, et al. FODMAP diet modulates visceral nociception by lipopolysaccharide-mediated intestinal inflammation and barrier dysfunction[J]. J Clin Invest, 2018, 128(1): 267-280.
- [17]HOU QK, HUANG YQ, ZHANG CR, et al. microRNA-200a targets cannabinoid receptor 1 and serotonin transporter to increase visceral hyperalgesia in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome rats[J]. J Neurogastroenterol Motil, 2018, 24(4): 656-668.
- [18]LU YY, CHAI YN, QIU JL, et al. Integrated omics analysis reveals the epigenetic mechanism of visceral hypersensitivity in IBS-D [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1062630. doi: 10.3389/fphar. 2023. 1062630.
- [19]JUNG DE, SEO MK, JO JH, et al. PUM1-TRAF3 fusion protein activates non-canonical NF- $\kappa$ B signaling via rescued NIK in biliary tract cancer [J]. NPJ Precis Oncol, 2024, 8(1): 170.
- [20]ZHANG B, SHETTI D, FAN CH, et al. miR-29b-3p promotes progression of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells through downregulating TRAF3 [J]. Biol Res, 2019, 52(1): 38.
- [21]HAQUE M, KAMINSKY L, ABDULQADIR R, et al. Lactobacillus acidophilus inhibits the TNF- $\alpha$ -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability via a TLR-2 and PI3K-dependent inhibition of NF- $\kappa$ B activation [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1348010. doi: 10.3389/fimmu. 2024. 1348010.
- [22]LEE JY, KIM CY. Preventive effects of thinned apple extracts on TNF- $\alpha$ -induced intestinal tight junction dysfunction in caco-2 cells through myosin light chain kinase suppression[J]. Foods, 2022, 11(12): 1714.
- [23]NIGHOT M, RAWAT M, AL-SADI R, et al. Lipopolysaccharide-induced increase in intestinal permeability is mediated by TAK-1 activation of IKK and MLCK/MYLK gene[J]. Am J Pathol, 2019, 189(4): 797-812.
- [24]PICHE T. Tight junctions and IBS: the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? [J] Neurogastroenterol Motil, 2014, 26(3): 296-302.

# Effect of *Changji'an Formula* (肠激安方) on the miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK Axis in Colonic Tissues in Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome Model Rat with Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome

WANG Yongfu<sup>1</sup>, KE Wei<sup>2</sup>, XIE Xiangyu<sup>3</sup>, TANG Hongmei<sup>4</sup>, SI Liuze<sup>1</sup>, CHAI Yuna<sup>1</sup>

1. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450052; 2. Foshan Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine; 4. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine

**ABSTRACT Objective** To explore the potential mechanism of *Changji'an Formula* (肠激安方) on intestinal per-

meability for rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D) of liver depression and spleen deficiency syndrome by the microRNA-29b-3p (miR-29b-3p)/tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/myosin light chain kinase (MLCK) axis. **Methods** Twenty-four 1-day-old male Sprague-Dawley (SD) suckling rats were selected, and the IBS-D rat model of liver depression and spleen deficiency syndrome was established via a three-factor method, i. e. maternal separation plus acetic acid stimulation and restraint stress, for 6 consecutive weeks. After successful modeling, the rats were randomly divided into a model group, pinaverium bromide group, low-dose and high-dose *Changji'an Formula* groups, with 6 rats in each group. Another 6 age-matched non-modeled SD rats were included as the control group. The low-dose and high-dose *Changji'an Formula* groups were given intragastric administration of *Changji'an Formula* solution at doses of 16.74 g/(kg·d) and 33.48 g/(kg·d), respectively; the pinaverium bromide group received intragastric administration of pinaverium bromide tablets at 0.018 g/(kg·d); and the control group was given distilled water at 10 ml/(kg·d) via intragastric gavage. The intervention was conducted once daily for 14 consecutive days. After the gavage treatment, the fecal water content of rats in each group was measured. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum levels of intestinal permeability indicators, including D-lactic acid (D-LA), diamine oxidase (DAO), and lipopolysaccharide (LPS). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was conducted to determine the mRNA expression levels of *miR-29b-3p*, *TRAF3*, tumor necrosis factor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), *p65*, *p50*, and *MLCK* in colonic tissues. Western Blot analysis was employed to detect the protein expression levels of TRAF3, TNF- $\alpha$ , p65, phosphorylated p65 (p-p65), MLCK, myosin light chain (MLC), phosphorylated MLC (p-MLC), and tight junction proteins including junctional adhesion molecule-A (JAM-A), Occludin, and Claudin-1 in colonic tissues. **Results** Compared with the control group, the model group exhibited significantly increased fecal water content and serum levels of D-LA, DAO, and LPS, along with decreased protein expression levels of JAM-A, Occludin, and Claudin-1 in colonic tissues ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Additionally, in the model group, the mRNA expression levels of *miR-29b-3p*, *TNF- $\alpha$* , *p65*, *p50*, and *MLCK* in colonic tissues were up-regulated, while the mRNA and protein expression levels of *TRAF3* were down-regulated; the protein levels of TNF- $\alpha$  and MLCK, as well as the ratios of p-p65/p65 and p-MLC/MLC, significantly elevated ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, all treatment groups showed reduced fecal water content and serum levels of D-LA, DAO, and LPS, along with down-regulated mRNA expression levels of *miR-29b-3p*, *TNF- $\alpha$* , *p65*, *p50*, and *MLCK*, and up-regulated *TRAF3* mRNA expression in colonic tissues. Moreover, the pinaverium bromide group and high-dose *Changji'an Formula* group presented increased protein levels of Occludin, Claudin-1, and TRAF3, as well as decreased protein levels of TNF- $\alpha$  and MLCK, and reduced ratios of p-p65/p65 and p-MLC/MLC in colonic tissues ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the low-dose *Changji'an Formula* group, the high-dose group had lower fecal water content and serum levels of DAO and LPS ( $P < 0.01$ ). In comparison with the pinaverium bromide group, the high-dose *Changji'an Formula* group showed a significant decrease in serum DAO level ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** *Changji'an Formula* can reduce intestinal permeability and restore intestinal barrier function in IBS-D rats of liver depression and spleen deficiency syndrome by regulating the miR-29b-3p/TRAF3/NF- $\kappa$ B/MLCK axis.

**Keywords** diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; liver depression and spleen deficiency syndrome; intestinal permeability; microRNA-29b-3p; tumor necrosis factor receptor-associated factor 3; nuclear factor- $\kappa$ B; myosin light chain kinase; *Changji'an Formula* (肠激安方)

(收稿日期: 2025-09-04; 修回日期: 2025-11-14)

[编辑: 邓媛]