

## 赖氨酸辅助三聚氰氨连接子环化 $\alpha$ -芋螺毒素[A10L]PnIA

任茅茅, 张宝建, 孙鑫, 杨芳, 长孙东亭, 董帅\*, 罗素兰\*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 药学院, 海南海口 570228)

**摘要:** 三聚氰氨类连接子可用于环化多肽分子, 但其并未应用于富含二硫键且氨基酸残基更多的 $\alpha$ -芋螺毒素中。本研究通过赖氨酸辅助三聚氰氨连接子以 28.92%~52.00% 的产率高效合成环肽 c[A10L]PnIA-1~4; 活性评价结果表明 c[A10L]PnIA-1 对  $\alpha 7$  和  $\alpha 3\beta 2$  烟碱型乙酰胆碱受体的  $IC_{50}$  值相比于本体肽分别有 5 倍与 7 倍的升高, 其亚型选择性得到保持; 圆二色谱结果表明, 环化后多肽二级结构无显著变化。该方法与芋螺毒素常用的首尾环化方法相比, 具有反应快且产率高的优点, 有望进一步应用于多种 $\alpha$ -芋螺毒素的环化研究。

**关键词:**  $\alpha$ -芋螺毒素[A10L]PnIA; 多肽环化; 三聚氰氨连接子; 烟碱型乙酰胆碱受体

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2567-06

## Cyclization of $\alpha$ -conotoxin [A10L]PnIA with lysine assisted cyanuric chloride linker

REN Mao-mao, ZHANG Bao-jian, SUN Xin, YANG Fang, ZHANGSUN Dong-ting,  
DONG Shuai\*, LUO Su-lan\*

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences,  
Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** The cyanuric chloride linkers have been used for cyclizing polypeptide, but not used for  $\alpha$ -conotoxin, the peptides with rich disulfide bonds and more amino acid residues. In this study, cyclic peptides c[A10L]PnIA-1~4 were synthesized efficiently by lysine assisted cyanuric chloride linkers with 28.92%–52.00% yields. The activity evaluation showed that the  $IC_{50}$  values of c[A10L]PnIA-1 against  $\alpha 7$  and  $\alpha 3\beta 2$  nAChR subtypes were 5 and 7 times higher than [A10L]PnIA respectively, and the subtype selectivity was maintained. The results of circular dichroism show that this cyclization method had no significant effect on its secondary structure. Compared with the commonly used head-to-tail cyclization in conotoxin cyclization, this method has the advantages of rapid reaction and high yield, which is expected to be further applied to the cyclization study of various  $\alpha$ -conotoxins.

**Key words:**  $\alpha$ -conotoxin [A10L] PnIA; peptide cyclization; cyanuric chloride linker; nAChRs

芋螺毒素是由海洋软体动物芋螺毒腺所分泌的含有 10~40 个氨基酸残基的活性多肽, 大部分芋螺毒素具有多对二硫键及独特的空间结构, 可特异性作用于钠、钾、钙等多种离子通道及乙酰胆碱受体<sup>[1]</sup>。根据作

用靶点的不同, 芋螺毒素被分为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\rho$  等若干个家族<sup>[2]</sup>。其中  $\alpha$ -芋螺毒素是研究最早且最广泛的一类,  $\alpha$ -芋螺毒素能特异性地阻断烟碱型乙酰胆碱受体 (nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs), 具有高活性以及高选择性的特点, 可作为研究配体-受体相互作用的有效分子工具, 具有较大的药物开发价值, 是潜在的药源分子库<sup>[3]</sup>。

$\alpha$ -芋螺毒素 PnIA 提取于金翎芋螺的毒液, 对  $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ 、 $\alpha 6/\alpha 3\beta 4$ 、 $\alpha 3\beta 4$  及  $\alpha 7$  nAChRs 均有阻断作用<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2021-05-18; 修回日期: 2021-06-07.

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (219QN150); 海南大学教育教学改革研究项目 (hdjy2045).

\*通讯作者 Tel: 86-898-66289538;

E-mail: dongshuai\_1024@163.com; luosulan2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0750

为了提高其选择性与活性, 众多研究者通过修饰改造设计合成了一系列突变体, 其中[A10L]PnIA是将PnIA第十位的丙氨酸替换为亮氨酸得到的突变体, 可特异性阻断 $\alpha 7$ 和 $\alpha 3\beta 2$  nAChRs,  $IC_{50}$ 值分别为12.6和99.3 nmol·L<sup>-1</sup>[5]。研究表明, $\alpha 7$  nAChR与阿尔兹海默症、肺癌等多种疾病相关, $\alpha 3\beta 2$  nAChR则与疼痛相关, 这使得 $\alpha 7$ 和 $\alpha 3\beta 2$  nAChRs成为了非常具有潜力的药物靶标[6,7]。而 $\alpha$ -芋螺毒素[A10L]PnIA对这两种nAChRs亚型均有较强的阻断活性且选择性很好, 因此, $\alpha$ -芋螺毒素[A10L]PnIA具有较高的研究价值。

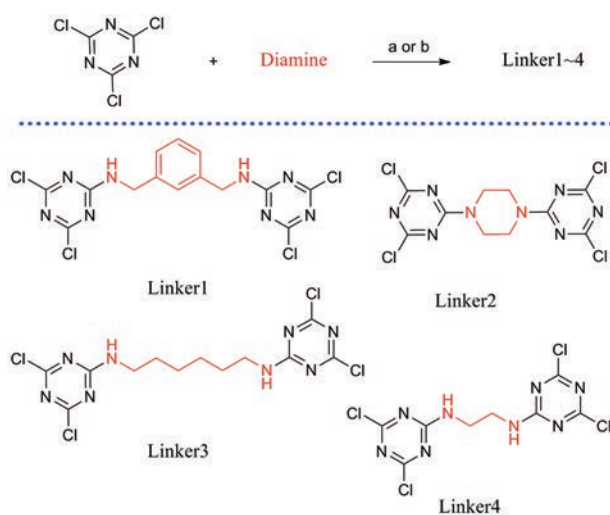
天然活性多肽因其生物活性高, 代谢产物不良反应小等特点而受到研究者的广泛关注, 但多肽在药物应用中也有其自身的局限性, 例如稳定性差, 半衰期短等, 在实际应用中容易受到限制[8]。对多肽进行结构修饰和改造可以在很大程度上改善其成药性, 常见的改造方法有非天然氨基酸修饰、末端结构修饰、环化修饰等, 其中环化修饰是多肽改善稳定性和提高活性的重要策略[9]。天然存在的环肽作为一种重要的生物活性物质, 大部分都具有抗菌、抗癌、免疫抑制等作用, 很多人工合成的环肽也被证实具有相似的临床应用[10]。多肽的环化方式可以分为多肽自身成环及连接子辅助成环。多肽自身成环包括自然化学连接、直接偶联等, 其中直接偶联需要侧链全保护的多肽通过偶联试剂进行环化, 产率较低且工艺复杂。而自然化学连接是侧链未保护多肽N末端的半胱氨酸和C末端的硫酯反应形成环肽, 与直接偶联相比, 操作更为便捷且条件非常温和, 在pH值为7的水溶液中即可反应[11]。连接子辅助成环主要包括氨基酸连接子辅助成环及小分子连接子辅助成环, 前者借助不同长度的氨基酸连接子对侧链保护的多肽进行环化, Li等[12]使用该方法成功环化 $\alpha$ -芋螺毒素TxIB, 但反应产率低, 且反应过程较为复杂。与氨基酸连接子辅助成环相比, 小分子连接子辅助成环具有反应活性好, 产率高等优势。Lautrette等[13]通过一系列亲核试剂对含两个赖氨酸的线性肽进行环化。目前该方法可应用到最多具有14个氨基酸残基的多肽, 多肽的氨基酸残基侧链无需保护, 是一种操作简单、条件温和、产率高、具有广泛应用前景的环化新方法。但该方法并未应用于含有半胱氨酸残基的多肽中, 且其在多于14个氨基酸残基多肽中的应用性并不清楚。因此本课题选取了具有两对二硫键和16个氨基酸残基的 $\alpha$ -芋螺毒素[A10L]PnIA作为环化对象, 探索该环化方法在富含二硫键以及具有更多氨基酸残基的天然多肽中的实际应用。本课题共合成了4个三聚氯氰连接子, 尝试了3种不同的合成路线, 最终完成了[A10L]PnIA的环化。通过双电极电压钳技术,

评价了产率最高的环化产物对7种重要nAChR亚型的阻断活性以及选择性。最后通过圆二色谱初步推断环化后多肽的空间构象变化。

## 结果与讨论

### 1 连接子的合成

以三聚氯氰分别与间苯二甲胺、哌嗪、乙二胺和1,6-己二胺反应, 合成了4种连接子linker1~4(图1), 连接子的结构通过质谱确定。linker1: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  431.01; linker2: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  384.7; linker3: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  411.01; linker4: [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  356.85, 分别与产物理论相对分子质量429.98、382.03、410.01、355.99相对应。

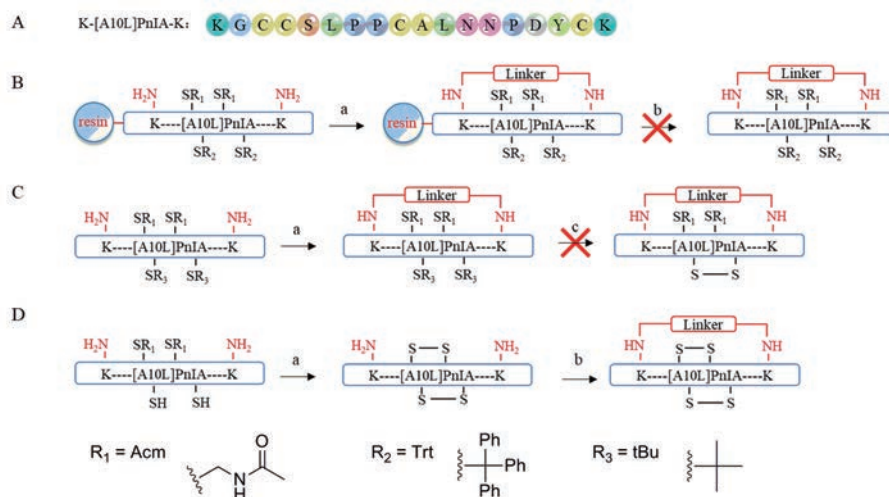


**Figure 1** Structures and synthesis of four linkers. Reagents and conditions: Linker1: a. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeCN, 0 °C-rt; Linker 2-4: b. NaOH, H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0-5 °C

### 2 环肽的合成

为了进行首尾环化, 在[A10L]PnIA首尾各增加一个赖氨酸(K-[A10L]PnIA-K, 图2A)。最初设计3种环化方案, 方案1(图2B)通过Fmoc固相合成法合成了树脂肽resin-K-[A10L]PnIA-K, 在树脂上环化后再切割树脂, 最后进行环肽的氧化折叠。由于脱树脂条件剧烈, 未得到预期环化产物。方案2(图2C)通过Fmoc固相合成法合成了具有两对保护基的线性肽, 先进行环化, 再去保护基并进行氧化折叠, 但脱保护基的同时脱除了连接子。方案3(图2D)通过Fmoc固相合成法合成了只含有一对保护基的线性肽, 先通过两步氧化法合成K-[A10L]PnIA-K的两对二硫键, 构建其活性空间结构, 再利用连接子进行环化, 合成预期环肽, 该方案可行。

经制备型HPLC纯化后的线性肽纯度大于95%, 进行两步氧化折叠及纯化, 得到具有两对二硫键的



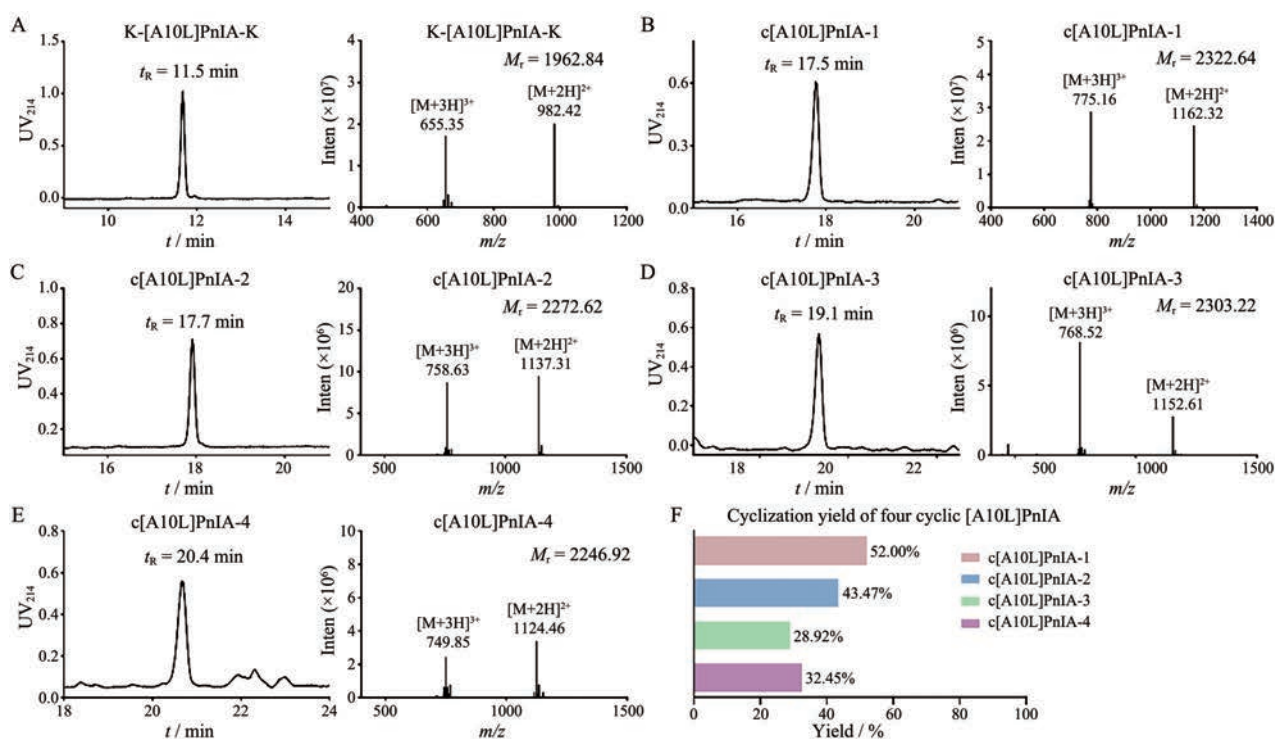
**Figure 2** Sequence and cyclization protocols of K-[A10L]PnIA-K. Sequence of K-[A10L]PnIA-K (A); three cyclization protocols of K-[A10L]PnIA-K (B-D). Reagents and conditions: a. Linker, DIEA, DMF, rt; b.  $K_3[Fe(CN)_6]$ , Tris-HCl, pH 7.5; c.  $I_2$ ,  $H_2O/MeCN$ ,  $N_2$

K-[A10L]PnIA-K, 经分析型 HPLC 分析, 纯度大于 90%, 经质谱分析,  $[M+2H]^{2+}$   $m/z$  982.42、 $[M+3H]^{3+}$   $m/z$  655.35, 由此计算可得  $M_r = 1962.84$ , 与理论相对分子质量 1963.39 相符 (图 3A)。通过连接子将 [A10L]PnIA 首尾环化, 经制备型 HPLC 纯化后, 最终得到 4 个环肽 c[A10L]PnIA-1~4, HPLC 纯度分析高于 90%, 经质谱分析并计算环肽 c[A10L]PnIA-1~4 相对分子质量分别为 2322.64、2272.62、2303.22、2246.92, 与理论相对分子质量 2322.47、2272.41、2302.48、2246.37 相符

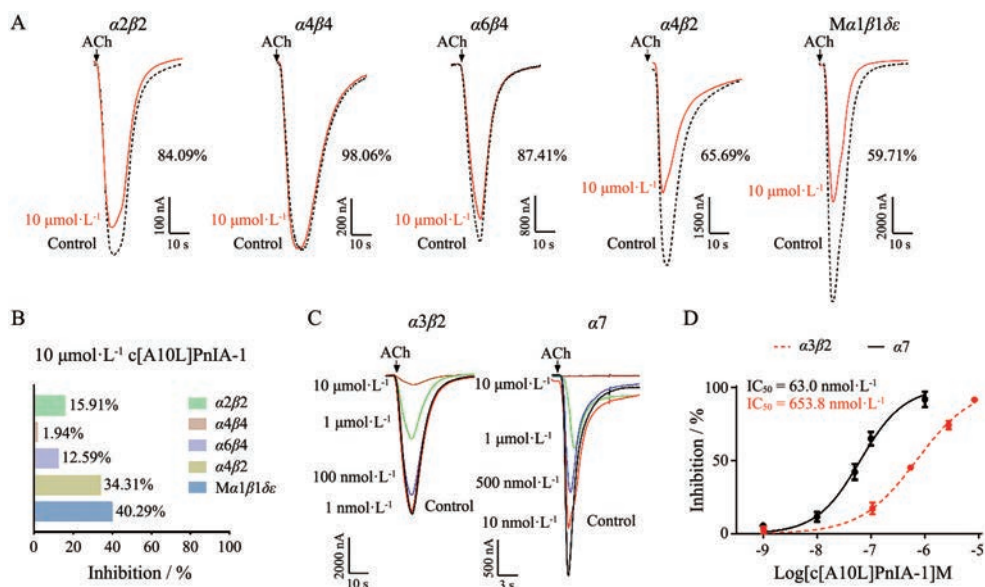
(图 3B~E)。环肽 c[A10L]PnIA-1~4 环化产率分别为 52.00%、43.47%、32.45%、28.92% (图 3F)。

### 3 nAChRs 抑制活性评价

$\alpha$ -芋螺毒素具有由两对二硫键控制的精确的三维立体活性构象, 通常对其结构的改造往往会带来活性的丧失, 因此判断环化方法是否可行的另一主要依据为改造后  $\alpha$ -芋螺毒素的活性是否得到保持。本课题通过双电极电压膜片钳技术, 评价了环肽 c[A10L]PnIA-1 对多种 nAChRs 亚型的阻断活性与选择性。如图 4 所



**Figure 3** HPLC and MS analysis of oxidation and cyclization products of K-[A10L]PnIA-K. HPLC and MS analysis of product of K-[A10L]PnIA-K (A-E); yields of c[A10L]PnIA-1-4 (F)

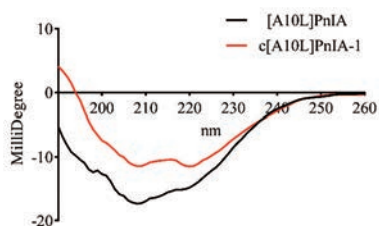


**Figure 4** Response and inhibition of c[A10L]PnIA-1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on different nAChR subtypes (A-B); response and dose-inhibition curves of c[A10L]PnIA-1 on  $\alpha 7$  and  $\alpha 3\beta 2$  nAChR subtypes (C-D)

示, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  c[A10L]PnIA-1 分别对  $\alpha 2\beta 2$ 、 $\alpha 4\beta 4$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 4\beta 2$ 、 $Ma1\beta 1\delta\epsilon$  nAChRs 进行阻断活性评价 (图 4A), 其反应率分别为 84.09%、98.06%、87.41%、65.69% 和 59.71% (图 4B), 对应的阻断率分别为 15.91%、1.94%、12.59%、34.31%、40.29%, 表明 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  c[A10L]PnIA-1 对这 5 种 nAChRs 亚型均无显著阻断作用。将不同浓度的 c[A10L]PnIA-1 对主受体  $\alpha 7$  及  $\alpha 3\beta 2$  进行阻断活性评价 (图 C), 阻断作用较强, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 63.0 nmol·L<sup>-1</sup> (95% CI: 54.4~73.2 nmol·L<sup>-1</sup>) 和 653.8 nmol·L<sup>-1</sup> (95% CI: 580.4~736.5 nmol·L<sup>-1</sup>) (图 4D), 与本体[A10L]PnIA 的 IC<sub>50</sub> 值 (12.6 与 99.3 nmol·L<sup>-1</sup>) 相比, 分别升高了 5 倍和 7 倍。结果表明, c[A10L]PnIA-1 保持了其本体对  $\alpha 7$  及  $\alpha 3\beta 2$  受体的特异性阻断作用, 且活性保持较好。

#### 4 圆二色谱测定

分析本体肽[A10L]PnIA 及环肽 c[A10L]PnIA-1 的圆二色谱图, 两条肽在 208 nm 处均出现负峰, 这说明他们的二级结构中均包含 1 个  $\alpha$  螺旋 (图 5)。谱图整体差别不大, 说明与[A10L]PnIA 本体相比, 环肽 c[A10L]PnIA-1 二级结构无明显改变。



**Figure 5** CD spectrum of [A10L]PnIA and c[A10L]PnIA-1

#### 小结

本文基于双三聚氯氰骨架合成了 4 种小分子连接器用于  $\alpha$ -芋螺毒素 [A10L]PnIA 的环化合成, 探索了 3 种环化路线, 最终通过先氧化折叠线性肽再环化的合成路线合成了 4 个环肽 c[A10L]PnIA-1~4。通过双电极电压膜片钳技术评价了环肽 c[A10L]PnIA-1 对 7 种 nAChR 亚型的抑制活性, 结果表明该环肽对于两个主受体  $\alpha 7$  与  $\alpha 3\beta 2$  nAChR 亚型的 IC<sub>50</sub> 值分别有 5 倍和 7 倍的升高, 且选择性没有改变。圆二色谱结果表明 c[A10L]PnIA-1 与本体肽的二级结构相似。总之, 该环化方法具有反应快速且产率高的优点, 改造后的芋螺毒素活性构象变化小, 活性能够得到较好保持, 有望进一步应用于富含二硫键的  $\alpha$ -芋螺毒素的环化研究。

#### 实验部分

多肽纯化采用 Waters 2535 制备型高效液相色谱仪, 纯度分析采用 Waters e2695 分析型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 受体抑制活性评价采用双电极电压钳系统 (Axon 900A, 美国 Molecular Device 公司), Digidata 1440A 数模转换器, Axon 900A 放大器 (美国 Molecular Device 公司), Sutter Nanoject II 显微注射仪 (美国 Drummond Scientific 公司); 冷冻干燥采用 Alpha 1-4 L 冷冻干燥机 (德国 Christ 公司); 圆二色谱测定采用 MOS-500 圆二色谱仪 (法国 Biologic 公司)。三聚氯氰、间苯二甲胺、无水 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、*N,N*-二异丙基乙胺 (DIEA)、三氟乙酸 (色谱级, TFA)、乙腈 (色谱级, MeCN)、苯酚、甲酸等试剂均购置于上海阿拉

丁生化科技股份有限公司; 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 购自美国 Nasco 公司。

### 1 连接子的合成

连接子的合成路线见图 1, 具体合成方法见参考文献<sup>[14-17]</sup>。

### 2 环肽的合成

两步氧化法。第一步氧化采用铁氰化钾氧化法, 将线性肽 K-[A10L]PnIA-K 水溶液 (10 mmol 溶于 4 mL 水) 缓慢滴加到搅拌条件下的铁氰化钾反应液 (100 mL, 20 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl; pH 7.5) 中, 室温下敞口空气氧化 45 min, 得到具有一对二硫键的第一步氧化产物, 制备型 HPLC 纯化后进行第二步氧化。第二步氧化采用碘氧化法, 将第一步纯化产物在氮气保护下缓慢加入到碘反应液 (100 mL, 7.5 mmol·L<sup>-1</sup>, I<sub>2</sub> 溶于 H<sub>2</sub>O-TFA-MeCN, 体积比 20:1:8) 中, 搅拌反应 10 min, UPLC 检测反应完成后, 加入 VC 饱和溶液终止反应, 制备型 HPLC 纯化后通过质谱检测其相对分子质量, 得到第二步氧化产物, 冷冻干燥后密封置于 -80 °C 保存用于下一步环化反应。

环化方法。将等体积 DIEA-DMF 溶液 (20 mmol·L<sup>-1</sup>) 缓慢加入氧化折叠后的 K-[A10L]PnIA-K 的 DMF 溶液中 (1 mmol·L<sup>-1</sup>), 涡旋 20 s 使其充分混匀后加入等体积的连接子 DMF 溶液 (2 mmol·L<sup>-1</sup>), 涡旋 20 s 后置于室温下 2 h。UPLC 监测反应情况, 反应结束后, 经制备型 HPLC 纯化, 质谱检测其相对分子质量, 确定目标环化产物。最终得到 4 个环肽, 冷冻干燥后密封置于 -80 °C 保存。

### 3 nAChR 抑制活性评价

将环化产率最高的环肽 c[A10L]PnIA-1 通过双电极电压钳技术检测其对不同 nAChRs 亚型的抑制活性与选择性。取冻干环肽 c[A10L]PnIA-1 (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 溶于少量 ND96 溶液 (96.0 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2.0 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 1.8 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.1~7.5) 中, 以此浓度为母液, 10 倍梯度稀释得到 10 mmol·L<sup>-1</sup>~10 nmol·L<sup>-1</sup> 的环肽 c[A10L]PnIA-1 用于活性检测。

将含  $\alpha 3$ 、 $\beta 2$  和  $\alpha 7$  nAChR 亚基基因的质粒经过体外转录获得相应的 cRNA, 挑选状态良好, 大小合适的非洲爪蟾卵母细胞, 把  $\alpha 3$  与  $\beta 2$  的 cRNA 混合, 通过显微注射将混合  $\alpha 3\beta 2$  与  $\alpha 7$  cRNA 分别注入不同的非洲爪蟾卵母细胞内, 每颗蛙卵注射 50.6  $\mu$ L RNA。17 °C 下, 在含抗 ND96 (青霉素 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>、链霉素 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>、庆大霉素 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>) 中培养 3~5 天, 通过 Axon 900A 双电极电压钳系统检测  $\alpha 7$  与  $\alpha 3\beta 2$  受体的表达情况。将配好的不同浓度的环肽 c[A10L]PnIA-1 溶液加入蛙

卵槽中, 测定不同浓度的环肽 c[A10L]PnIA-1 与  $\alpha 7$ 、 $\alpha 3\beta 2$  受体间的相互作用。双电极电压钳条件: 电压 -70 mV, 灌流速度 2 mL·min<sup>-1</sup>, 电阻不高于 1.5 M $\Omega$ , 记录时间为 1 min (2 s ND96 冲洗, 2 s 乙酰胆碱刺激, 56 s ND96 冲洗)。每个浓度点至少重复测定 3 次。利用 GraphPad Prism 6.0 绘制环肽 c[A10L]PnIA-1 对  $\alpha 7$  及  $\alpha 3\beta 2$  的浓度-反应曲线。

### 4 圆二色谱结构测定

通过 MOS-500 圆二色谱仪对 [A10L]PnIA 本体及环肽 c[A10L]PnIA-1 进行分析, 肽浓度均为 0.1 mg·mL<sup>-1</sup>。测试参数为: 灵敏度 100 mdeg; 扫描范围 190~240 nm; 扫描速度 100 nm·min<sup>-1</sup>; 响应时间 2 s。每个样品均先测试蒸馏水背景, 再测试待测样品。

**作者贡献:** 作者任茅茅负责化合物的设计、合成、活性测定与稿件撰写; 作者张宝建负责化合物结构的分析与鉴定; 作者孙鑫和杨芳负责化合物的分离纯化; 作者长孙东亭、董帅和罗素兰负责实验设计、过程指导、稿件撰写与修改。

**利益冲突:** 本文作者声明无任何利益冲突。

### References

- [1] Jin AH, Muttenthaler M, Dutertre S, et al. Conotoxins: chemistry and biology [J]. Chem Rev, 2019, 119: 11510-11549.
- [2] Olivera BM, Cruz LJ. Conotoxins, in retrospect [J]. Toxicon, 2001, 39: 7-14.
- [3] Giribaldi J, Dutertre S. alpha-Conotoxins to explore the molecular, physiological and pathophysiological functions of neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. Neurosci Lett, 2018, 679: 24-34.
- [4] Armishaw C, Jensen AA, Balle T, et al. Rational design of alpha-conotoxin analogues targeting alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: improved antagonistic activity by incorporation of proline derivatives [J]. J Biol Chem, 2009, 284: 9498-9512.
- [5] Luo S, Nguyen TA, Cartier GE, et al. Single-residue alteration in alpha-conotoxin PnIA switches its nAChR subtype selectivity [J]. Biochemistry, 1999, 38: 14542-14548.
- [6] Bouzat C, Lasala M, Nielsen BE, et al. Molecular function of alpha7 nicotinic receptors as drug targets [J]. J Physiol, 2018, 596: 1847-1861.
- [7] Xu M, Zhu X, Yu J, et al. The crystal structure of Ac-AChBP in complex with alpha-conotoxin LvIA reveals the mechanism of its selectivity towards different nAChR subtypes [J]. Protein Cell, 2017, 8: 675-685.
- [8] He J, Liang J, Xuan M, et al. Effective strategies for improving the stability of peptides *in vivo* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 25-32.
- [9] Peng J, Wang J, Dai W, et al. Lead compound optimization strategy (7)—modification strategies for peptides [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 427-445.

- [10] Reguera L, Rivera DG. Multicomponent reaction toolbox for peptide macrocyclization and stapling [J]. *Chem Rev*, 2019, 119: 9836-9860.
- [11] Chow H, Zhang Y, Matheson E, et al. Ligation technologies for the synthesis of cyclic peptides [J]. *Chem Rev*, 2019, 119: 9971-10001.
- [12] Li X, Wang S, Zhu X, et al. Effects of cyclization on activity and stability of alpha-conotoxin TxIB [J]. *Mar Drugs*, 2020, 18: 180.
- [13] Lautrette G, Touti F, Lee HG, et al. Nitrogen arylation for macrocyclization of unprotected peptides [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 8340-8343.
- [14] Chen Y, Wang D, Huang Z, et al. Synthesis, structure, and functionalization of homo heterocalix[2]arene[2]triazines: versatile conformation and cavity structures regulated by the bridging elements [J]. *J Org Chem*, 2010, 75: 3786-3796.
- [15] Gajjar DG, Patel RM, Patel HN, et al. Designing, characterization, and thermal behavior of triazine-based dendrimers [J]. *J Polym Eng*, 2015, 35: 41-52.
- [16] Lin X, Liu X, Xu D, et al. Synthesis and characterization of a four-arm initiating core containing 1,3,5-triazine [J]. *Fine Chem (精细化工)*, 2007, (02): 194-198.
- [17] Bu J, Liang H, Zhang D, et al. Preparation and expansion properties of a novel UV-curable intumescent flame-retardant coating [J]. *J Therm Anal Calorim*, 2015, 122: 329-338.