·论　　文·

CDDO-Me 羧酸酯前药的设计、合成及抗炎活性

牟　伊[1,2,3],陈　同[1,4],黄张建[1,2],赖宜生[1,2],彭司勋[1,2],季　晖[1,4*],张奕华[1,2**]

(中国药科大学 [1]天然药物活性组分与药效国家重点实验室,南京 210009;[2]江苏省代谢性疾病药物重点实验室,南京 210009;[3]泰州学院医药与化学化工学院,泰州 225300;[4]药理学教研室,南京 210009)

摘　要　以齐墩果酸(OA)为起始原料,合成了2-氰基-3,12-二氧代齐墩果烷-1,9(11)-二烯-28-酸甲酯(CDDO-Me),继而经 DMF/K_2CO_3 作用,制备了该化合物 A 环上的1,4 加成物(**1**),再用不同的脂肪羧酸和取代芳香羧酸分别与其 C-3 位羟基反应,合成了 CDDO-Me 羧酸酯前药(**2~8**),以期得到活性较强、毒性较小的抗炎药物。采用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)释放一氧化氮(NO)的模型来评价目标化合物抗炎活性。结果表明,化合物 **2~8** 对细胞中 NO 释放显示了不同程度的抑制,其中化合物 **2**[IC_{50} = (2.34 ± 0.67) nmol/L]和 **7**[IC_{50} = (3.83 ± 0.97) nmol/L]抑制活性最强。此外,用 MTT 法评价了目标化合物对巨噬细胞 RAW 264.7 增殖的影响,发现它们的抑制活性显著低于 CDDO-Me,提示其毒性小于 CDDO-Me。
关键词　齐墩果酸;CDDO-Me;前药;抗炎活性;合成
中图分类号　R914.5;R965　　文献标志码　A　　文章编号　1000-5048(2016)06-0661-05
doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160605

Design, synthesis and anti-inflammatory evaluation of CDDO-Me ester prodrugs

MOU Yi[1,2,3], CHEN Tong[1,4], HUANG Zhangjian[1,2], LAI Yisheng[1,2], PENG Sixun[1,2], JI Hui[1,4*], ZHANG Yihua[1,2**]
[1]*State Key Laboratory of National Medicine, Nanjing 210009;* [2]*Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, Nanjing 210009;* [3]*College of Pharmacy and Chemistry & Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 225300;* [4]*Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

Abstract　In order to search for new anti-inflammatory agents with strong activity and less toxicity relative to CDDO-Me, the ester prodrugs **2-8** of CDDO-Me were synthesized by treatment of oleanolic acid (OA) with DMF/K_2CO_3 to generate **1**, followed by esterification of **1** with various aliphatic and aromatic carboxylic acids, respectively. All the target compounds showed strong inhibitory effects on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. Among them, compounds **2** and **7** possessed the most potent inhibitory effects with IC_{50} = (2.34 ± 0.67) and (3.83 ± 0.97) nmol/L, respectively. Moreover, MTT assay indicated that all the target compounds (**2-8**) displayed much weaker anti-proliferative activity against RAW 264.7 cell lines than CDDO-Me, suggesting that they may be less toxic than CDDO-Me.
Key words　oleanolic acid; CDDO-Me; prodrug; anti-inflammatory activity; synthesis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273378, No. 21472244, No. 21372261 and No. 81202408)

α,β-不饱和酮是许多活性天然产物和化学合成小分子中的药效团,可以作为迈克尔受体与体内多种生物大分子亲核性基团(如半胱氨酸残基的巯基)发生加成反应,通过共价结合,调节细胞内众多信号通路,发挥极其广泛的生物学活性及对疾病的治疗作用[1-2]。

在天然产物五环三萜结构中引入 α,β-不饱和酮基团,其抗炎和抗肿瘤活性可显著提高[3-4]。Honda 等[5]对齐墩果酸(OA)的结构进行改造,合成了 α 位含氰基的 α,β-不饱和酮化合物 CDDO-Me,其抑制 γ-干扰素诱导小鼠巨噬细胞生成一氧化氮(NO)的活性比 OA 强 40 万倍,具有显著的抗炎活性。其后,该小组对 CDDO 的 28 位羧基进行结构修饰,发现其甲酯(CDDO-Me)、羧酰咪唑(CDDO-Im)和二腈基(Di-CDDO)等抑制 NO 生成的活性比 CDDO 更强。本课题组通过 DDQ 介导的 C-O 脱氢偶联合成了全新结构的 CDDO 内酯,发现其抗炎活性与 CDDO-Me 相当[6]。

虽然 CDDO-Me 具有很强的抗炎活性,但也存在不良反应较大的问题[7]。考虑到在药物设计中,常使用药效团潜伏化策略(前药)以达到降低毒性的目的。因此,本研究对 CDDO-Me 的 A 环上 α,β-不饱和酮进行修饰,制备了 CDDO-Me 酯类前药,希望得到活性较强、毒性较小的抗炎药物。
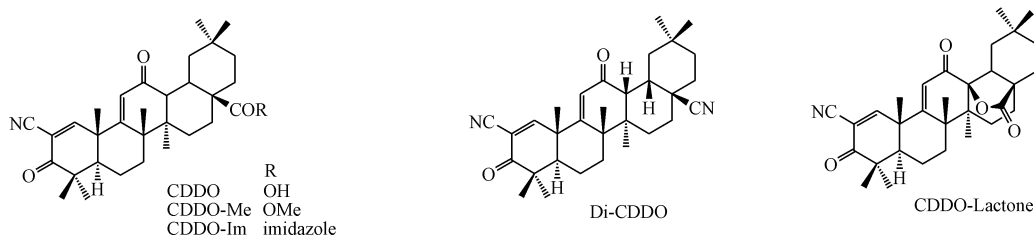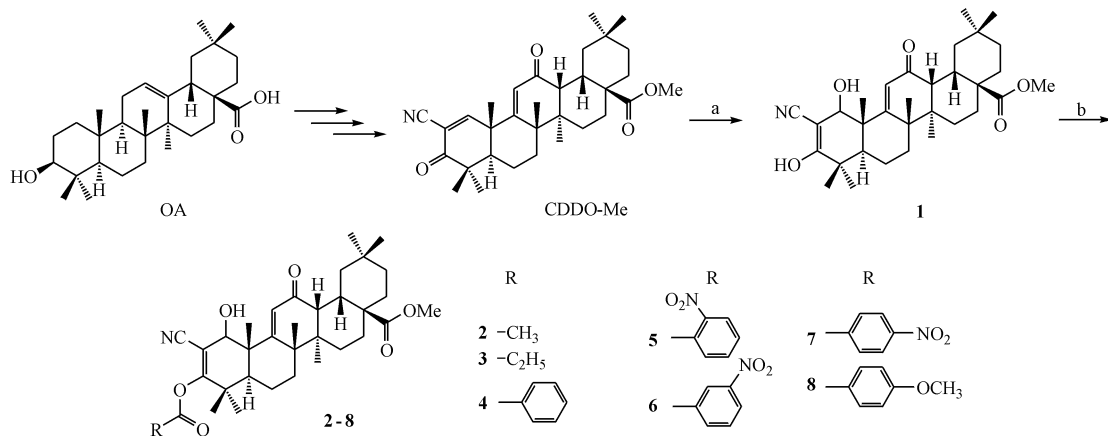

Figure 1 Structures of 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid (CDDO) derivatives

1 合成路线

参照文献[8],以 OA 为原料,分别经 C28-COOH 甲酯化、C3-OH 乙酰化、C-12 位氧化、C-11 位溴取代-消除、C-3 位乙酰基水解、C3-OH 氧化、C-2 位亲核加成、与盐酸羟胺反应、开环,DDQ 氧化脱氢等 10 步反应制得化合物 CDDO-Me。CDDO-Me 在 DMF/K_2CO_3 条件下得到 1,4 加成物 **1**,其 C3-OH 分别与乙酰氯、丙酰氯、苯甲酰氯以及取代的苯甲酰氯反应得到目标化合物 **2 ~ 8**;合成路线如路线 1 所示。目标化合物的结构均经 MS、^1H NMR 及 ^{13}C NMR 确证。

Scheme 1 Synthesis of the target compounds **2-8**
Reagents and conditions:(a) K_2CO_3,DMF,10 h;(b) RCOCl,Et_3N,dry CH_2Cl_2,r. t.,5 min

2 实验部分

2.1 材料

熔点采用 RY-1 熔点仪测定(温度未校正);质谱采用 Hewlett-Packard 1100 LC/MSD 质谱仪测定;核磁共振氢谱采用 Bruker ACF-300 型磁共振仪测定(CDCl$_3$ 为溶剂,TMS 为内标)。实验所用试剂均为市售化学纯或分析纯,除特别说明外,不

经处理直接使用。

2.2　合成实验

1-羟基-2-氰基-3β-乙酰氧基-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**2**)　将 CDDO-Me(100 mg,0. 2 mmol)和 K_2CO_3(41 mg,0. 3 mmol)溶于 DMF 5 mL 中,室温搅拌 10 h,冰浴下滴加乙酰氯(10 mg,0. 3 mmol),搅拌 5 min,继续在冰浴条件下用 1 mol/L 稀盐酸中和反应液,用乙酸乙酯(30 mL)萃取,有机层用饱和 $NaHCO_3$ 水溶液和饱和 NaCl 水溶液各洗涤 3 次,无水硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩,快速硅胶柱色谱制得白色固体 **2**(45 mg,43%)。mp:215 ~ 218 ℃; ^{1}H NMR(300 MHz,CDCl$_3$) δ:5. 84(1H,s,11-CH),4. 53(1H,s,1-CH),3. 69(3H,s,28-COOCH$_3$),3. 05(1H,m,13-CH),2. 95(1H,d,J = 4. 62 Hz,14-CH),2. 31(3H,s,3-COCH$_3$),2. 18(1H,m),2. 05(1H,m),1. 93(1H,m),1. 90(1H,m),1. 68(5H,m),1. 60(2H,m),1. 51(3H,m),1. 33(2H,s),1. 28(2H,s),1. 27,1. 25,1. 19,1. 06,1. 00,0. 99,0. 89(s,each 3H);^{13}C NMR(75 MHz,CDCl$_3$) δ:198. 9,178. 6,172. 9,171. 4,168. 0,124. 4,115. 7,101. 6,71. 4,51. 3,49. 4,49. 1,46. 8,45. 0,44. 4,42. 0,40. 8,39. 5,35. 4,34. 0,32. 8,32. 3,32. 2,31. 7,30. 9,30. 8,30. 1,30. 8,29. 9,28. 8,27. 7,27. 3,27. 1,25. 9,22. 6,22. 2,20. 5,19. 1,17. 8;ESI-MS:566. 2[M + H] $^+$。

1-羟基-2-氰基-3β-丙酰氧基-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**3**)　参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg,0. 2 mmol)、丙酰氯(30 mg,0. 3 mmol)、K_2CO_3(41 mg,0. 3 mmol)制得白色固体 **3**(56 mg,51%)。mp:220 ~ 223 ℃; ^{1}H NMR(300 MHz,CDCl$_3$) δ:5. 82(1H,s,11-CH),4. 52(1H,s,1-CH),3. 68(3H,s,28-COOCH$_3$),3. 03(1H,m,13-CH),2. 94(1H,d,J = 4. 50 Hz,14-CH),2. 58(2H,m,3-COCH$_2$),2. 05(1H,m),1. 93(1H,m),1. 84(1H,m),1. 80(1H,m),1. 73(6H,m),1. 59(1H,m),1. 53(1H,m),1. 27,1. 26,1. 25,1. 19,1. 06(s,each 3H),0. 99(6H,s),0. 89(3H,s);^{13}C NMR(75 MHz,CDCl$_3$) δ:198. 8,177. 7,172. 2,170. 4,168. 0,124. 4,115. 7,101. 6,71. 4,51. 3,49. 4,49. 1,46. 8,45. 0,44. 4,42. 0,40. 8,39. 5,35. 4,34. 0,32. 8,32. 3,32. 2,31. 0,30. 4,30. 3,30. 1,30. 0,29. 2,28. 8,28. 6,27. 7,27. 3,

27. 1,25. 9,22. 6,22. 2,20. 5,19. 1,17. 8;ESI-MS:651[M + Na] $^+$。

1-羟基-2-氰基-3β-苯甲酰基-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**4**)　参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg,0. 2 mmol)、苯甲酰氯(64 mg,0. 4 mmol)、K_2CO_3(41 mg,0. 3 mmol)制得白色固体 **4**(58 mg,49%)。mp:248 ~ 250 ℃; ^{1}H NMR(300 MHz,CDCl$_3$) δ:8. 12(2H,d,J = 7. 17 Hz,Ar-H),7. 65(1H,t,J = 7. 44 Hz,Ar-H),7. 50(2H,t,J = 7. 83 Hz,Ar-H),5. 91(1H,s,11-CH),4. 61(1H,s,1-CH),3. 69(3H,s,28-COOCH$_3$),3. 04(1H,m,13-CH),2. 96(1H,d,J = 4. 50 Hz,14-CH),2. 18(1H,m),2. 05(1H,m),1. 90(1H,m),1. 85(1H,m),1. 68(5H,m),1. 60(2H,m),1. 51(3H,m),1. 33(2H,s),1. 28(2H,s),1. 34,1. 30,1. 25,1. 09,1. 06,0. 99,0. 89(s,each 3H);^{13}C NMR(75 MHz,CDCl$_3$) δ:199. 4,178. 2,172. 9,168. 3,163. 1,134. 2,130. 4,128. 8,128. 1,125. 0,116. 2,102. 8,72. 1,51. 3,49. 3,46. 8,44. 9,44. 1,42. 1,41. 5,39. 8,35. 5,34. 0,32. 8,32. 3,31. 0,30. 2,27. 8,27. 2,23. 4,23. 1,22. 6,22. 2,20. 5,19. 1,17. 8;ESI-MS:628[M + H] $^+$。

1-羟基-2-氰基-3β-(2-硝基苯甲酰基)-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**5**)　参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg,0. 2 mmol)、2-硝基苯甲酰氯(74 mg,0. 4 mmol)、K_2CO_3(41 mg,0. 3 mmol)制得白色固体 **5**(67 mg,51%)。mp:246 ~ 246 ℃; ^{1}H NMR(300 MHz,CDCl$_3$) δ:7. 79(2H,d,J = 7. 53 Hz,Ar-H),7. 71(1H,m,Ar-H),7. 36(1H,t,J = 7. 65 Hz,Ar-H),5. 87(1H,s,11-CH),4. 59(1H,s,1-CH),3. 69(3H,s,28-COOCH$_3$),3. 04(1H,m,13-CH),2. 95(1H,d,J = 4. 50 Hz,14-CH),2. 92(d,J = 4. 65 Hz,1H),2. 31(3H,s),2. 17(1H,s),2. 04(1H,m),1. 88(2H,m),1. 71(3H,m),1. 62(5H,m),1. 50(2H,m),1. 41(2H,m),1. 33(2H,s),1. 31,1. 29,1. 27,1. 20,1. 08,0. 99,0. 89(s,each 3H);^{13}C NMR(75 MHz,CDCl$_3$) δ:177. 7,172. 3,168. 5,161. 8,146. 9,133. 3,131. 9,130. 1,128. 3,126. 0,124. 5,123. 6,115. 6,102. 1,71. 5,67. 7,51. 4,49. 5,46. 8,45. 0,44. 5,42. 0,40. 0,35. 4,34. 0,32. 8,32. 3,31. 0,30. 2,30. 0,29. 2,27. 7,27. 0,23. 4,23. 2,

22.6,22.1,21.2,18.3,17.6;673.3[M+H]⁺。

　　1-羟基-2-氰基-3β-(3-硝基苯甲酰基)-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**6**) 参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg, 0.2 mmol)、3-硝基苯甲酰氯(74 mg,0.4 mmol)、K₂CO₃(41 mg,0.3 mmol)制得白色固体**6**(71 mg, 53%)。mp:247 ～ 249 ℃;¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:8.94(1H,s,Ar-H),8.53(1H,d,J=8.25 Hz,Ar-H),8.46(1H,d,J=8.25 Hz,Ar-H),7.76 (1H,t,J=7.95 Hz,Ar-H),5.89(1H,s,11-CH), 4.62(1H,s,1-CH),3.75(3H,s,28-COOCH₃),3.06 (1H,m,13-CH),2.98(1H,d,J=4.50 Hz,14-CH), 2.16(1H,s),2.05(2H,s),1.89(2H,m),1.70(6H, m),1.55(2H,s),1.49(2H,m),1.35,1.33,1.31, 1.29,1.10,1.00,0.91(s,each 3H);¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃) δ:198.8,177.7,172.1,167.6,160.7, 148.0,135.4,129.7,129.3,128.1,124.7,124.4, 115.3,102.6,71.5,51.4,49.5,46.8,45.1,44.5, 42.0,40.9,39.8,35.4,34.0,32.8,32.3,31.0,30.2, 30.0,29.2,27.7,27.4,23.3,23.2,22.6,22.1,21.2, 20.5,18.9,17.7,13.7;673.3[M+H]⁺。

　　1-羟基-2-氰基-3β-(4-硝基苯甲酰基)-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**7**) 参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg, 0.2 mmol)、对-硝基苯甲酰氯(74 mg,0.4 mmol)、K₂CO₃(41 mg,0.3 mmol)制得白色固体**7**(51 mg, 43%)。mp:252 ～ 254 ℃;¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:8.34(4H,q,J=9.48 Hz,Ar-H),5.92 (1H,s,11-CH),4.63(1H,s,1-CH),3.71(3H,s, 28-COOCH₃),3.26(s,1H),3.06(1H,m,13-CH), 2.98(1H,d,J=4.50 Hz,14-CH),2.17(1H,m), 1.89(2H,m),1.73(6H,m),1.52(5H,m),1.35, 1.32,1.26,1.01,1.09,1.00,0.90(s,each 3H); ¹³C NMR(75 MHz,CDCl₃,) δ:198.9,177.7, 172.0,167.5,160.9,150.7,132.9,131.0,124.5, 123.4,115.4,102.8,71.5,51.4,49.5,46.8,45.1, 44.5,42.0,40.9,39.8,35.4,34.0,32.8,32.3, 31.0,30.2,30.0,29.2,27.7,27.4,23.3,23.2,22.6, 22.1,21.2,20.5,18.9,17.7,13.7;695[M+Na]⁺。

　　1-羟基-2-氰基-3β-(4-甲氧基苯甲酰基)-12-氧代齐墩果烷-2(3),9(11)-二烯-28-羧酸甲酯(**8**) 参照化合物 **2** 的制备方法,由 CDDO-Me(100 mg,

0.2 mmol)、对-甲氧基苯甲酰氯(68 mg,0.4 mmol)、K₂CO₃(41 mg,0.3 mmol)制得白色固体**8**(78 mg, 65%)。mp:258 ～ 260 ℃;¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:8.08(2H,d,J=8.88 Hz,Ar-H),6.98 (2H,d,J=8.88 Hz,Ar-H),5.98(1H,s,11-CH), 4.60(1H,s,1-CH),4.12(3H,s,-OCH₃),3.90 (3H,s,28-COOCH₃),3.06(1H,m,13-CH),2.97 (1H,d,J=4.50 Hz,14-CH),2.17(1H,m),1.89 (2H,m),1.77(8H,m),1.56(4H,m)(m,5H), 1.33,1.30,1.26,1.10,1.06,1.00,0.91(s,each 3H);¹³C NMR(300 MHz,CDCl₃) δ:198.7,177.7, 172.3,168.1,163.9,162.2,132.1,124.4,119.8, 115.7,113.6,102.0,71.7,51.4,49.5,46.8,45.1, 44.5,42.0,40.9,39.8,35.4,34.0,32.8,32.3, 31.0,30.2,30.0,29.2,27.7,27.4,23.3,23.2, 22.6,22.1,21.2,18.9,17.7;658.3[M+H]⁺。

3　抗炎活性实验

　　构建以 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 的炎症模型,测定受试化合物的 NO 抑制率,并计算相应 IC₅₀。通过测定受试化合物各浓度的 NO 抑制率,以每个化合物各个浓度抑制 NO 含量而得出的 IC₅₀ 来反映其体外抗炎活性。

　　取对数生长期的 RAW 264.7 细胞,用完全培养液制成单细胞悬液,调整浓度为每毫升 3×10^5 个,每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,于培养箱内常规培养 24 h。吸弃上清液,每孔加入含有适宜浓度的加药培养基(含 10% 胎牛血清,1% 双抗) 180 μL,空白对照组和模型组只加完全培养基,各组均设 3 个复孔,将细胞与药物共同孵育 2 h。除空白对照组以外,每孔加入用完全培养基稀释的 LPS,使其终浓度为 100 ng/mL,将 LPS 与细胞共同孵育 24 h。24 h 后取上清液 50 μL,先后加入 Griess 试剂 Ⅰ 和 Ⅱ 各 50 μL,用全波长酶标仪测每孔在 540 nm 下吸收度,按下述公式计算化合物各浓度组对 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 产生 NO 的抑制率。将由此公式算得的各浓度抑制率和准确浓度分别代入 SPSS 软件中,算出各个化合物抑制 NO 产生的 IC₅₀。

　　目标化合物 **2~8** 及对照药 CDDO-Me 的 IC₅₀ 见表 1。

Table 1　IC_{50} values of CDDO-Me ester prodrugs against NO production ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compd.	$IC_{50}/(\text{nmol/L})$
2	2.34 ± 0.67
3	9.68 ± 0.85 ***
4	19.25 ± 1.32 ***
5	6.69 ± 1.01 ***
6	12.68 ± 1.22 ***
7	3.83 ± 0.97 **
8	21.19 ± 1.33 ***
CDDO-Me	6.87 ± 1.17

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CDDO-Me group

　　此外,采用 MTT 法,评价了目标化合物 **2 ~ 8** 以及 CDDO-Me 对巨噬细胞的增殖抑制作用,其 IC_{50} 见表 2。

Table 2　Anti-proliferative effects of CDDO-Me ester prodrugs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compd.	$IC_{50}/(\mu\text{mol/L})$
2	3.91 ± 1.16 ***
3	2.90 ± 0.96 *
4	1.25 ± 1.01
5	1.93 ± 0.45
6	4.91 ± 0.89 ***
7	1.52 ± 0.38
8	16.04 ± 1.69 ***
CDDO-Me	0.63 ± 0.23

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs CDDO-Me group

4　结果与讨论

　　如表 1 所示,目标化合物 **2 ~ 8** 在纳摩尔水平均显著抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 NO 生成,其中 **2** 和 **7** 的抑制活性最强 [IC_{50} = (2.34 ± 0.67) nmol/L, IC_{50} = (3.83 ± 0.97) nmol/L],与 CDDO-Me 相当。此外,用 MTT 法评价了目标化合物和 CDDO-Me 对巨噬细胞 RAW 264.7 的增殖抑制作用,发现它们对巨噬细胞的增殖抑制作用均低于 CDDO-Me,提示其毒性小于 CDDO-Me。目标化合物 **2 ~ 8** 在细胞水平显示了与 CDDO-Me 相当的抗炎活性,推测这些化合物在体内可能被酯酶水解得到化合物 **1**,继而发生 1,4-消除,脱去一分子 H_2O,生成原药

CDDO-Me,发挥其抗炎活性。

　　初步构效关系分析表明:(1)C3 位取代基类型对化合物的活性有明显影响,直链取代的脂肪羧酸酯活性优于芳香取代的羧酸酯(**2**,**3** > **4**);(2)苯环对位有吸电子取代的目标物活性优于供电子基取代的目标物(**7** > **8**);(3)吸电子的硝基在苯环不同位置取代其活性存在差异,对位取代活性最高,邻位次之,间位最低(**7** > **5** > **6**)。本课题组正在对化合物 **2** 和 **7** 进一步研究,以发现抗炎活性更强、毒性更小的化合物。

参 考 文 献

[1]　Johansson MH. Reversible michael additions: covalent inhibitors and prodrugs[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2012, **12**(13): 1330 – 1344.

[2]　Shi BL, Greaney MF. Reversible Michael addition of thiols as a new tool for dynamic combinatorial chemistry[J]. *Chem Commun*, 2005(7): 886 – 888.

[3]　You R, Long W, Lai Z, *et al*. Discovery of a potential anti-inflammatory agent: 3-oxo-29-noroleana-1,9(11),12-trien-2,20-dicarbonitrile[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(5): 1984 – 1995.

[4]　Liby KT, Sporn MB. Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease[J]. *Pharmacol Rev*, 2012, **64**(4): 972 – 1003.

[5]　Sporn MB, Liby KT, Yore MM, *et al*. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress[J]. *J Nat Prod*, 2011, **74**(3): 537 – 545.

[6]　Ding Y, Huang ZJ, Yin J, *et al*. DDQ-promoted dehydrogenation from natural rigid polycyclic acids or flexible alkyl acids to generate lactones by a radical ion mechanism[J]. *Chem Commun*, 2011, **47**(33): 9495 – 9497.

[7]　de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, *et al*. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, **369**(26): 2492 – 2503.

[8]　Honda T, Rounds BV, Bore L, *et al*. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: a series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages[J]. *J Med Chem*, 2000, **43**(22): 4233 – 4246.