

·基础研究·

A型肉毒毒素重链对大鼠脊髓损伤局部颈上神经节蛋白10的表达及神经突起再生的影响*

王亚芳¹ 高扬¹ 李志强¹ 刘雅¹ 赵明伟¹ 袁海霞¹ 李夏青^{1,2}

摘要

目的:探讨人工重组A型肉毒毒素重链(BoNT/A重链)对大鼠脊髓损伤局部颈上神经节蛋白10(SCG10)表达、神经突起再生以及损伤侧后肢感觉及运动功能的影响,为阐明BoNT/A重链促神经突起生长的作用提供实验依据。

方法:大鼠单侧腰段脊髓横断损伤模型基础上局部及鞘内给予BoNT/A重链;于用药后不同时间提取局部蛋白进行双向电泳,并根据双向电泳提示的蛋白点群变化的分子量和等电点,选取SCG10为目标蛋白行Western Blot检测及神经突起测定;通过抓力和热痛敏实验测试损伤侧后肢的运动和感觉功能情况。

结果:①BoNT/A重链可干预脊髓损伤后局部蛋白谱的变化,MW位于18—25kDa、等电点在5—7范围的蛋白点可以作为蛋白点群变化的代表之一;②作为分子量位于18—25kDa/等电点在5—7的蛋白成分之一的SCG10在单纯损伤时较正常对照组其表达有所增高,给予BoNT/A重链后,SCG10的表达显著增强($P<0.05$);③免疫荧光结果显示:单纯损伤时SCG10的阳性表达主要分布于损伤周边细胞的胞体,应用BoNT/A重链后,SCG10阳性分布于胞浆和细胞突起且以损伤近头端的周边区域较为显著;④突起测定结果显示:BoNT/A重链可促进脊髓损伤周边神经细胞突起增长,包括突起数目增多及含有突起的神经细胞百分比增多($P<0.05$);⑤给予BoNT/A重链后,损伤侧后肢肌力明显优于单纯损伤组($P<0.05$),但感觉功能未见明显改善。

结论:脊髓损伤局部给予BoNT/A重链可促进生长相关蛋白SCG10的表达并促进损伤周边神经细胞突起生长,改善肌肉抓力。BoNT/A重链有助于脊髓损伤后的再生修复。

关键词 肉毒毒素;A型肉毒毒素重链;脊髓损伤;颈上神经节蛋白10;神经突起;神经再生

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-10-1142-07

Effects of intrathecal injection of Botulinum neurotoxin type A heavy chain on superior cervical ganglion 10 and neurite outgrowth after spinal cord injury in rats/WANG Yafang, GAO Yang, LI Zhiqiang, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(10): 1142—1148

Abstract

Objective: To investigate the effect of recombinant botulinum neurotoxin serotype A heavy chain (BoNT/A heavy chain) on the expression of superior cervical ganglion 10 (SCG10) and its influence in neurites spreading after unilateral lumbar spinal cord injury (SCI) in rats. Meanwhile, the ipsilateral thermal hyperalgesia and grasp power were also measured in order to evaluate the role of BoNT/A heavy chain in promoting spinal functional repair after SCI.

Method: Recombinant BoNT/A heavy chain was locally and intrathecally administrated onto unilateral lumbar spinal cord injured rats. First of all, two-demension gel electrophoresis was proceeded for protein extracted from injured SCI tissues, SCG10 was chosen as representative of the altered proteins for morphological feature assessment. On the other hand, thermal hypergelsia and grasp power at ipsilateral hindlimb were also measured

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.10.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(81171178);山西省回国留学人员科研资助项目(2012046)

1 山西医科大学基础医学院病理生理教研室,太原,030001; 2 通讯作者

作者简介:王亚芳,女,硕士研究生;收稿日期:2017-08-07

to test the sensory and motor function.

Result: ①BoNT/A heavy chain may intervened the local expression pattern of protein after SCI. ②SCG10, representative of growth-related protein showed mild increase while SCI only ($P<0.05$) and remarkable increase after BoNT/A heavy chain application. ③The immuno-fluorescence on SCI sections exhibited that the SCG10 positive points mainly appeared at the cyton surrounding the injury. After BoNT/A heavy chain treatment, SCG10 positive points distributed among the cytoplasm and neuronal processes, especially the rostral area surround the injury. ④The measurement of SCG10 positive neuronal process revealed that BoNT/A heavy chain promote the growth of neuronal process, including the process length and number percentage of cells with identifiable process ($P<0.05$). ⑤The application of BoNT/A heavy chain after SCI didn't affect the sensitive function, but significantly improved the ipsilateral hindlimb grasp power ($P<0.05$).

Conclusion: The application of BoNT/A heavy chain after SCI was benefited on stimulating the expression of SCG10, a protein related to growth and regeneration. Also, BoNT/A heavy chain stimulated the outgrowth of neuronal process after SCI and facilitated the recovery of hind limb motor function after SCI.

Author's address Department of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, 030001

Key word Botulinum neurotoxins; Botulinum neurotoxin serotype A heavy chain; spinal cord injury; superior cervical ganglion 10; neuronal processes; nerve regeneration

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指各种创伤或非创伤因素引起的损伤平面以下运动、感觉和自主神经功能的丧失。SCI后由于再生障碍,致残率极高,严重影响患者的生存质量。SCI后神经再生障碍的主要原因归结于损伤局部大量轴突再生抑制因子的产生、轴突再生相关基因不能上调或再生相关蛋白合成障碍^[1-5]。

A型肉毒杆菌毒素(Botulinum neurotoxin serotype A, BoNT/A)是由肉毒杆菌产生的神经毒素之一^[6-7]。其主要的致毒机制是基于毒素与运动终板突触前膜相应受体、导致突触囊泡蛋白25(synaptosomal-associated protein 25, SNAP-25)裂解、使神经递质(乙酰胆碱)释放受阻^[8-11],导致骨骼肌收缩障碍发生麻痹^[12]。除阻断乙酰胆碱的释放外,肉毒毒素也可抑制囊泡内其他物质的释放,譬如:降钙素基因相关多肽、P物质等^[13-14]。化学结构上,A型肉毒毒素由两条肽链组成,根据分子量大小分为重链(heavy chain)和轻链(light chain),二者之间由二硫键相连。重链含有与宿主细胞结合的区域;轻链则为毒素的毒性催化单位,其具有 Zn^{2+} 依赖性蛋白酶活性。除引起神经递质释放受阻外,A型肉毒毒素中毒后期局部可出现运动终板样结构的形成^[14]。后者的出现与毒素的毒性作用之间究竟存在何种内在联系并不清楚。作为与靶细胞结合的BoNT/A重链本身是否是影响神经末梢结构改变的主要成分研

究甚少。

因此,本文在大鼠脊髓半横断损伤模型的基础上,采用人工重组的BoNT/A重链进行局部及髓腔内间断性连续给药,观察BoNT/A重链对脊髓损伤局部蛋白表达谱的影响;并选择SCG10作为生长相关蛋白的代表进行检测,探讨BoNT/A重链对SCI后生长相关蛋白表达及神经突起生长的影响,同时观察BoNT/A重链对损伤侧感觉和运动功能的影响,为阐明BoNT/A重链促神经突起再生作用提供进一步的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及模型复制

雄性成年SD大鼠(体重200—220g), SPF级,由北京海淀实验动物养殖场提供,许可证号:SCXK(京)2014-0013。BoNT/A重链购自美国List Biological Laboratories, Inc。动物的使用及操作按照本校动物管理委员会的规定执行。单侧腰段脊髓损伤模型的复制参照已经建立的模型方法复制^[15]。步骤:麻醉后的大鼠背位固定于鼠台上,根据髂棘首先定位(L3/4)椎间隙,由此定位T9/10椎间隙,以T9—T10紧靠后棘突间左侧插入改良的注射器针头造成左侧单侧脊髓局限性损伤。损伤过程中,大鼠出现脊椎向腹侧弯曲,损伤侧后肢短暂抽搐,表明损伤成功。麻醉苏醒后大鼠呈现损伤侧后肢拖地行

走,表明造模成功。

1.2 局部及腰骶部鞘内给药

SCI模型复制同时,由针头所连接注射器向髓腔内缓慢注入4 μ g/20 μ l BoNT/A 溶液。模型复制后每隔1周再经皮腰骶部鞘内注射给予BoNT/A重链制剂(2 μ g/10 μ l)^[16],单纯损伤组在建模后立即局部和每周经皮鞘内注射等量生理盐水,直至相应存活时间。

1.3 实验分组

大鼠随机分组。①假手术组(正常对照组):切开皮肤,剪去椎板、暴露脊髓,但不损伤脊髓;②单纯损伤组:切开皮肤,剪去椎板、暴露脊髓并行左侧脊髓离断术,按时相分为2天、1周、2周和4周组;③脊髓损伤+BoNT/A重链干预组:单侧腰段脊髓离断同时局部给予及随后每周鞘内给予BoNT/A重链制剂(剂量如上所述),直至相应存活时间,按时相分为2天、1周、2周和4周组。每组6只大鼠;在上述各相应时间点处死动物进行取材。

1.4 双向电泳-硝酸银染色检测脊髓蛋白体表达

各实验组大鼠分别在不同时间点(2天、1周、2周和4周)沿原手术部位打开脊椎、暴露脊髓,用剃须刀片切取包括损伤中心、距损伤中心上下各0.5cm的损伤侧脊髓组织。标本置于预冷的蛋白裂解液内用玻璃研磨器研磨制备组织匀浆。采用Bradford法对组织匀浆蛋白浓度进行测定。

每组标本取150 μ g蛋白,上样于pH3—10的NL IPG预制干胶条进行第一向等电聚焦,随后进行第二向电泳(12.5%的聚丙烯酰胺凝胶)。对完成电泳后的凝胶进行硝酸银染色。采用Bio-Rad凝胶成像系统对胶条进行成像及分析处理。

1.5 SCG10的Western Blot检测

每组样本取20 μ g蛋白样品上样于15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。转膜后用5%的脱脂奶粉封闭1h,加入兔抗SCG10多克隆抗体(1:1000, Thermo Fisher, 720178),兔抗GAPDH多克隆抗体(1:5000, Bioword, AP0063),4 $^{\circ}$ C冰箱摇床过夜;TBST充分洗膜后,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1:1000, Bioword, AP0063),室温孵育1h,暗室显影后的胶片置于凝胶成像分析系统进行蛋白条带的摄像分析。

1.6 SCG10的免疫荧光检测

每组取两只大鼠分别在不同时间点(2天、1周、2周和4周)用4%的多聚甲醛灌注固定,收取包括损伤中心、损伤上下端,长约1.0cm的脊髓置于相同固定液中后固定1h,移入30%的蔗糖溶液中4 $^{\circ}$ C过夜。在冰冻切片机上进行由背部向前面的额状纵切面连续切片,厚度为16 μ m。每个动物选取所有含损伤缺损部位切片(7—8张)。切片经0.1% TritonX-100透膜、10%正常血清封闭后,加入兔抗SCG10多克隆抗体(1:500, Thermo Fisher, 720178),兔抗GAPDH多克隆抗体(1:5000, Bioword, AP0063),4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜。PBS充分冲洗(5min \times 3次)后加入Alexa Fluor 594标记的羊抗兔IgG二抗(1:500; Life Technologies, A11012),室温避光孵育1h,封片后置于荧光显微镜(Olympus IX71,日本)下进行观察并采集图片。

1.7 脊髓神经元突起测量

对SCG10免疫荧光染色阳性细胞进行神经突起测定。测定指标包括阳性细胞突起的总长度测定、细胞突起的数目测定以及有突起细胞占阳性细胞的百分比测定。参照文献报道方法确定神经突起并进行测定^[17—19]:①对单个神经元而言,以胞体和突起结合部为起始点,以最长的突起末端为终点,进行突起的轨迹追踪;②突起的长度须大于细胞的长径方可作为突起。突起长度的测定采用Image J软件进行。

1.8 脊髓损伤后的脊髓功能测定

分别在模型复制前,模型复制后第2天、第1周、第2周、第4周通过热痛敏试验和肌力测定评估大鼠的感觉和运动功能。热痛敏试验通过撤足阈值(paw withdrawal latency PWTL)来评估(单位:s)。为避免长时间热刺激造成组织损伤,热刺激时间不宜超过25s。以10min的间隔对损伤侧后足各测3次,3次撤足潜伏期的均值为所得数据(每组6只)。肌力测定通过YLS-13A抓力测定仪测定。指标为大鼠损伤侧后爪抓住网格的力度(单位:g)。数值越小肌力越小,表明运动功能明显受损(每组6只)。

1.9 统计学分析

实验数据用均数 \pm 标准误表示。蛋白条带及神经突起的量化指标采用Image J软件进行测定;采用GraphPad Prism 5.0统计软件对数据进行统计学处理:多组间均数差异用单因素方差分析(one-way

ANOVA),组间两两比较用SNK-*q* 检验。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

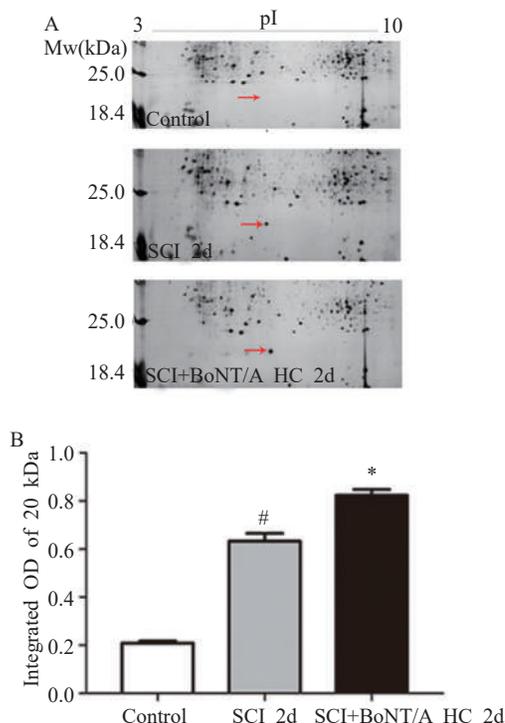
2.1 BoNT/A 重链对SCI后局部蛋白总体表达谱的影响

双向电泳及硝酸银染色结果表明:单纯SCI后局部蛋白表达与正常呈现明显不同。损伤后脊髓局部有些蛋白表达点或点群呈下降或升高趋势;给予BoNT/A重链后局部蛋白表达的特征显示:不论单纯损伤时蛋白表达的变化如何,BoNT/A重链作用下与单纯损伤相对应位点的蛋白表达皆呈现升高趋势($P<0.05$),譬如:分子量在18—25kDa之间、等电点在7左右的蛋白表达点在单纯损伤时较正常对照组有所增多($P<0.05$),当给予BoNT/A重链治疗后其表达较单纯损伤进一步显著增多(图1, $P<0.05$)。

2.2 BoNT/A重链促进SCI后SCG10的表达

Western Blot检测结果显示:单纯损伤组在第2

图1 分子量在18.4—25kD左右的蛋白表达变化



图A: 箭头指示分子量在20 kDa左右的蛋白点
图B: 分子量在20 kDa左右的蛋白点表达变化比较;# $P<0.05$,与正常对照组相比;* $P<0.05$,与单纯损伤组相比

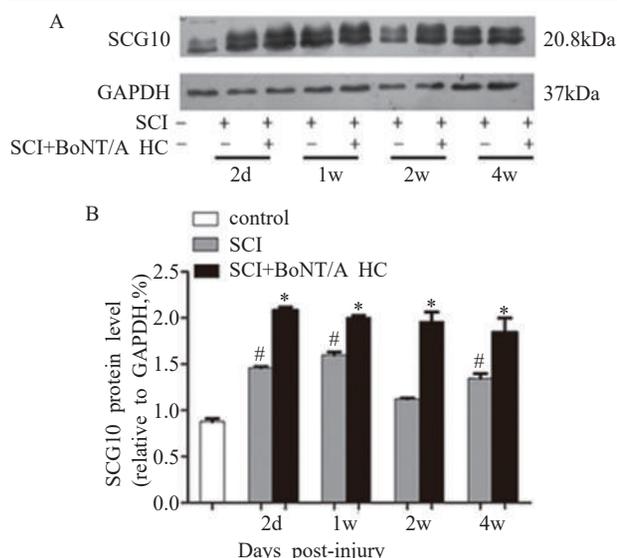
天和第1周时,SCG10的表达较正常对照组有所升高 ($P<0.05$),但随着损伤后时间推移,SCG10的表达逐渐下降。给予BoNT/A重链后的2天和1周时SCG10表达显著增高,不仅与正常对照组相比差异显著,而且与单纯损伤组相比差异亦具有显著性意义($P<0.05$)。当损伤达到2周和4周时,BoNT/A重链治疗组中SCG10仍呈高表达状态(图2, $P<0.05$)。

2.3 SCG10阳性表达的分布及其神经突起测定

SCG10的免疫荧光染色显示:在SCI后2天、1周时,损伤局部的头尾两端靠近损伤边缘,SCG10的荧光强度有所增强,高倍镜下可见阳性主要分布于细胞体;但单纯损伤组在损伤后2周时,上述区域SCG10的细胞体阳性有所减弱。而采用BoNT/A重链连续给药后,同时间点损伤局部头尾端的荧光强度比单纯损伤组更为明显,且损伤后2周和4周时仍持续强阳性表达(图3)。高倍镜下的荧光特征显示:采用BoNT/A重链干预的脊髓损伤局部SCG10阳性荧光染色不仅分布于细胞胞浆,同时细胞突起也呈现阳性反应,由此而使细胞突起显而易见。

基于SCG10免疫荧光染色特征,对SCG10标记的阳性细胞突起进行测定的结果显示:正常对照组脊髓组织中SCG10仅呈现细胞体的弱阳性反应。单纯SCI 1周时,尽管损伤周围SCG10阳性细胞数目较正常对照组有所增多,但细胞突起并不十

图2 BoNT/A重链对SCG10表达的影响



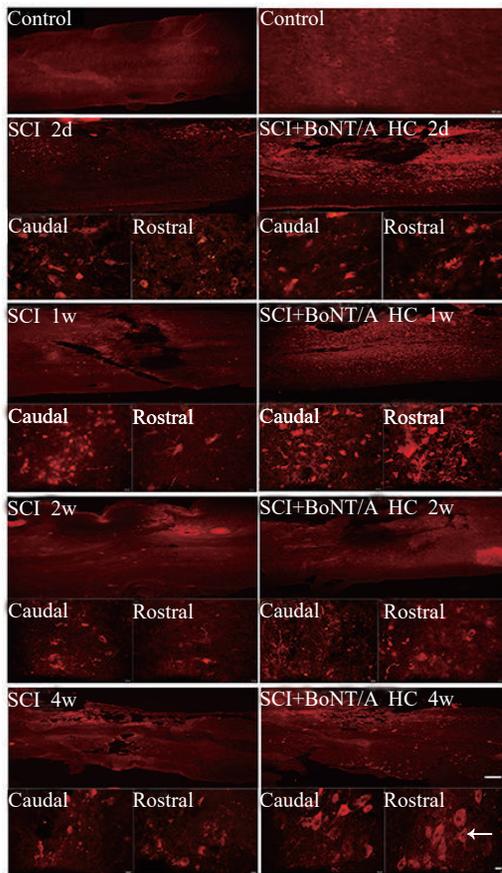
#与正常对照组相比 $P<0.05$; *与单纯损伤组相比 $P<0.05$

分清晰,即使在损伤后4周时,也未看到明显的细胞突起阳性。然而,在模型复制后不同观察时间段,BoNT/A重链治疗组中的SCG10阳性细胞突起明显可见,长度和数目皆有增多趋势;至模型复制后4周时,神经突起的长度接近400 μ m左右,差异有显著性意义(图4, $P < 0.05$)。同时,实验中还观察到,经BoNT/A重链治疗的SCI周边组织中具有突起的细胞的百分比也显著增加($P < 0.05$)。结果提示SCI后给予BoNT/A重链可促进神经细胞突起的生长。

2.4 BoNT/A重链干预SCI后后肢体功能的恢复

SCI后不同时间点的热痛敏实验和肌力测定结果显示:SCI后同侧后肢的抓力(运动功能)明显降低,而采用BoNT/A重链治疗的大鼠其抓力较正常对照组低,但明显优于单纯损伤组(图6, $P < 0.05$)。

图3 BoNT/A重链对SCI后SCG10阳性分布的影响



Control:假手术组;SCI:单纯损伤组;SCI+BoNT/A HC:脊髓损伤加BoNT/A重链组;Caudal:损伤尾侧;Rostral:损伤头侧;2天,1周,2周和4周分别代表损伤后2天,1周,2周和4周;右下角SCI+BoNT/A HC 4周和Rostral中的bar 分别为50 μ m和20 μ m;箭头指示为SCG10阳性细胞

热痛敏试验结果提示:SCI后热痛敏时间无限延长(感觉功能障碍);给与BoNT/A重链后,其热痛敏时间未见到显著改善(表1)。

表1 各组动物热痛敏试验的痛阈比较 (n=6,s)

组别	第0天	第2天	第1周	第2周	第4周
Control	8.5 \pm 0.2	8.5 \pm 0.2	8.3 \pm 0.1	7.8 \pm 0.2	8.2 \pm 0.2
SCI	8.5 \pm 0.2	22.8 \pm 1.0 ^①	22.1 \pm 0.9 ^①	22.4 \pm 1.0 ^①	21.5 \pm 0.9 ^①
SCI+BoNT/A HC	8.5 \pm 0.2	24.4 \pm 0.3	24.5 \pm 0.3	24.1 \pm 0.4	22.5 \pm 0.9

注:① $P < 0.05$,与对照组比较

3 讨论

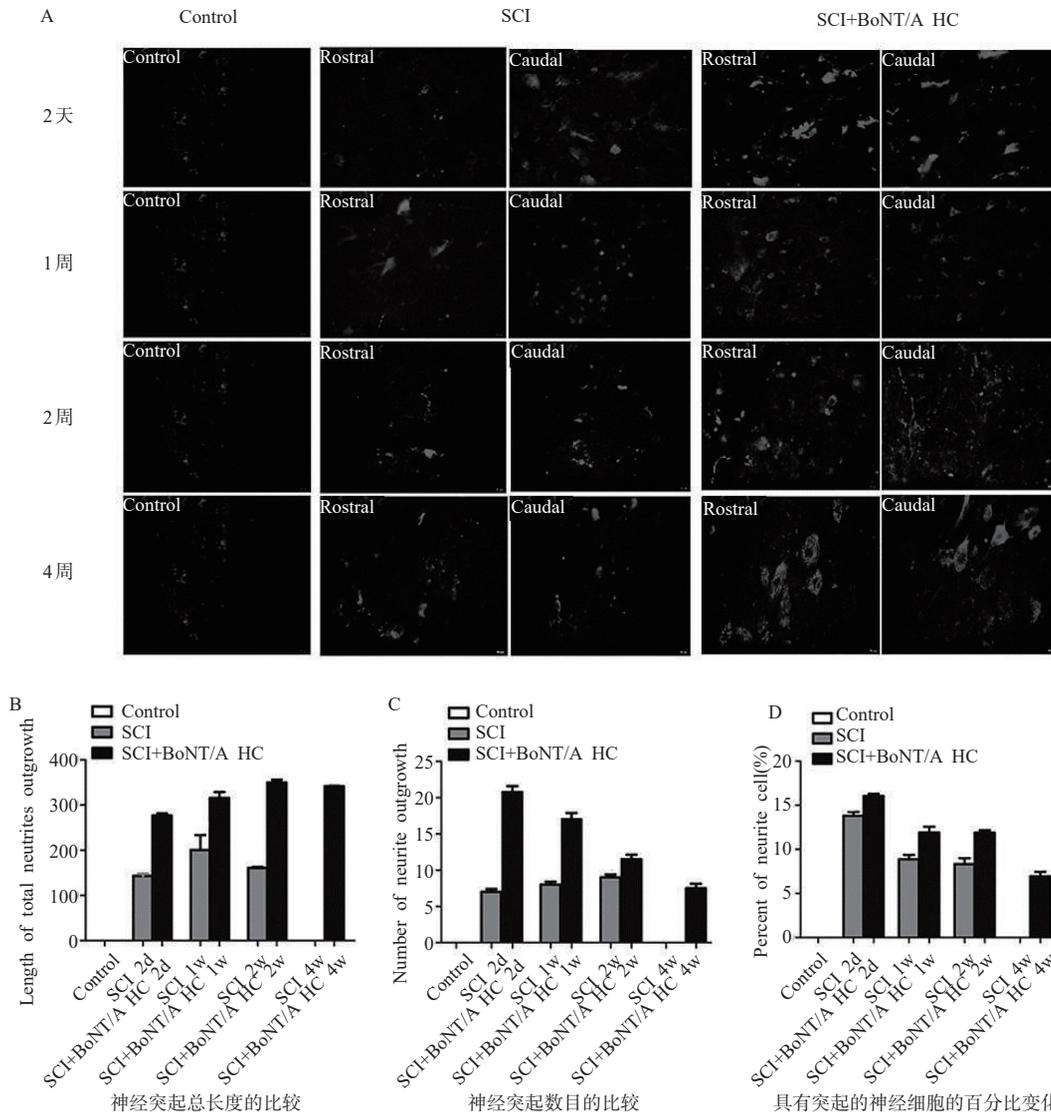
本研究在单侧腰段SCI基础上采用局部和鞘内间断性连续给予BoNT/A重链以观察BoNT/A重链对SCI后局部蛋白表达(尤其是再生相关蛋白)、神经突起再生及脊髓运动感觉功能的影响。根据局部脊髓组织的双向电泳结果及SCG10的分子量和生物学作用,实验中选择SCG10作为目标生长相关蛋白进行验证检测。通过观察BoNT/A重链对脊髓损伤局部生长相关蛋白SCG10表达、SCG10阳性神经突起的变化及其相应的运动感觉功能的测定进一步确定在体应用BoNT/A重链是否可促进SCI后神经组织的再生修复、有助于SCI后功能的恢复。

中枢神经系统(CNS)损伤后再生障碍是导致脊髓功能丧失的主要机制之一。因此,通过各种方式激活CNS的内在生长程序,或通过提供一个允许的环境来促进CNS的神经细胞或轴突再生、积极探讨促进SCI后的再生修复的新药制剂及其方法是再生医学的焦点之一。

神经轴突损伤后的再生依赖于再生相关基因(regenerative associated genes, RAGs)及其对应蛋白质在神经细胞内的转录和翻译合成^[20]。有研究者曾经观察到外周神经损伤早期的细胞体反应之一表现为所属神经元的mRNA及其相关蛋白的合成明显增加,这种反应呈现了损伤后积极主动的再生修复过程^[21-22]。生长相关蛋白颈上神经节蛋白10(SCG10,也被称为STMN2,属于stathmin家族蛋白)是参与神经轴突再生的主要结构蛋白之一,主要通过参与轴突内的微管动力学和蛋白质转运而在轴突的生长过程中发挥重要作用,是神经轴突再生的标志蛋白之一^[23-28]。SCG10的分子量大约为20kDa,恰好位于本实验所观察到的蛋白表达变化点群范围内。

图4 BoNT/A HC对神经突起的影响

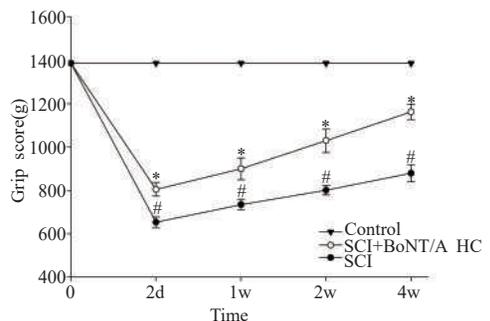
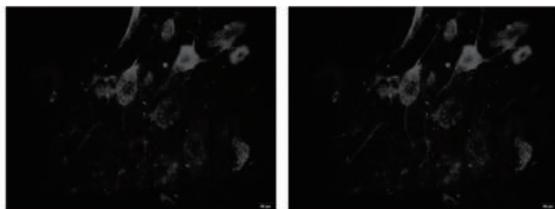
(Bar=20μm)



#P<0.05,与正常对照组相比; *P<0.05,与单纯损伤组相比

图6 BoNT/A 重链对SCI后运动功能恢复的影响

图5 SCG10免疫荧光阳性显示的神经突起的轨迹追踪 (Bar=20μm)



#P<0.05,与对照组比较;*P<0.05,与单纯损伤组相比

本研究 Western Blot 结果显示:在单纯 SCI 时 SCG10 的表达有所增多,这种损伤后的表达增加呈现短暂性,随损伤时间延长逐渐降低,因此可以看作是脊髓组织对损伤做出的有限再生反应。由于 CNS 损伤后局部还有大量的髓磷脂抑制因子的产生及损伤周围细胞外环境的改变,因此 SCI 后 SCG10 的表达增加并不能代表神经轴突可以进行有效再生。然而,不论 SCI 后随时间变化的特征有何差异,SCI 后给予 BoNT/A 重链则可促进 SCG10 表达在损伤基础上进一步增强且呈现较长时效的高表达。与此同时,BoNT/A 重链增强的 SCG10 表达阳性的细胞其细胞突起的长度、数量也明显增多,这些结果提示:BoNT/A 重链对 SCG10 表达的促进作用可以看作是 BoNT/A 重链在体发挥促神经突起生长的机制之一。这与我们前期的体外实验研究结果是一致的^[29]。而相应时间点行为学结果提示,BoNT/A 重链治疗组与单纯损伤组相比,运动功能明显增强,但感觉功能并未改善。因此,我们推测,BoNT/A 重链可能有选择性地、主要作用于运动神经细胞中 SCG10 的表达,促进神经元突起的生长促进受损神经元的再生修复,进而可促进后肢运动功能恢复。感觉功能未改善,可能是由于 BoNT/A 重链通过影响疼痛传导信号,减少疼痛相关神经递质的释放,减少外周敏化,间接地减少中枢致敏起到镇痛作用,从而提高痛阈值^[30]。BoNT/A 重链在体干预脊髓组织中何种细胞的 SCG10 的表达有待于今后进行更为详尽的研究证实。

不容置疑,BoNT/A 重链促进 SCI 后神经再生修复的过程是多方面的。前期实验已观察到 BoNT/A 重链可引起 SCI 局部蛋白表达谱多个位点的变化,有些表现为增多,有些则明显减少。BoNT/A 重链对神经细胞的干预作用并不仅限于干预生长相关蛋白的表达。我们同期的实验研究已观察到 BoNT/A 重链可以抑制髓鞘相关糖蛋白(myelin associated glycoprotein, MAG)的表达,并可拮抗 MAG 促 ROCK 的磷酸化。因此,BoNT/A 重链可以克服轴突再生抑制物的抑制作用并促进再生相关蛋白表达最终达到促进 SCI 后神经再生修复的作用。

结合本实验结果推断:在体 SCI 后局部给予 BoNT/A 重链可通过其促进一种或多种生长相关蛋

白的表达等最终发挥其促 SCI 后神经再生修复的作用,进而有助于 SCI 后运动功能改善与恢复。然而,由于本实验仅观察了 BoNT/A 重链对 SCG10 的表达的影响,其对在体 CNS(包括脊髓)损伤后更多参与神经再生修复蛋白的影响尚需进一步的研究。

参考文献

- [1] Ferguson TA, Son YJ. Extrinsic and intrinsic determinants of nerve regeneration[J]. *J Tissue Eng*, 2011, 2(1):1—12.
- [2] Baldwin KT, Giger RJ. Insights into the physiological role of CNS regeneration inhibitors[J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8(23):1—8.
- [3] Geoffroy CG, Zheng B. Myelin-associated inhibitors in axonal growth after CNS injury[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2014, 27:31—38.
- [4] He Z, Jin Y. Intrinsic control of axon regeneration[J]. *Neuron*, 2016, 90(3): 437—451.
- [5] McKerracher L, Rosen KM. MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8(51):1—6.
- [6] Burgen AS, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction[J]. *J Physiol*, 1949, 109 (1—2):10—24.
- [7] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxin block neurotransmitter release by a proteolytic cleavage of synapto-brevin[J]. *Ann N Y Acad Sci*,1992, 359(6398):832—835.
- [8] Su JZ, Cai ZG, Yu GY, et al. Microvascular autologous submandibular gland transplantation in severe cases of keratocon junctivitis sicca[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 33 (3):235—239.
- [9] Navarrete AL, Rafferty KL, Liu ZJ, et al.Botulinum neurotoxin type A in the masseter muscle: effects on incisor eruption in rabbits[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2013,143 (4):499—506.
- [10] Park SY, Park YW, Ji YJ, et al. Effects of a botulinum toxin type A injection on the masseter muscle: An animal model study[J]. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2015, 37(1): 1—5.
- [11] Seok H, Lee SW, Kim MK, et al. Correction of Post-traumatic Lower Lip Asymmetry Using Botulinum Toxin Type A[J]. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 2013, 35(4):256—259.
- [12] Ansved T, Odergren T, Borg K. Muscle fiber atrophy in leg muscles after botulinum toxin type A treatment of cervical dystonia [J]. *Neurology*,1997,48(5):1440—1442.
- [13] Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by Botulinum toxin type A: Implications for Migraine Therapy[J]. *Headache*, 2004, 44(1): 35—42.

(下转第 1155 页)