

网络出版时间:2022-08-30 11:29 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220829.1637.004.html

汉黄芩苷干预高糖刺激 RAW264.7 巨噬细胞 KLF4/NF- κ B 信号通路

谢 珊^{1,2}, 徐兴欣^{1,2}

摘要 目的 探究汉黄芩苷(WG)对高糖刺激下 RAW264.7 巨噬细胞的 KLF4/NF- κ B 信号通路的影响。方法 培养 RAW264.7 巨噬细胞, CCK-8 法检测 WG 对细胞无活性影响的浓度范围。将细胞随机分为 LG 组(5.5 mmol/L 葡萄糖培养基)、D 组(30 mmol/L 甘露醇培养基)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖培养基)、LG + WG50 组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 50 μ mol/L WG)、HG + WG12.5 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 12.5 μ mol/L WG)、HG + WG25 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 25 μ mol/L WG)、HG + WG50 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 50 μ mol/L WG); 免疫荧光检测各组细胞 iNOS 的表达, Western blot 检测各组细胞 NF- κ B p65、NF- κ B pp65、KLF4、iNOS、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达, qRT-PCR 检测各组细胞 KLF4、iNOS、TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达量, ELISA 法检测各组细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的分泌水平。结果 与 LG 组相比, HG 组细胞中 iNOS 表达高($P < 0.01$), 与 HG 组相比, HG + W50 组细胞中 iNOS 表达降低($P < 0.01$)。与 LG 组相比, 高糖可以抑制 KLF4 的表达($P < 0.01$), 上调 NF- κ B pp65、iNOS、IL-1 β 、TNF- α 的表达($P < 0.01$), 增加上清液中 IL-1 β 、TNF- α 的水平($P < 0.01$); 与 HG 组相比, WG 组各炎症指标明显下降($P < 0.01$), KLF4 的表达量反而剂量依赖性增高($P < 0.01$)。结论 WG 可以抑制高糖刺激巨噬细胞分泌炎症因子及相关蛋白的表达, 有提高保护性因子 KLF4 的治疗作用。

关键词 糖尿病肾病; 巨噬细胞; 汉黄芩苷; KLF4

中图分类号 R 587.2; R 392.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)10-1523-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.003

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的微血管并发症,在 DN 发生和发展中巨噬细胞的参与起着至关重要的作用。研究显示,在 DN 肾组织中,过表达的 Krüppel 样因子 4(Krüppel-like factor4, KLF4)可以抑制肾脏炎症,表现出抗炎、

抗纤维化的保护作用^[1-3],也可以在巨噬细胞炎症中进行调节^[4-5]。因而,激活 KLF4 的表达可能是延缓 DN 进展的有效手段。汉黄芩苷(wogonoside, WG)属于生物活性黄酮,具有抗氧化、抗炎、抗病毒和抗癌的作用^[6]。同时, WG 能显著降低脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激引起的巨噬细胞炎症因子释放^[7]。但是 WG 是否干预高糖诱导巨噬细胞活化, KLF4 是否参与炎症及 WG 干预机制,目前尚未见报道。该研究以巨噬细胞为研究对象,通过观察 WG 对巨噬细胞中相关信号通路及炎症因子的影响,探讨 KLF4-蛋白核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路在高糖诱导巨噬细胞激活中的具体机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 小鼠巨噬细胞系(RAW264.7)购自中科院上海细胞生物研究所。WG(Batch NO.: DST210409-026)购自成都乐天美医药科技有限公司。兔抗 CD68、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、KLF4 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, NF- κ B p65、NF- κ B pp65 单克隆抗体购自美国 CST 公司, 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG 抗体购自武汉三鹰公司, 小鼠 TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司, DMEM 低糖培养基、胎牛血清购自加拿大 Wisent 公司, D-葡萄糖、2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)购自美国 Sigma 公司, BCA 蛋白测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒购自江苏碧云天公司, TRIzol 试剂购自雅酶公司, 反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒购自艾科瑞生物公司, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 RAW264.7 细胞培养于含

2022-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81600568)

作者单位:¹ 安徽医科大学第四附属医院肾内科, 合肥 230001

² 安徽医科大学第一附属医院肾内科, 合肥 230022

作者简介:谢 珊,女,硕士研究生;

徐兴欣,女,副教授,主治医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xuxingxin.2008@163.com

10% 胎牛血清的低糖 5.5 mmol/L DMEM 培养基,放置于条件为 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱。将细胞随机分为:LG 组(5.5 mmol/L 葡萄糖培养基)、D 组(30 mmol/L 甘露醇培养基)、HG 组(30 mmol/L 葡萄糖培养基)、LG + WG50 组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 50 μmol/L WG)、HG + WG12.5 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 12.5 μmol/L WG)、HG + WG25 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 25 μmol/L WG)、HG + WG50 组(30 mmol/L 葡萄糖 + 50 μmol/L WG)后同步化培养 24 h,高糖刺激在 WG 预处理 2 h 后加入培养基,光镜观察各组细胞数量及形态变化,检查各组指标变化,并收集数据。

1.2.2 细胞活力测定 将 RAW264.7 细胞置于 96 孔板中,于低糖培养条件下同步化 24 h 后,分别更换 0、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L WG 高糖培养基,24 h 后加入 CCK-8 孵育 2 h,酶标仪 450 nm 波长下进行光密度(optical density, OD)值测定,并使用公式 $OD(450)_{\text{实验组}}/OD(450)_{0 \mu\text{mol/L}} \times 100\%$ 算出细胞活力。

1.2.3 细胞荧光检测 将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种在玻璃皿底,4% 多聚甲醛固定 10 min,10% 牛血清蛋白阻断 30 min,加入 iNOS 一抗溶液 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后,加入 FITC 标记的荧光二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 染核 5 min,加荧光抗淬灭剂封片后,在荧光显微镜下观察并采集图象,各组随机选取 5 ~ 10 个高倍镜视野,使用 Image J 软件计数细胞平均数。

1.2.4 Western blot 分析 收集各组细胞,加 RIPA 裂解液冰上裂解,BCA 试剂盒测定蛋白浓度并计算上样量。适量蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶进行电泳后转移到 NC 膜,用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h,再用稀释一抗 NF-κB p65 (1 : 1 000)、NF-κB pp65 (1 : 1 000)、KLF4 (1 : 1 000)、iNOS (1 : 1 000)、TNF-α (1 : 1 000)、IL-1β (1 : 1 000) 4 ℃ 孵育 12 h,用 HRP 标记的山羊抗鼠或抗兔二抗 (1 : 8 000) 进行孵育, TBST 洗 3 次,滴加 ECL 显色剂在凝胶成像系统进行化学发光,并用 Image J 进行半定量分析。

1.2.5 qRT-PCR TRIzol 试剂裂解细胞后提取总 RNA,进行 RNA 浓度及纯度鉴定,使 OD260/280 在 1.8 ~ 2.1 之间,并在反转录系统中逆转录为 cDNA。依据 SYB GREEN PCR 试剂盒进行定量分析,终体积 10 μl。引物序列见表 1。每个样本设置 3 个复孔,设置 GAPDH 为内参对照进行校正,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

引物	序列
TNF-α	F: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' R: 5'-TACAGGCTTGTCTACTGGAATT-3'
IL-1β	F: 5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG-3', R: 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGGG-3'
iNOS	F: 5'-TGCATGACACTCTTCACCACAAGG-3' R: 5'-TCTCTGGGTCCTCTGGTCAAATC-3'
KLF4	F: 5'-ACCTCTGGACCTAGACTTTAT-3' R: 5'-GAAGACGAGGATGAAGCTGAC-3'
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGTCCGTCGTGAACG-3' R: 5'-CTCGCTCTCGAAGATGCTG-3'

1.3 统计学处理 所有数据使用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,方差齐性应用 Levene 法检验,两组间比较应用独立样本 *t* 检验,多组间比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差不齐应用 K-W 检验或 Wilcoxon 秩和检验,LSD 分析数据以确定显著差异性。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WG 对 RAW264.7 细胞活性的影响 WG 选取 0 ~ 100 μmol/L 范围中 6 个浓度,见图 1,当 WG 浓度在 0 ~ 50 μmol/L 时,高糖刺激后的 RAW264.7 细胞活性无明显影响($P > 0.05$),WG 浓度高于 50 μmol/L 时,细胞活性明显下降($P < 0.01$)。

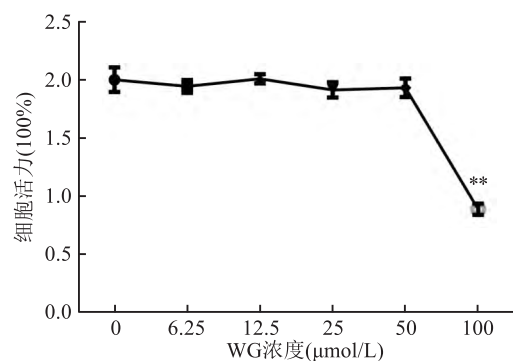


图 1 CCK-8 法检测 WG 对 RAW264.7 细胞活性的影响
与 0 μmol/L WG 比较: ** $P < 0.01$

2.2 高糖刺激各组巨噬细胞 iNOS 的表达 高糖刺激的巨噬细胞中 iNOS 表达量增高,阳性细胞数明显高于低糖培养的巨噬细胞($P < 0.01$),表明高糖可以促进巨噬细胞炎症。加入 50 μmol/L WG 预处理的高糖巨噬细胞,iNOS 表达的阳性细胞数明显低于 HG 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.3 WG 减轻高糖刺激 RAW264.7 细胞引起的炎症 Western blot、qRT-PCR 结果显示,WG 预处理 2

h 后,高糖刺激的 RAW264.7 细胞 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B pp65 表达均明显增高($P < 0.01$),WG 明显抑制 iNOS、TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B pp65 表达,且 50 μ mol/L 的抑制程度最明显,与 HG 组对比,差异有

统计学意义($P < 0.01$),见图 3 ~ 5。ELISA 法检测各组细胞上清液,结果表明高糖刺激上清液中 TNF- α 、IL-1 β 表达增高,不同浓度的 WG 作用后 TNF- α 、IL-1 β 呈浓度依赖性降低($P < 0.01$),见图 6。

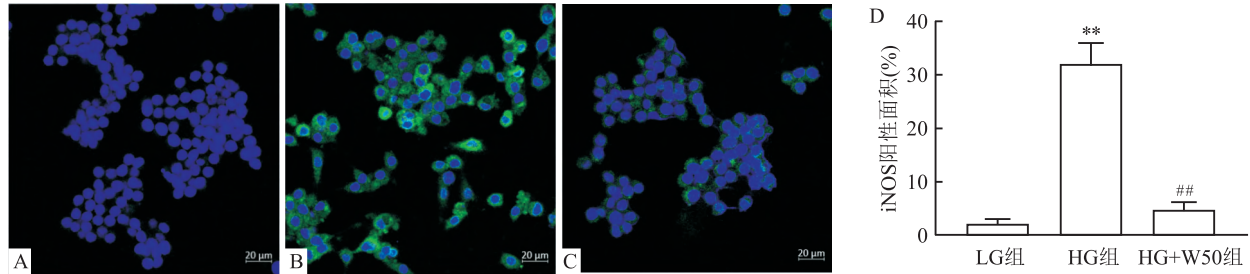


图2 LG组、HG组与HG+W50组 iNOS 的表达 $\times 400$

A: LG 组; B: HG 组; C: HG + W50 组; D: 荧光镜下 iNOS 阳性面积统计; 与 LG 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较: ## $P < 0.01$

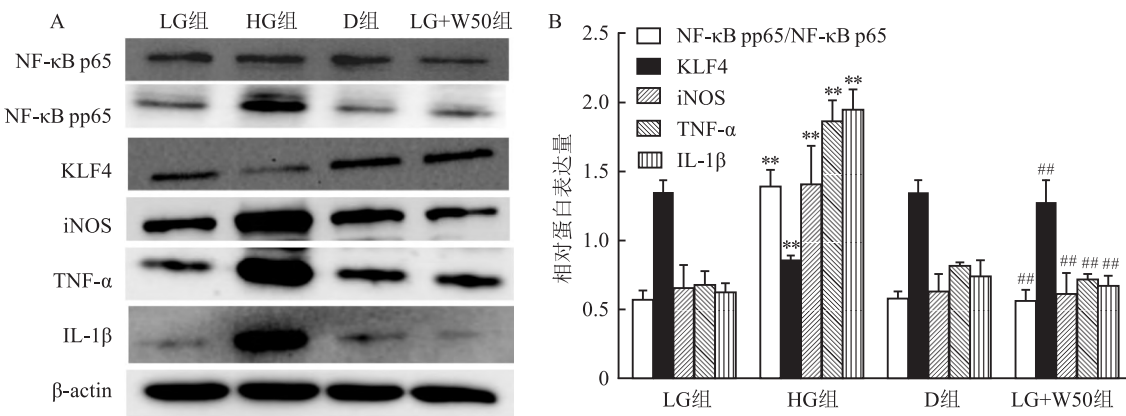


图3 Western blot 检测各组细胞中 NF- κ B p65、NF- κ B pp65、KLF4、iNOS、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达

A: LG 组、HG 组、D 组、LG + W50 组的 Western blot 实验条带图; B: NF- κ B p65、NF- κ B pp65、KLF4、iNOS、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达半定量统计; 与 LG 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较: ## $P < 0.01$

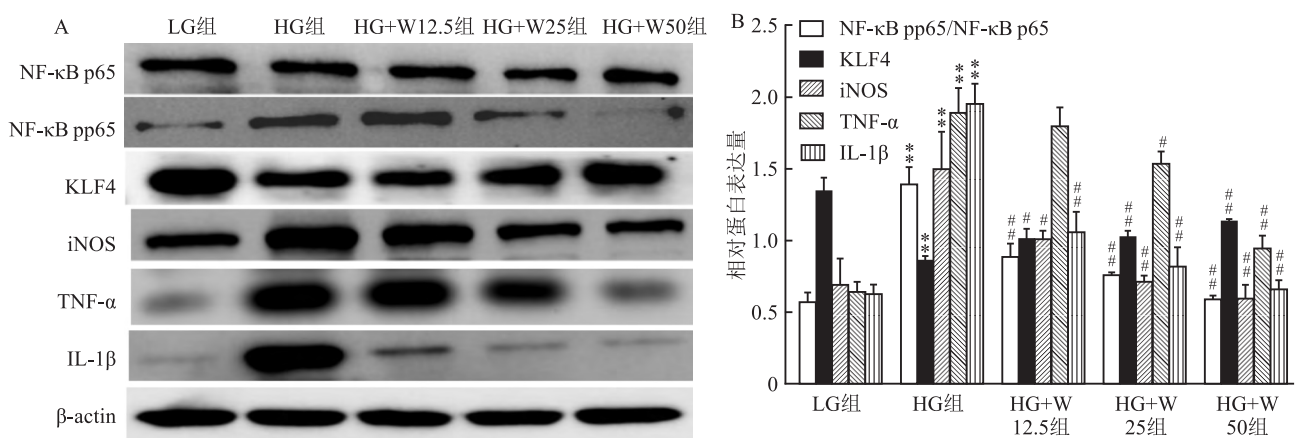


图4 Western blot 检测各组细胞中 NF- κ B p65、NF- κ B pp65、KLF4、iNOS、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达

A: LG 组、HG 组、HG + W12.5 组、HG + W25 组和 HG + W50 组的 Western blot 实验条带图; B: NF- κ B p65、NF- κ B pp65、KLF4、iNOS、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达半定量统计; 与 LG 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 WG 干预高糖刺激 RAW264.7 细胞中 KLF4 的表达 Western blot 结果显示,高糖刺激后,巨噬细胞内 KLF4 蛋白表达量较 LG 组下降($P < 0.01$),在 WG 干预后,KLF4 的蛋白表达量呈现增高现象($P < 0.01$),见图 3、4。通过 qRT-PCR 再次观察了

KLF4 mRNA 表达量变化,结果同样显示巨噬细胞内 KLF4 mRNA 表达量较 LG 组下降($P < 0.01$),在 WG 干预后,KLF4 mRNA 的表达量呈现剂量依赖性增高现象($P < 0.01$),见图 5A。

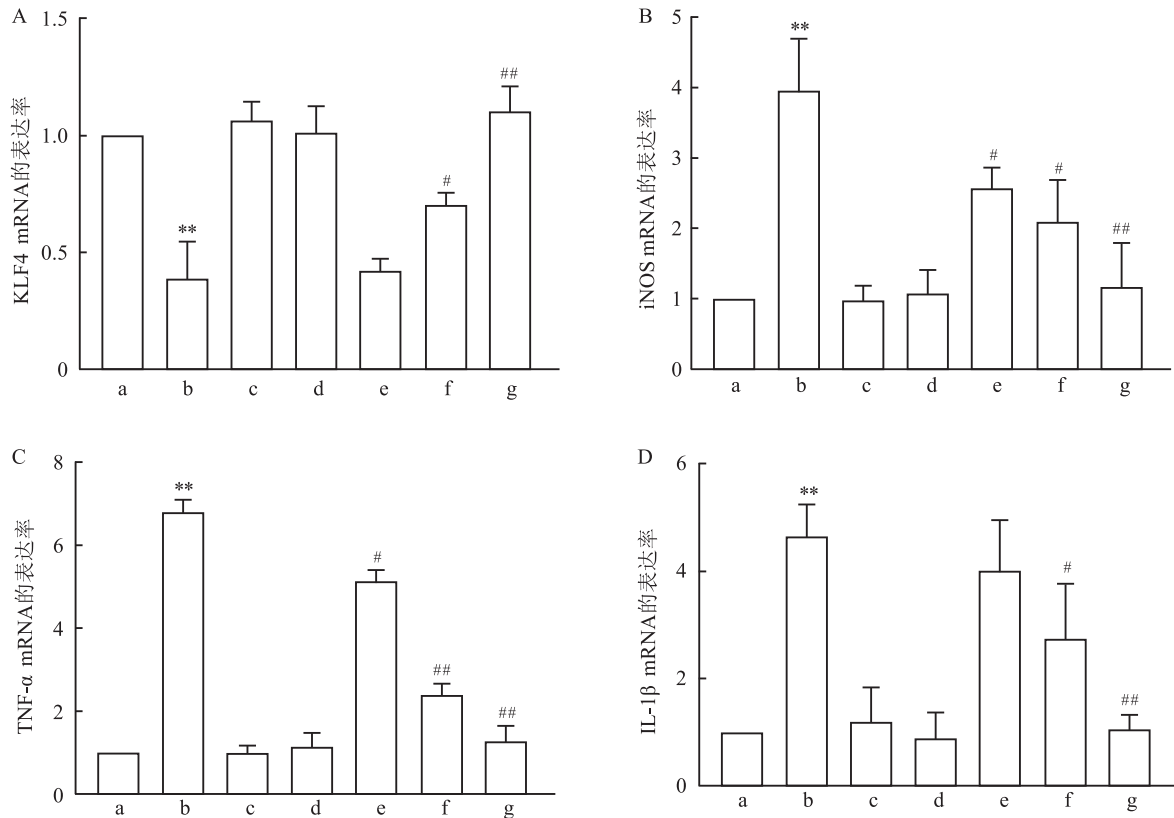


图 5 qRT-PCR 检测各组细胞中 KLF4、iNOS、TNF-α 及 IL-1β mRNA 表达

A: KLF4 mRNA 表达; B: iNOS mRNA 表达; C: TNF-α mRNA 表达; D: IL-1β mRNA 表达; a: LG 组; b: HG 组; c: D 组; d: LG + W50 组; e: HG + W12.5 组; f: HG + W25 组; g: HG + W50 组; 与 LG 组比较: * $P < 0.01$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

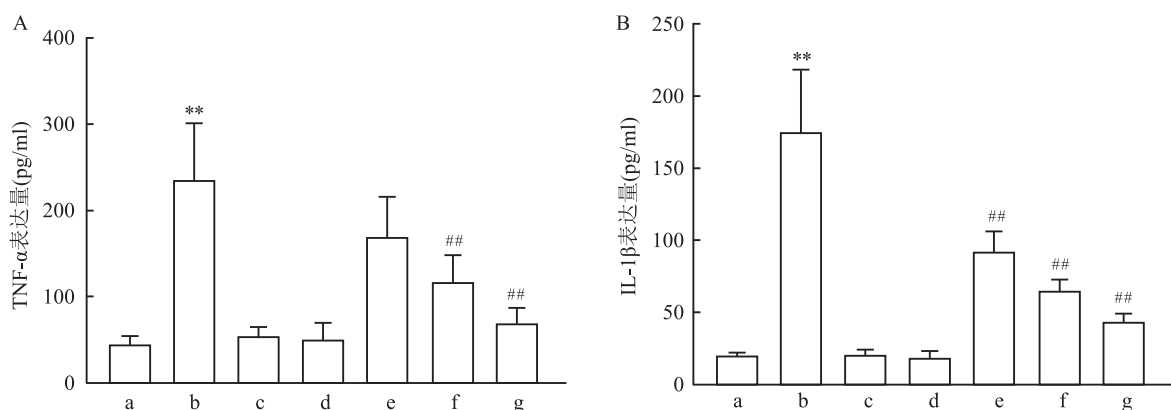


图 6 各组细胞上清液中炎症因子 TNF-α 及 IL-1β 水平变化

A: TNF-α 表达水平; B: IL-1β 表达水平; a: LG 组; b: HG 组; c: D 组; d: LG + W50 组; e: HG + W12.5 组; f: HG + W25 组; g: HG + W50 组; 与 LG 组比较: * $P < 0.01$; 与 HG 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

DN 已经成为终末期肾脏病的主要原因之一,且在人群中的患病率逐年上升^[8]。众所周知,自身免疫病发展与巨噬细胞的长期激活有关,持续不断分泌的炎症因子,最终对正常组织及细胞造成无法修复的损害,导致肾组织纤维化及肾脏功能下降^[9]。本实验以高糖刺激的巨噬细胞为研究对象,模拟糖尿病高糖环境,探究 WG 抑制 DN 炎症发展的可能机制。

在长期高血糖状态下,巨噬细胞在肾组织中异常聚集,激活 TLR4、NF- κ B 等通路,分泌大量 TNF- α 、IL-1 β 炎症因子,导致肾小球、肾小管及基底膜病理改变,进而出现蛋白尿增多等临床症状。TNF- α 和 IL-1 β 被称作巨噬细胞炎症的“警报细胞因子”,它们会进一步诱导促炎基因 iNOS 的产生。此次研究中采用高糖刺激小鼠 RAW264.7 巨噬细胞,观察炎症信号蛋白及相关炎症因子表达。结果表明,高糖刺激后,NF- κ B p65、NF- κ B pp65、iNOS 表达增高,促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 表达明显上调,巨噬细胞极化。与 Zhu et al^[9] 及汤祥瑞等^[10] 研究结果相似,高糖可以直接或间接的刺激巨噬细胞迁移、炎症因子的分泌及 iNOS 表达增加。

巨噬细胞是先天免疫的重要参与者,而 KLF4 是巨噬细胞生物学中的关键介质,起着调节巨噬细胞促炎效应。本研究显示,KLF4 在高糖诱导的 RAW264.7 细胞中表达下调,并且伴随炎症因子的释放及 iNOS 的增加。与多数研究^[11-12] 结果一致,KLF4 在肾脏保护及炎症抑制方面有极大地探索意义。有研究^[2-3,13] 报道 KLF4 抑制 STAT3、mTOR 和 NF- κ B p65 的激活,以改善动脉粥样硬化及脓毒血症等疾病的进展。此研究验证出高糖刺激巨噬细胞 24 h 出现抑制 KLF4 表达的情况,说明在炎症状态中 KLF4 是处于低表达状态。也有文献^[3] 报道在炎症激活过程中,NF- κ B p65 活性增强抑制 KLF4 的转录作用,KLF4 表达下调会激活 NF- κ B pp65 的表达,两者形成正反馈效应加快炎症反应的进行。由此推测 KLF4 介导是 DN 炎症发展过程的重要环节。

WG 是一种低毒、低成本、高疗效的黄酮类天然化合物^[8],具有抗炎、抗氧化、抗癌等作用。多数研究证明,WG 有显著的抗炎活性,可以明显减轻结肠炎^[6]、脂肪肝^[14] 及慢性咽炎^[15] 等疾病进展,但在 DN 介导的慢性炎症中的作用及机制还有待探索。在本研究中,通过 CCK-8 实验验证高糖条件下细胞

安全浓度范围,再用不同浓度的 WG 给予细胞预处理,然后再用高糖刺激巨噬细胞活化。结果表明,WG 减轻 HG 组巨噬细胞 TNF- α 、IL-1 β 的分泌和 iNOS 的表达,这种作用是通过抑制 NF- κ B p65 的磷酸化,逆转巨噬细胞抗炎活性,成功减轻了高糖诱导的巨噬细胞炎症。此外,KLF4 表达量在 WG 作用下呈剂量依赖性递增,提示 KLF4 不仅是炎症中的重要参与者,更在 DN 中发挥保护性作用,并参与到 WG 的治疗机制中。

综上所述,本研究表明高糖刺激巨噬细胞后,其 KLF4 表达减少,而 WG 可以刺激巨噬细胞 KLF4 的表达增高,进而抑制高糖刺激巨噬细胞产生促炎因子和炎性物质,其机制是由于 KLF4 表达增高抑制了 NF- κ B p65 的磷酸化,进而减少了 iNOS 的表达。提示 KLF4/NF- κ B 相关信号通路可能参与到 WG 影响巨噬细胞改善 DN 的过程。由于本研究缺乏对相关靶向蛋白干预和相应体内模型验证,将在以后的研究中加以探讨,以期对 DN 的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Rane M J, Zhao Y, Cai L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease[J]. EBioMedicine, 2019, 40: 743–50.
- [2] Gong J, Zhan H, Li Y, et al. Kruppel-like factor 4 ameliorates diabetic kidney disease by activating autophagy via the mTOR pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3240–8.
- [3] Zhu X, Du J, Yu J, et al. LncRNA NKILA regulates endothelium inflammation by controlling a NF- κ B/KLF4 positive feedback loop[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 126: 60–9.
- [4] Li Z, Jia Y, Han S, et al. Klf4 alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation by inducing expression of MCP-1 induced protein 1 to deubiquitinate TRAF6[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(6): 2278–90.
- [5] Li C, Yu L, Mai C, et al. KLF4 down-regulation resulting from TLR4 promotion of ERK1/2 phosphorylation underpins inflammatory response in sepsis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(4): 2013–24.
- [6] Huang S, Fu Y, Xu B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the MLCK/pMLC2 pathway[J]. Phytomedicine, 2020, 68: 153179.
- [7] Yu X, Chen D, Wang L, et al. Wogonoside inhibits inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated macrophage by suppressing the activation of the JNK/c-Jun signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(8): 532.
- [8] Bonner R, Albajrami O, Hudspeth J, et al. Diabetic kidney disease[J]. Prim Care, 2020, 47(4): 645–59.
- [9] Zhu M, Sun X, Qi X, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate macrophages and induce inflammatory responses via NF- κ B signaling pathway in vitro and in vivo[J]. Int

- Immunopharmacol, 2020, 84: 106551.
- [10] 汤祥瑞, 张 勇, 祝 领, 等. 晚期糖基化产物通过 RAGE/TLR4/STAT1 信号通路诱导巨噬细胞 M1 型极化[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(5): 751–6.
- [11] Fan L, Li M, Cao F, et al. Astragalus polysaccharide ameliorates lipopolysaccharide-induced cell injury in ATDC5 cells *via* miR-92a/KLF4 mediation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109180.
- [12] Rane M J, Zhao Y, Cai L. Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease[J]. *EBioMedicine*, 2019, 40: 743–50.
- [13] Gong J, Zhan H, Li Y, et al. Krüppel-like factor 4 ameliorates diabetic kidney disease by activating autophagy *via* the mTOR pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(4): 3240–8.
- [14] Jiang G, Chen D, Li W, et al. Effects of wogonoside on the inflammatory response and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 1186–92.
- [15] Chen Y, Luo R, Lei S, et al. Anti-inflammatory effect of Ganluyin, a Chinese classic prescription, in chronic pharyngitis rat model [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 265.

Effect of wogonoside on KLF4/NF- κ B signal pathway in RAW264.7 macrophages stimulated by high glucose

Xie Shan^{1,2}, Xu Xingxin^{1,2}

(¹Dept of Nephrology, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of wogonoside (WG) on the Krüppel-like factor4 (KLF4)/nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway of RAW264.7 macrophages subject to high glucose stimulation. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured and the concentration range of inactive effect of WG on cells was detected by CCK-8. Macrophages randomly grouped into LG group (medium for 5.5 mmol/L of glucose), D group (30 mmol/L mannitol medium), HG group (medium for 30 mmol/L glucose), LG + WG50 group (5.5 mmol/L glucose + 50 μ mol/L WG), HG + WG12.5 group (30 mmol/L glucose + 12.5 μ mol/L WG), HG + WG25 group (30 mmol/L glucose + 25 μ mol/L WG), HG + WG50 group (30 mmol/L glucose + 50 μ mol/L WG). The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in cells of each group was determined by immunofluorescence. NF- κ B p65, NF- κ B pp65, KLF4, iNOS, interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression in each group was detected by Western blot. mRNA expression of KLF4, iNOS, IL-1 β , TNF- α in each group was detected by qRT-PCR. IL-1 β , TNF- α secretion of cells in each group was detected by ELISA. **Results** Compared with LG group, the expression of iNOS in HG group was higher ($P < 0.01$), and the expression of iNOS in HG + W50 group was lower than that in HG group ($P < 0.01$). Compared with the LG group, high glucose can inhibit KLF4 expression ($P < 0.01$), stimulate NF- κ B pp65, iNOS, IL-1 β , TNF- α expression ($P < 0.01$), and increase the IL-1 β , TNF- α level in the supernatant ($P < 0.01$); However, the inflammatory index in the WG groups significantly decreased ($P < 0.01$), but expression of KLF4 dose-dependent increased ($P < 0.01$). **Conclusion** WG inhibits the expression of inflammatory factors and associated proteins secreted by macrophages by high glucose, and has the therapeutic effect of improving the protective factor-KLF4.

Key words diabetic nephropathy; macrophages; wogonoside; KLF4