

葛根芩连汤调控 FoxO1/MARCH1 通路对小鼠胰岛素抵抗的改善作用

孙洪平¹, 张会峰¹, 陈 煜¹, 韦 晓¹, 隋 森², 刘 超¹, 范尧夫^{1*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028; 2. 南京中医药大学徐州附属医院, 江苏 徐州 221009)

摘要: **目的** 探讨葛根芩连汤通过调控肝脏叉头框蛋白 O1 (FoxO1)/膜相关环状蛋白 1 (MARCH1) 通路对高脂饮食诱导的小鼠胰岛素抵抗的影响。**方法** 小鼠给予高脂饲料喂养 12 周建立胰岛素抵抗模型, 将 30 只造模成功小鼠随机分为模型组、葛根芩连汤组 (15 g/kg)、吡格列酮 (阳性药) 组 (20 mg/kg), 每组 10 只, 另取 10 只正常小鼠给予普通饲料喂养为正常组, 连续给予相应药物灌胃 8 周, 记录各组小鼠体质量。全自动生化分析仪检测检测甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, ELISA 法检测空腹血清胰岛素 (FINS) 水平并计算稳态模型胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR), 检测腹腔内葡萄糖耐量 (IPGTT) 并计算葡萄糖曲线下面积 (AUC), HE 染色观察肝组织病理学改变, RT-qPCR 法检测肝组织 FoxO1、MARCH1、INSR、IRS1 mRNA 表达, Western blot 法检测肝组织 FoxO1、Ac-FoxO1、MARCH1、INSR α 、INSR β 、IRS1、p-IRS1 蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组小鼠体质量、FINS、TG、TC、LDL-C、HOMA-IR、AUC 均升高 ($P<0.01$), 肝组织细胞结构紊乱, 边界轮廓不清, 排列散乱, 细胞肿大且大小不一, 肝细胞内可见大量脂质空泡, 少量肝细胞出现点状坏死, 肝组织 FoxO1、MARCH1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), INSR、IRS1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), 肝组织 Ac-FoxO1、MARCH1、INSR α 蛋白表达升高 ($P<0.01$), FoxO1、INSR β 、IRS1、p-IRS1 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 葛根芩连汤组小鼠 FINS、TG、TC、LDL-C、HOMA-IR、AUC 均降低 ($P<0.01$), 肝组织细胞形态趋于正常, 脂质空泡数目明显减少, 肝组织 FoxO1、MARCH1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), INSR、IRS1 mRNA 表达升高 ($P<0.01$), 肝组织 Ac-FoxO1、MARCH1 蛋白表达降低 ($P<0.01$), FoxO1、INSR β 、IRS1、p-IRS1 蛋白表达均升高 ($P<0.01$), 而 INSR α 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)。**结论** 葛根芩连汤可以减轻肝脏脂肪变性, 改善胰岛素抵抗, 其机制可能与抑制 FoxO1/MARCH1 通路, 增加胰岛素受体及胰岛素受体底物的表达有关。

关键词: 葛根芩连汤; 胰岛素抵抗; FoxO1/MARCH1 通路; 胰岛素受体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2024)05-1662-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.05.041

中国心脏代谢疾病及肿瘤队列研究显示, 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者最重要的发病机制是在 β 细胞功能缺陷的基础上合并胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 而 IR 是 T2DM 发生的始动因素, 并贯穿整个自然病程^[1]。研究显示, 当机体胰岛素受体 (insulin receptor, INSR) 数目减少后, 会出现胰岛素对细胞的生物效应下降, 葡萄糖分解利用率降低, 引起 IR 和高血糖的发生^[2-4]。膜相关环状蛋白 1 (membrane associated cyclic protein 1, MARCH1) 是一种跨膜 E3 泛素连接酶, 主要表达于肝脏、脾脏等免疫器官的抗原递呈细胞^[5]。MARCH 作为是胰岛素信号传导的一个重要负性调控因子, 可以靶向作用于 INSR, 影响 INSR 的稳定性和功能, 导致胰岛素信号通路受损, 引起 IR^[6-7]。

葛根芩连汤善于清利胃肠湿热, 具有清热燥湿功效,

临床上被广泛用于 T2DM 的治疗^[8-9]。前期研究已证实, 葛根芩连汤可以抑制肝脏叉头框蛋白 O1 (fork frame protein O1, FoxO1) 的表达, 改善 IR^[10]。通过生物信息学分析, 本课题组发现 MARCH1 启动因子区域存在 FoxO1 的结合位点^[11]。而最近的研究表明, FoxO1 可以通过调节 MARCH1 的转录水平影响 INSR 的稳定性和功能^[7]。但葛根芩连汤是否可以调控 FoxO1/MARCH1 通路改善 IR 尚不得而知。因此, 本研究以高脂诱导 IR 小鼠为模型, 观察葛根芩连汤对肝脏 FoxO1/MARCH1 信号通路中相关基因和蛋白表达的影响, 进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物与饲料 50 只 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 6~8 周龄, 体质量 20~25 g, 购自北京唯尚立拓科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0009], 饲养于

收稿日期: 2023-08-21

基金项目: 国家自然科学基金 (82274445); 江苏省卫生健康委科研项目 (M2021086); 江苏省中医药科技发展计划项目 (MS2022029)

作者简介: 孙洪平 (1986—), 女, 博士, 从事内分泌疾病的临床与基础研究。E-mail: hongpingguo2003@163.com

* **通信作者:** 范尧夫 (1986—), 男, 硕士, 主治医师, 从事内分泌疾病的临床与基础研究。E-mail: fanyaoфу2010@163.com

江苏省中医药研究院动物实验中心，环境相对湿度 50% ~ 60%，自由摄食进水。60% 高脂饲料及标准饲料均购买自南通特洛菲饲料科技有限公司。本次动物实验通过南京中医药大学附属中西医结合医院实验动物伦理委员会批准（伦理号 AEWC-20190814-81）。

1.2 药物 将葛根、黄连、黄芩、炙甘草以 8 : 3 : 3 : 2 的比例配制，所有药材均由南京中医药大学附属中西医结合医院提供，并经南京中医药大学附属中西医结合医院中药制剂室吴军教授鉴定均为正品。经传统水煎后浓缩，制成最佳质量浓度为生药量 1.56 g/mL 的葛根芩连汤溶液（参考课题组前期研究^[10]）。盐酸吡格列酮片（规格 15 mg/片，批号 H20110047）购自江苏德源药业股份有限公司，将 4 片药物研磨粉碎后，用超纯水配制成 20 mg/mL 的混悬液备用。药物均于 4 ℃ 冰箱保存备用，给药前复温至 25~28 ℃。

1.3 试剂 小鼠胰岛素 ELISA 试剂盒（批号 07740）购自美国 Alpeco 公司；小鼠甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）试剂盒（批号 A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1）均购自南京建成生物工程研究所有限公司；Anti-MARCH1（批号 SAB2101432-100 μL）购自德国 Sigma 公司；Anti-Ac-FoxO1、Anti-FoxO1、Anti-IRS1、Anti-p-IRS1、Anti-Insulin Receptor β（INSRβ）、二抗羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG（批号 9441、2880、2382、2384、3020、7074、7076）均购自美国 CST 公司；Anti-Insulin Receptor α（INSRα，批号 sc-57344）购自美国 Santa Cruz 公司；Anti-β-actin（批号 8226）购自英国 Abcam 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（批号 040717170810、041117170411）均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 仪器 Model371 CO₂ 培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Biospectrum 凝胶成像系统、1645050 蛋白电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；Synergy2 超微量多功能酶标仪、Mono422 酶标仪（美国 BioTek 公司）；GeneAmp P9700 PCR 仪（美国 ABI 公司）；TD5M-WS 离心机（德国 Hettich 公司）；Accu-Chek Performa 血糖仪（瑞士罗氏公司）。

2 方法

2.1 分组、造模与给药 50 只 C57BL/6J 雄性小鼠适应性饲养 1 周后，随机分为正常组（10 只）和造模组（40 只），正常组予标准饲料喂养，造模组予高脂饲料喂养 12 周，制备胰岛素抵抗小鼠模型。从高于正常组体质量平均值 20% 的 30 只小鼠中随机取 3 只检测其葡萄糖输注率（GIR）。具体方法为腹腔麻醉后分别行颈静脉、颈动脉置管，静脉置管用于胰岛素和葡萄糖的输入，动脉置管用于采血；先输注胰岛素溶液〔速率为 10 mU/（kg · min）〕，每 10 min 测定血糖，根据血糖水平调节葡萄糖（20%）的输入速率；若连续 3 次血糖数值在目标范围内则认为达到稳态，以稳态期的血糖值和葡萄糖输入速率计算 GIR。若所测小鼠的 GIR 小于正常组 20%，则认定造模成功。将造

模成功的 30 只小鼠随机分为模型组、葛根芩连汤组和吡格列酮组，每组 10 只。正常组和模型组予等体积的灭菌水（10 mL/kg），葛根芩连汤组予葛根芩连汤（15 g/kg），吡格列酮组予吡格列酮（20 mg/kg），每天灌胃 1 次，连续 8 周。每组自由进水，保持相同温、湿度，12 h 交替照明。每周称 1 次小鼠体质量，调整给药剂量。

2.2 取材 末次给药后，小鼠禁食不禁水 12 h 后眼眶取血，4 500 r/min 离心 15 min，取上清液置于-20 ℃ 冰箱保存备用；脱颈处死小鼠后迅速取肝脏，以 4 ℃ PBS 缓冲液清洗残血，剪取部分肝组织固定于 4% 多聚甲醛溶液中，置于-20 ℃ 冰箱保存备用，剩余肝脏组织放入冻存管中，置于-80 ℃ 冰箱保存。

2.3 血糖测定 每周于固定时间测定空腹血糖（FPG），取尾尖血，采用血糖仪及配套试纸进行检测。

2.4 血清生化指标测定 取出于-20 ℃ 冻存的血清，冰水溶解冻，采用全自动生化分析仪检测 TG、TC、LDL-C 水平；按 ELISA 试剂盒说明书检测空腹血清胰岛素（FINS）水平，并计算稳态模型胰岛素抵抗指数（HOMA-IR），公式为 HOMA-IR=空腹血清葡萄糖×空腹血清胰岛素/22.5。

2.5 腹腔注射葡萄糖耐量实验（IPGTT） 末次给药后，各组小鼠禁食不禁水 12 h，次日予腹腔注射 50% 葡萄糖注射液（按 2 g/kg 剂量给药），分别于注射后 30、60、90、120 min 时取尾尖血测定血糖值，并计算葡萄糖曲线下面积（AUC）。

2.6 HE 染色观察肝组织病理变化 取出于 4% 多聚甲醛溶液中固定的肝组织，经梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木素和伊红染色、封片，于 200 倍光镜下观察肝组织病理变化。

2.7 RT-qPCR 法检测肝组织 *FoxO1*、*MARCH1*、*INSR*、*IRS1* mRNA 表达 取各组肝组织适量，TRIzol 法提取总 RNA，测定 RNA 浓度；按逆转录试剂盒说明书将总 RNA 转录为 cDNA，采用 SYBR Green 荧光技术进行 PCR 扩增，反应条件为 95 ℃ 30 s，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因的相对表达量。参照 GenBank 中小鼠的基因序列合成目的基因引物，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
<i>FoxO1</i>	正向 ACATTTCTGCTCTCGAACCAGCTCA
	反向 ATTTCAGACAGACTGGGCAGCGTA
<i>MARCH1</i>	正向 CAGATGACCACGAGCGAAAG
	反向 AAGACGAGACCTCCCGTGAA
<i>INSR</i>	正向 GATTTCCCAACGTGTCTCTAC
	反向 CAATGCGGTACCCAGTGAAGTG
<i>IRS1</i>	正向 GCGCAGGCACCATCTCAACAACC
	反向 GCACGCACCCGAAGGAACC
<i>GAPDH</i>	正向 CCATTCTCGGCCTTGACT
	反向 TGAAGTTCGGTGTGAACG

2.8 Western blot 法检测肝组织 FoxO1、Ac-FoxO1、MARCH1、INSRα、INSRβ、IRS1、p-IRS1 蛋白表达 取各

组肝组织适量，加入 RIPA 裂解液匀浆，4 ℃、12 000 r/min离心 15 min，提取组织总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。各组取 50 μg 蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，BSA 室温封闭 2 h，加入相应一抗（FoxO1、Ac-FoxO1、MARCH1、INSRα、INSRβ、IRS1、p-IRS1 和 β-actin 抗体）4 ℃孵育过夜；次日洗涤后加入二抗室温孵育 2 h，再次洗涤后加入 ECL 发光液显影，采用 Bio-Rad 凝胶成像系统进行图像分析。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 27.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用 *t* 检验，多样本均数比较采用单因素方差分析；当数据符合正态分布及方差齐性时采用 LSD 检验，若数据不符合正态分布或方差不齐时采用非参

表 2 葛根芩连汤对 IR 小鼠体质量、血糖、血脂、胰岛素及 HOMA-IR 的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 10)

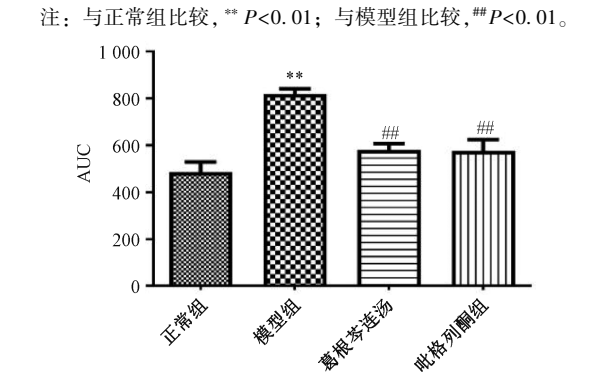
组别	体质量/g	FBG/(mmol·L ⁻¹)	胰岛素/ (μIU·mL ⁻¹)	HOMA-IR	TG/ (mmol·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	LDL-C/ (mmol·L ⁻¹)
正常组	29.97±0.86	6.30±0.20	11.23±0.82	4.39±0.87	1.02±0.11	7.81±0.64	0.50±0.05
模型组	47.73±2.35**	11.53±1.33**	37.79±1.51**	13.20±2.12**	2.00±0.07**	28.08±1.07**	4.66±0.60**
葛根芩连汤组	44.33±4.16	7.50±0.26##	14.30±1.74##	5.94±0.59##	1.12±0.27##	13.23±0.42##	0.66±0.01##
吡格列酮组	45.23±3.75	6.93±0.72##	15.13±2.01##	3.88±0.93##	1.19±0.11##	13.99±0.61##	0.77±0.07##

注：与正常组比较，** *P* < 0.01；与模型组比较，## *P* < 0.01。

3.3 葛根芩连汤对 IR 小鼠 IPGTT 后血糖变化及 AUC 的影响 腹腔注射葡萄糖 30 min 后，各组小鼠血糖迅速升高达到峰值，然后逐渐降低，见表 3。与正常组比较，模型组

表 3 葛根芩连汤对 IR 小鼠 IPGTT 后血糖变化的影响 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, *n* = 10)

组别	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
正常组	6.36±0.38	18.15±3.76	11.07±1.92	9.26±1.15	7.71±0.94
模型组	11.19±0.82**	31.97±6.25**	26.29±3.77**	24.62±4.16**	22.47±3.70**
葛根芩连汤组	7.05±0.34##	28.43±4.36	19.92±2.55##	15.23±2.38##	13.76±2.86##
吡格列酮组	6.92±0.68##	28.09±4.27	20.60±3.49##	14.85±2.12##	12.97±2.07##



注：与正常组比较，** *P* < 0.01；与模型组比较，## *P* < 0.01。

图 1 葛根芩连汤对 IR 小鼠 IPGTT 后 AUC 的影响 ($\bar{x}\pm s$, *n* = 10)

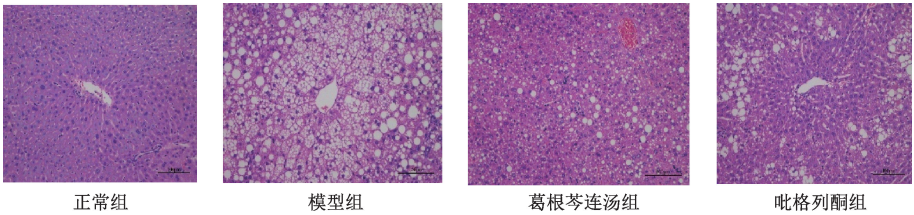


图 2 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织病理学的影响 (×200)

数检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般情况 正常组小鼠一般状况良好，毛色正常，活泼好动；模型组小鼠体质量增加，懒动喜卧，毛发油腻；与模型组比较，葛根芩连汤组和吡格列酮组小鼠精神状态、体质量明显改善。

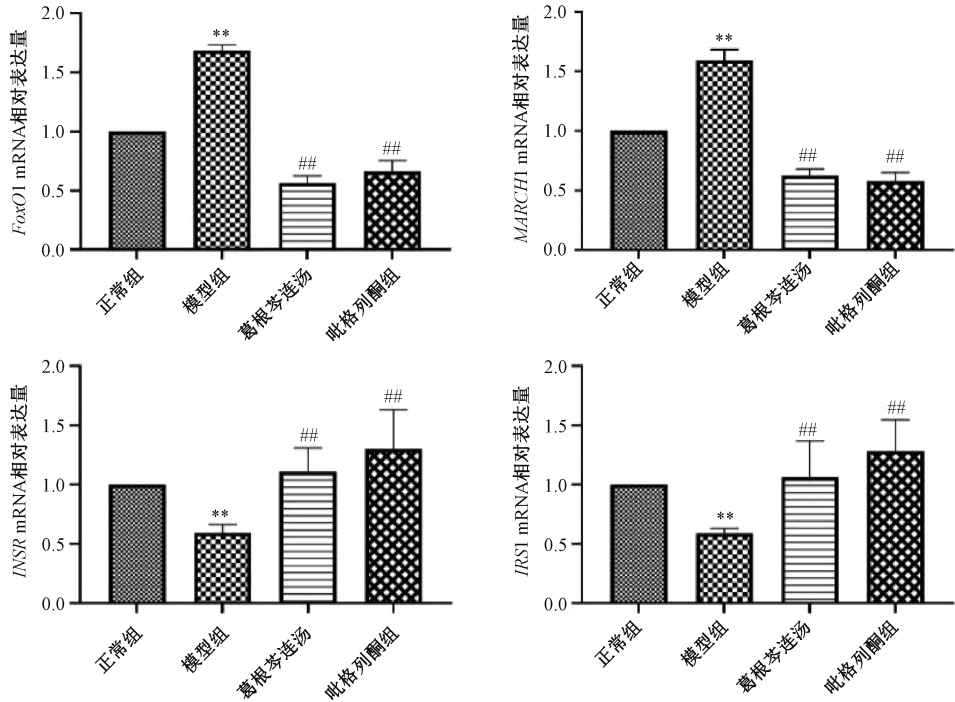
3.2 葛根芩连汤对 IR 小鼠体质量、血糖、血脂、胰岛素及 HOMA-IR 的影响 与正常组比较，模型组小鼠体质量、血糖、血脂、胰岛素水平和 HOMA-IR 均升高 (*P* < 0.01)；与模型组比较，葛根芩连汤组和吡格列酮组体质量无明显变化 (*P* > 0.05)，血糖、血脂、胰岛素水平和 HOMA-IR 均降低 (*P* < 0.01)，见表 2。

AUC 升高 (*P* < 0.01)；与模型组比较，葛根芩连汤组 AUC 降低 (*P* < 0.01)，见图 1。

3.4 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织病理学的影响 正常组小鼠肝组织细胞形态正常，大小均匀，排列规则，边界清晰，细胞核显像清晰；模型组小鼠肝组织细胞结构紊乱，边界轮廓不清，排列散乱，细胞肿大且大小不一，肝细胞内可见大量脂质空泡，淋巴细胞浸润及纤维组织增生，少量肝细胞出现点状坏死；葛根芩连汤组及吡格列酮组小鼠肝组织细胞形态趋于正常，脂质空泡数目明显减少，淋巴细胞浸润减轻，见图 2。

3.5 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织 FoxO1、MARCH1、INSR、IRS1 mRNA 表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠肝组织 FoxO1、MARCH1 mRNA 表达升高 (*P* < 0.01)，INSR、IRS1 mRNA 表达降低 (*P* < 0.01)；与模型组比较，

葛根芩连汤组小鼠肝组织 *FoxO1*、*MARCH1* mRNA 表达降低 ($P<0.01$), *INSR*、*IRS1* mRNA 表达升高 ($P<0.01$), 见



注：与正常组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ## $P<0.01$ 。

图 3 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织 *FoxO1*、*MARCH1*、*INSR*、*IRS1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

3.6 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织 *FoxO1*、Ac-*FoxO1*、*MARCH1*、*INSR* α 、*INSR* β 、*IRS1*、p-*IRS1* 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织 Ac-*FoxO1*、*MARCH1*、*INSR* α 蛋白表达升高 ($P<0.01$), *FoxO1*、*INSR* β 、*IRS1*、p-*IRS1* 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 葛根芩连汤组小鼠肝组织 Ac-*FoxO1*、*MARCH1* 蛋白表达降低 ($P<0.01$), *FoxO1*、*INSR* β 、*IRS1*、p-*IRS1* 蛋白表达均升高 ($P<0.01$), 而 *INSR* α 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), 见图 4。

4 讨论

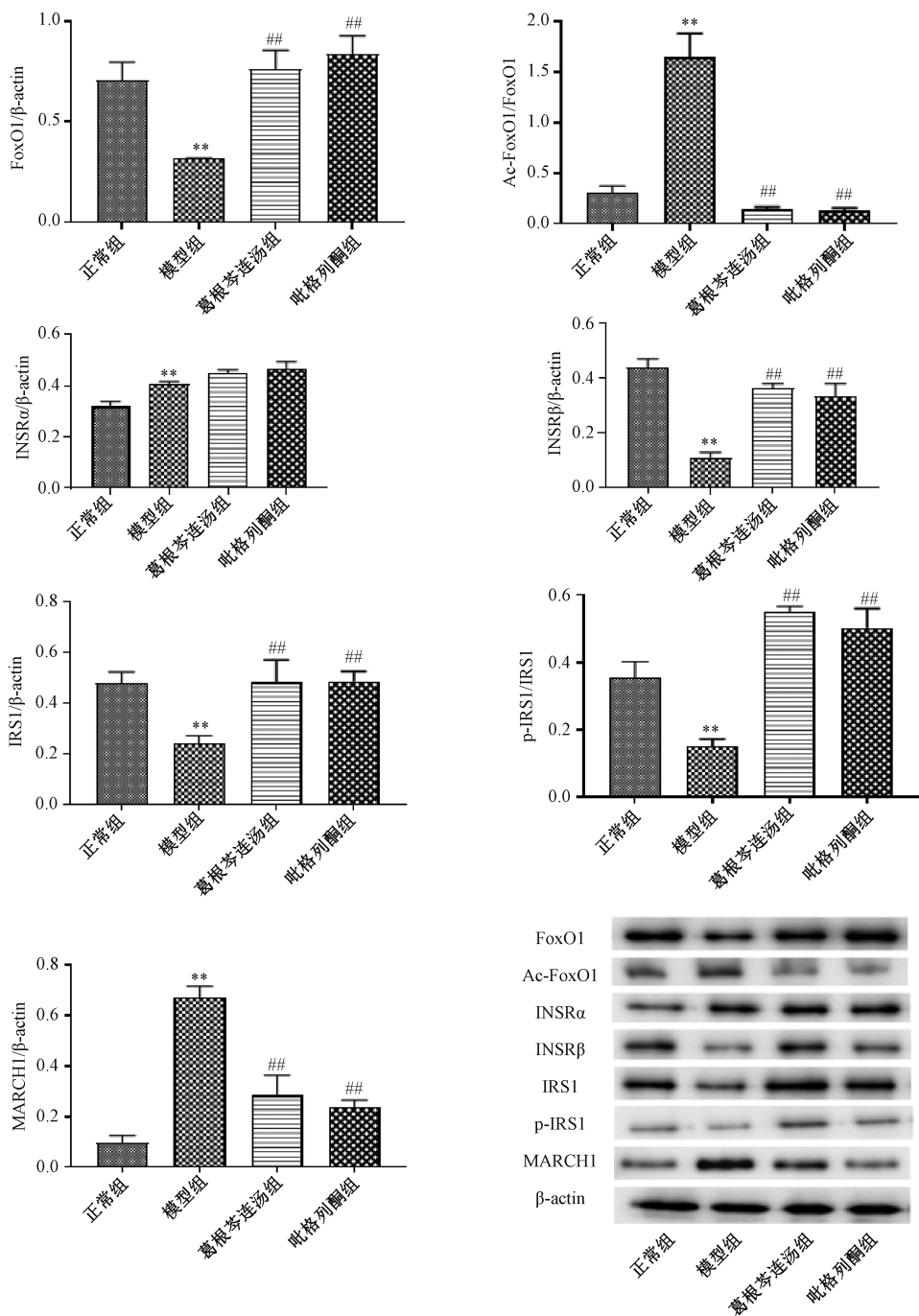
诸多研究均显示, 早期干预胰岛素抵抗可有效延缓 T2DM 的发生发展^[1]。近年来, 中医药改善胰岛素抵抗及防治糖尿病得到广泛关注, 其多成分、多靶点、多途径特征下的作用机制具有巨大研究潜力。在前期研究的基础上, 本研究采用高脂饲料喂养 12 周诱导胰岛素抵抗模型, 并选择葛根芩连汤最佳剂量 15 g/kg 干预, 同时设立吡格列酮 20 mg/kg 作为对照。给药 8 周后发现, 与模型组比较, 葛根芩连汤组小鼠体质量无明显变化, 但空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR、TG、TC 及 LDL-C 水平均降低。多项研究均证实, 葛根芩连汤能改善糖尿病小鼠的血糖及炎症水平, 减轻肝脏和胰腺的组织损伤^[12-14]。本研究发现, 模型组小鼠肝组织可见肝细胞结构紊乱, 边界轮廓不清, 排列散乱, 细胞肿大且大小不一, 肝细胞内可见大量脂质空泡, 淋巴细胞浸润及纤维组织增生; 葛根芩连汤干预后, 可以显著改善肝脏病变情况, 肝细胞脂肪变性减轻, 淋巴细胞浸润

图 3。

及纤维组织增生减少, 提示葛根芩连汤可以显著改善胰岛素抵抗小鼠的肝细胞脂肪变性和炎症反应, 与 Ying 等^[15] 研究结果一致。

FoxO1 是一种重要的转录因子, 参与了多种生理和病理过程, 包括胰岛素信号通路调控。课题组前期研究已证实, 葛根芩连汤可以通过乙酰化调控 *FoxO1*, 改善肝脏胰岛素抵抗^[10,16]。最近的研究表明, *FoxO1* 可以通过调节 *MARCH1* 信号通路来调节胰岛素受体的稳定性和功能^[7]。本研究显示, 葛根芩连汤可以下调高脂饮食诱导的 IR 小鼠肝组织 Ac-*FoxO1*/*FoxO1*、*MARCH1* 表达, 提示葛根芩连汤可能通过抑制 *FoxO1* 乙酰化及入核, 进而抑制 *MARCH1* 的启动转录, 恢复胰岛素信号通路, 改善胰岛素抵抗。研究证实, *MARCH1* 可以通过将泛素分子连接到胰岛素受体的细胞膜部分, 从而导致胰岛素受体的内吞和降解, 降低了细胞对胰岛素的敏感性, 从而促进胰岛素抵抗的发生^[17]。本研究发现, 模型组 *MARCH1* 表达升高, *INSR* 表达降低, 而葛根芩连汤可以有效改善高脂饮食诱导的 IR 小鼠的 *MARCH1* 和 *INSR* 表达。

INSR 是胰岛素信号通路中的关键蛋白, 在调节葡萄糖稳态方面发挥着关键作用。虽然目前还没有直接的研究证实葛根芩连汤对胰岛素受体抗体的调控作用, 但是已有一些研究表明, 葛根芩连汤中各药物单体成分可以通过调节 *INSR* 来改善肝脏胰岛素抵抗。本研究发现, 葛根芩连汤干预后小鼠肝组织乙酰化 *FoxO1* 及 *MARCH1* 蛋白表达降低, *INSR* β 、*IRS1* 及磷酸化 *IRS1* 蛋白表达升高, 这进一步印证



注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 4 葛根芩连汤对 IR 小鼠肝组织 FoxO1、Ac-FoxO1、MARCH1、INSRα、INSRβ、IRS1、p-IRS1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

了葛根芩连汤可能通过抑制 FoxO1 乙酰化，下调 MARCH1 蛋白表达，从而促进胰岛素信号通路的恢复，进而改善胰岛素抵抗。但是，本研究还发现，虽然葛根芩连汤可以上调 IR 小鼠肝组织 INSRβ 蛋白表达，但是对 INSRα 却无明显调控作用。INSR 在肝细胞中的表达主要分布在肝细胞的细胞膜上，其中 α 亚基位于受体的外侧，负责胰岛素的结合，而 β 亚基则贯穿细胞膜，通过酪氨酸激酶活性调节信号传导^[18]。推测葛根芩连汤的作用靶点可能集中在对酪氨酸激酶活性调节信号的传导。

综上所述，葛根芩连汤可以改善胰岛素抵抗小鼠的糖脂代谢，减轻胰岛素抵抗，其机制可能与抑制 FoxO1 乙酰化，靶向下调 MARCH1，上调 IRS1、p-IRS1 及 INSRβ 蛋白表达，促进胰岛素信号通路的恢复，改善胰岛素抵抗有关。

参考文献：

[1] Wang T, Lu J, Shi L, *et al.* Association of insulin resistance and β-cell dysfunction with incident diabetes among adults in

China; a nationwide, population-based, prospective cohort study [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(2): 115-124.

[2] Zhao X, An X, Yang C, *et al.* The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1149239.

[3] Peng P, Jin J, Zou G, *et al.* Hesperidin prevents hyperglycemia in diabetic rats by activating the insulin receptor pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1): 53.

[4] Benito-Vicente A, Uribe K B, Rotllan N, *et al.* miR-27b modulates insulin signaling in hepatocytes by regulating insulin receptor expression[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8675.

[5] Schriek P, Liu H, Ching A C, *et al.* Physiological substrates and ontogeny-specific expression of the ubiquitin ligases MARCH1 and MARCH8 [J]. *Curr Res Immunol*, 2021, 2: 218-228.

[6] Lee M, Kwon D Y, Kim M S, *et al.* Genome-wide association study for the interaction between BMR and BMI in obese Korean women including overweight [J]. *Nutr Res Pract*, 2016, 10 (1): 115-124.

[7] Nagarajan A, Petersen M C, Nasiri A R, *et al.* MARCH1 regulates insulin sensitivity by controlling cell surface insulin receptor levels[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12639.

[8] 许清松, 彭程程, 李冰涛, 等. 葛根芩连汤含药血清对缺氧诱导 HepG2 肝癌细胞糖代谢的影响及机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(5): 636-645.

[9] Xu Y, Huang J, Wang N, *et al.* Network pharmacology-based analysis and experimental exploration of antidiabetic mechanisms of Gegen Qinlian Decoction [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 649606.

[10] Sui M, Chen G, Mao X, *et al.* Gegen Qinlian Decoction ameliorates hepatic insulin resistance by silent information regulator1 (SIRT1) -dependent deacetylation of forkhead Box O1 (FOXO1) [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 8544-8553.

[11] Borges T J, Murakami N, Machado F D, *et al.* March1-dependent modulation of donor MHC II on CD103⁺ dendritic cells mitigates alloimmunity [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 3482.

[12] Zhang C H, Xiao Q, Sheng J Q, *et al.* Gegen Qinlian Decoction abates nonalcoholic steatohepatitis associated liver injuries *via* anti-oxidative stress and anti-inflammatory response involved inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110076.

[13] He L, Bao T, Yang Y, *et al.* Exploring the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus intestinal damp-heat syndrome and the therapeutic effect of Gegen Qinlian Decoction from the perspective of exosomal miRNA[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114786.

[14] Bao W, Sun H, Wu X, *et al.* Exploring anti-type 2 diabetes mellitus mechanism of Gegen Qinlian Decoction by network pharmacology and experimental validation [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 1927688.

[15] Ying Y, Zhang H, Yu D, *et al.* Gegen Qinlian Decoction ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats *via* oxidative stress, inflammation, and the NLRP3 signal axis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6659445.

[16] 隋 淼, 陈国芳, 茅晓东, 等. 葛根芩连汤对高脂诱导肝脏胰岛素抵抗小鼠 SIRT1/FoxO1 信号通路的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2018, 34(6): 578-582.

[17] Majdoubi A, Lee J S, Kishta O A, *et al.* Lack of the E3 ubiquitin ligase march1 affects CD8 T cell fate and exacerbates insulin resistance in obese mice [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1953.

[18] Wu J, Park S H, Choi E. The insulin receptor endocytosis[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2023, 194: 79-107.