doi:10.16118/j.1008-0392.2019.05.001

·专家述评·

肉毒毒素的研发及应用进展

靳令经,潘丽珍
(同济大学附属同济医院神经内科,上海 200065)

【摘要】肉毒毒素(botulinum toxin,BT)是肉毒梭状芽孢杆菌在缺氧条件下产生的神经毒素,通过抑制周围神经末梢的递质释放达到化学性去神经支配作用,已广泛应用于多种疾病的治疗及医学美容等领域。近年来,随着对BT结构、作用机制及生物学特性研究的不断深入,多种各具特色的新型BT正在积极研发中,其对中枢神经系统的潜在影响亦受到越来越多的关注。原有上市药物的循证医学证据级别不断提升,新适应证层出不穷。本文就BT的基础研究及临床应用现状进行分析,为进一步开展相关研究奠定基础。

【关键词】肉毒毒素;机制;治疗;应用
【中图分类号】R741 【文献标志码】A 【文章编号】1008-0392(2019)05-0529-06

Progress in research and development of botulinum toxin

JIN Ling-jing, PAN Li-zhen
(Dept. of Neurology, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China)

【**Abstract**】Botulinum toxin(BT) is produced by clostridial bacteria, which can reduce the release of neurotransmitters, inducing chemodenervation at peripheral nerve terminals. Now BT is widely used in disease treatment and medical cosmetics. With the increasing understanding of its structure, molecular mechanism and biological property, a variety of new BT products with different characteristics have been emerging and its potential effects on central nerve system are concerned. The evidence levels of market-available BT products have been upgraded and the new indications have been expanded. In this article, we review the current progress in basic research and clinical application of BT to provide new information for researchers and clinicians.

【**Key words**】botulinum toxin; mechanism; therapy; application

肉毒毒素(botulinum toxin, BT)是由肉毒梭状芽孢杆菌在缺氧条件下产生的一种细菌外毒素,属于神经毒素,是已知最致命的物质之一。20 世纪 80 年代,BT 治疗斜视获得成功。近 40 年来,随着对其作用机制的深入了解以及对其生物学效应的精准把握,BT 的临床应用领域不断拓展。目前,BT 已成功应用于神经系统、消化系统、泌尿系统、美容整形、康复医学等多种领域,并正尝试用于顽固性疼痛、腺体过度分泌、雷诺综合征、抑郁症等病症的治疗。与此同时,不断有新型 BT 药物研发成功,为临床提供了多元化、个体化的选择。

1 肉毒毒素的结构及作用机制

1.1 BT 的结构及分型

BT 主要由肉毒神经毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)及辅助蛋白(complexing proteins, CP)组成。

收稿日期:2019-07-08
基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1314700);上海市市级医疗卫生优秀学科带头人培养计划(2017BR029)
作者简介:靳令经(1975—),男,教授、主任医师,博士,博士生导师,中华医学会神经病学分会帕金森及运动障碍病学组委员,中国神经科学学会神经毒素分会秘书长.E-mail:lingjingjin@163.com

BoNT 相对分子质量为 150 000,由相对分子质量为 50 000 的轻链(light chain, LC)及相对分子质量为 100 000 的重链(heavy chain, HC)通过二硫键连接,成为有活性的双链。所有血清型 BoNT 都具有 3 个相对分子质量基本相同但功能不同的区域:HC 的氨基端(相对分子质量为 50 000,H_N)为易位区,HC 的羧基端(相对分子质量为 50 000,H_C)为受体结合区,LC 为催化区域。CP 主要由非毒素非血凝素(non-toxic non-hemagglutinin, NTNHA)及血凝素(hemagglutinin, HA)两部分构成[1-2]。BoNT 是 BT 的活性成分。在 BT 自然口服条件下,CP 可保护 BoNT 通过胃肠道的酸性环境并与肠道黏膜结合,进入生物体内。在临床注射途径下,在 BT 到达靶组织神经末梢突触前膜前,BoNT 已经从复合物中解离,CP 不仅无法发挥自然条件下的保护作用,反而存在刺激机体免疫系统产生抗体的风险[3]。

根据抗原性不同,BT 分为不同血清型。目前已确认并广泛接受的自然产生的 BT 共有 7 种,按照字母顺序命名为 BT/A~BT/G。2014 年,曾有研究报道第 8 种血清型 H(BT/H)[4],但近期研究表明其与 BT/A 及 BT/F 有类似的结构并与 BT/A 具有相似的抗原性,故将其命名为 BT/FA 或 BT/HA[5]。2017 年,Zhang 等[6]采用 GenBank 数据中肉毒杆菌菌株 111 的基因序列,通过基因组测序及生物信息学技术,得到一种新型 BT 蛋白序列,并与目前已知的 BT 无相同抗原性,暂时将其命名为 BT/X,目前尚不清楚该菌株在自然条件下是否产生 BT/X。每种血清型根据氨基酸序列的不同又分为不同的亚型。迄今为止,已经发现 40 余种不同的 BT 亚型。目前以 BT/A 应用范围最广。

1.2　BT 的作用机制

BoNT 通过 HC 受体结合区域与神经末梢特异性受体结合,形成内吞小体进入神经末梢胞质。内吞小体在 ATP 酶的作用下,易位区插入脂质双分子层形成细小通道,催化区即 LC 通过此通道进入神经末梢细胞质内。LC 是一种锌钛链内切酶,可以水解可溶性 N-乙基马来酰胺-敏感因子附着蛋白受体(soluble N-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)复合体,影响突触囊泡与突触前膜融合及神经递质的释放。

SNARE 蛋白复合体是囊泡膜与神经末梢细胞膜结合的必要成分,包含 3 种蛋白:突触相关膜蛋白(VAMP)、突触融合蛋白(syntaxin)和突触小体相关蛋白 25(SNAP-25)。不同血清型的毒素,其水解的目标蛋白及位点亦不相同:A、E 型作用于 SNAP-25,B、D、G、F 型水解 VAMP,C 型可水解 Syntaxin 和 SNAP-25。其中 BoNT/A 于 SNAP-25 C 端移除 9 个氨基酸残基,形成 $SNAP\text{-}25_{1\text{-}197}$,而 BoNT/E 移除 26 个氨基酸残基形成 $SNAP\text{-}25_{1\text{-}180}$。这些蛋白一旦被 BoNT 水解,含有乙酰胆碱等神经递质囊泡的释放将受到抑制,导致神经-肌肉信号传递障碍,达到化学性去神经支配的作用,引起骨骼肌迟缓性瘫痪及自主神经功能障碍。

尽管 BT 作用于神经末梢抑制神经递质的释放,但并未破坏神经细胞的结构及生理功能,随着神经末梢功能的逐渐恢复,其导致的神经瘫痪作用完全可逆。由于不同血清型 BT 在神经末梢所结合的特异性受体不同,水解的目标蛋白及位点不同,LC 在细胞内被清除的时间不同,不同血清型的 BT 作用时间亦不尽相同。作用时间长短顺序为 BT/A、BT/C、BT/B、BT/D、BT/F、BT/G、BT/E。在人类骨骼肌中,作用时间最长的 BT/A 为 3~6 个月;最短的为 BT/E,作用时间<4 周[7]。

1.3　BT 的中枢作用及逆向转运

目前已经证实并被广泛接受的是:BT 药物有效的治疗效果基于其对注射部位神经末梢递质释放的特异性高效抑制。但越来越多的研究表明 BT 对周围神经的作用难以解释所有的临床现象,提示中枢神经系统参与其中的可能。通过功能磁共振研究发现,卒中后偏侧肢体痉挛的患者,BT 注射后其同侧及对侧大脑运动皮层活动减少,而且在运动皮层以外其他脑区如顶叶、枕叶皮层或小脑的区域激活模式亦有变化[8-9];颈部肌张力障碍患者 BT 局部注射后,头颅磁共振可显示大脑皮层灰质信号及体积的改变,提示外周注射 BT 对大脑皮层结构及功能产生影响[10]。单侧眼轮匝肌、甲杓肌注射可引起对侧相应肌肉电生理信号的变化[11-12];另外比目鱼肌注射可导致同侧远隔非注射肌肉股四头肌电生理信号改变[13],提示局部肌内注射 BT 后可影响脊髓、脑干神经元功能。在含 BT 的孵育液细胞中可观测到 BT 的逆轴突运输;在动物实验中,局部注射 BT 后,可在脑干组织中发现被水解的 SNAP-25[14-15],

提示 BT 或被水解的 SNAP-25 逆轴突转运的可能。但也有部分研究结果与此并不一致[16]，并且目前尚无直接证据表明，中枢神经系统结构及功能的改变与逆向轴突运输相关，或者与其注射后神经环路信号改变相关。BT 对中枢的作用机制尚需进一步研究。

1.4　BT 的免疫原性

BT 中的 BoNT 及 CP 成分注射入人体后，作为异源性蛋白可刺激机体产生抗体。直接作用于 BoNT 成分并导致 BT 作用效能下降的抗体，被称为中和性抗体，可导致继发性治疗无应答；针对 CP 及其他非 BoNT 成分产生的抗体，被称为非中和性抗体，不影响 BoNT 的治疗效果，但可增加中和性抗体产生的风险[17]。

尽管目前临床中 BT 应用非常广泛，但其产生抗体并导致继发性无应答的概率很低。BT/B 型药物由于注射剂量高于 BT/A 型，其产生抗体的可能性高于后者。目前报道 BT/A 产生抗体的概率为 0%～3%，BT/B 产生抗体的概率为 10%～44%[18-19]。对 BT/A 产生继发性无应答的患者可给予 BT/B 型药物治疗。

2　基于作用机制的新型药物的研发

2.1　BT 临床药物现状

1989 年，美国食品药品监督管理局（FDA）首次批准 BT 药物——onabotulinumtoxinA（Botox®，爱尔兰 Allergan 公司）上市，以后陆续有新的药物进入临床应用。目前有 BT/A 及 BT/B 被 FDA 批准作为药物应用于临床，其中 BT/A 除 onabotulinumtoxinA 外，还包括：abobotulinumtoxinA（Dysport®，法国 Ipsen 公司）及 incobotulinumtoxinA（Xeomin®，德国 Merz 公司），BT/B 型药物有 rimabotulinumtoxinB（Myobloc®，美国 Solstice Neurosciences 公司）。另外，我国自主研发生产的衡力®（lanbotulinumtoxinA，Lantox®，中国兰州生物制品研究所）在亚洲、拉丁美洲及东欧等地区的多个国家注册应用。我国目前仅有 Botox®及 Lantox®被批准用于临床。在临床使用的药物中，其组成除了 BoNT 及 CP 以外，还有与药物稳定性有关的赋形剂。不同产品赋形剂不同，如 Botox®为人血白蛋白，Lanlox®为明胶。在随着对 BT 结构及作用机制研究的进一步深入，不同血清型、亚型及不同药物辅助成分的 BT 逐渐被研发，为临床提供更丰富的选择。

2.2　不同药物成分改变药物作用特征

IncobotulinumtoxinA 仅含有 BoNT 活性成分而不含有 CP，自 2005 年上市以来已在欧美国家得以广泛应用。其与 onabotulinumtoxinA 具有同等的临床疗效。而且由于无 CP 成分而降低了免疫原性，可减少继发性无应答的产生[20]。我国兰州生物制品研究所已研发出不含 CP 成分的 BoNT/A——chinbotulinumtoxin。

另外一种正在研发的针对 BT/A 的药物 daxibotulinumtoxinA（RT002），亦是纯化的 BoNT，在冻干粉药物中含有专用的稳定辅料肽（RTP004），不含 CP 及白蛋白或其他人或动物的血液成分，具有更高的稳定性及更低的免疫原性。Ⅱ期临床研究亦显示，daxibotulinumtoxinA 在颈部肌张力障碍及眉间纹治疗中具有良好的耐受性及较长的作用时间[21-22]。

2.3　多种血清型药物的研发

BT/E 与 BT/A 一样作用于 SNAP-25，但 BT/E 与 BT/A 结合神经末梢的特异性受体不同，作用于 SNAP-25 的位点不同，其起效时间更快，作用时间更短。目前，新型 BT/E 型药物及重组 BT/E 药物正在研发，并且已分别进入Ⅰ、Ⅱ期临床试验阶段。其将应用于仅需要短期治疗效果的疾病，如骨折骨关节脱位后及术后瘢痕预防中期望短期抑制肌肉收缩时。

3　基于作用机制的临床应用拓展

3.1　BT 药物的临床应用现状

目前，BT 已广泛应用于临床疾病治疗及医学美容领域，适应证超过 30 个。2008 年，美国神经病学会（American Academic of Neurology，AAN）发布了关于运动障碍、自主神经功能障碍、疼痛以及痉挛状态的 BT 治疗指南，通过对各项基于循证医学报道的证据进行分级及综合分析，形成各适应证的治疗推荐建议。2016 年，AAN 更新了 BT/A 在面肌痉挛、颈部肌张力障碍、成人痉挛状态及头痛的治疗指南及推荐级别，并首次对不同品牌的 BT/A 分别进行推荐，指导临床医生在准确评估的情况下进行超适应证治疗[23]。

在神经病学领域，BT 用于治疗：（1）肌张力障

碍,尤其是局灶性肌张力障碍如眼睑痉挛、颈部肌张力障碍的一线治疗。(2) 非肌张力障碍性运动障碍,如偏侧面积痉挛、震颤、抽动症及磨牙症等。(3) 痉挛状态,如脑卒中、脊髓损伤及多发性硬化等疾病导致的痉挛状态,亦包括小儿脑瘫。在眼科用于斜视的治疗;在自主神经功能障碍领域,用于治疗多汗、流涎等;在泌尿学领域,BT局部注射用于神经源性逼尿肌过度活动症、膀胱过度活动症及逼尿肌-括约肌功能失调等;在疼痛治疗方面,慢性偏头痛已成为FDA批准的BT治疗适应证;在医学美容领域,用于减轻鱼尾纹、眉间纹及动力性额前纹等,也用于改善下面部皱纹及颈纹。

2018年,我国肉毒毒素治疗应用专家组及中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组以国际BT/A临床应用的循证医学证据为基础,参考AAN的适应证推荐分级,结合中国专家长期应用肉毒毒素的治疗经验,共同制定了《中国肉毒毒素治疗应用专家共识》[24]。在此版本中,BT的适应证及推荐级别如表1。

表1　肉毒毒素的临床适应证及推荐级别

Tab.1　Clinical indications and recommended levels of BT

适应证	推荐级别
眼睑痉挛	B
偏侧面肌痉挛	B
颈部肌张力障碍	A
喉肌肌张力障碍	B
上肢局灶性肌张力障碍	B
原发性手部震颤	B
头部震颤	C
运动性抽动	C
口下颌肌张力障碍	C
上运动神经元损害所致上肢痉挛状态	A
脑性瘫痪后上肢痉挛状态	A
上运动神经元损害所致下肢痉挛状态	A
流涎症	B
腋窝多汗症	A
手掌多汗症	B
味汗症	C
神经源性膀胱过度活动症	A
特发性膀胱过度活动症	A
逼尿肌-括约肌协同失调	B
慢性偏头痛	A

3.2　不断拓展的临床应用领域

在自主神经功能疾病治疗领域,除多汗、流涎等病症以外,有小样本研究显示BT局部注射对雷诺综合征治疗安全有效[25]。其机制可能与其抑制去甲肾上腺素的释放,调节血管平滑肌功能有关[26]。目前,同济大学附属同济医院正在进行一项单中心的随机双盲安慰剂对照研究(ChiCTR-1800015359),以期获得更多循证医学证据。

慢性疼痛是临床工作中常见的一种综合征,严重影响患者的生活质量。BT治疗缓解疼痛的最初证据来源于在治疗肌肉过度紧张相关的疾病如肌张力障碍或痉挛状态时,其伴发的疼痛缓解。虽然肌肉松弛可能在一些情况下发挥作用,但越来越多的证据表明,它们不能解释BT治疗后缓解疼痛的所有机制。例如,在肌内注射BT的情况下,缓解疼痛的作用也可以先于肌肉松弛作用或持续更长时间。目前普遍认为,除了局部去神经支配以外,其轴突逆向运输或中枢作用也可能参与其中,但具体作用机制尚需进一步研究。

对慢性偏头痛,除了可预防偏头痛发作,减轻发作程度,长期治疗亦可明显改善患者的生活质量并且耐受性良好[27]。但对临床常见的紧张性头痛,基于目前开放性研究及随机双盲对照研究结果,并不推荐BT局部注射[23]。BT被尝试用于神经病理性疼痛如疱疹后神经痛、三叉神经痛、幻肢痛及糖尿病周围神经病等的治疗,小样本研究治疗有效[28],尤其对高龄难治性三叉神经痛患者是良好的选择[29]。另外,对于慢性骨筋膜疼痛患者,BT治疗能够缓解疼痛症状,改善生活质量。

骨关节炎及相关性关节疼痛同样影响患者的生活质量,临床治疗目标是缓解疼痛及减少关节功能损伤。目前有限的临床研究采用安慰剂对照显示,膝关节内注射BT后评估疼痛缓解情况及关节功能改变的结果并不一致[30-31]。其治疗效果及作用机制有待于更多的循证医学研究。

在创伤修复过程中,局部组织代谢活动增加并伴发局部炎症反应,可导致创口边缘肌肉收缩,影响创面愈合并形成瘢痕。鉴于BT化学性去神经支配作用,通过在伤口附近局部注射BT,有助于伤口的整体愈合过程和改善愈合伤口的外观[32-33]。新型BT/E药物的研发,将更有利于该领域的应用。

此外，在其他领域，如贲门失弛缓症、糖尿病性胃瘫、前列腺增生、间质性膀胱炎等，BT 均可改善患者症状；对抑郁症患者进行皱眉肌区域注射亦能取得良好治疗效果。这些仅限于小样本的临床实验或病例报道，为将来 BT 的应用提供更多的思路或可能。

4 展　望

BT 是一种特异、高效的治疗性蛋白质，通过抑制神经肌肉及腺体的过度活跃而达到缓解症状的目的。随着生物学、基因组学、蛋白质组学等技术的进展，越来越多的 BT 被逐渐发现及利用，人们对其结构及作用机制的研究及认识将更加深入，从而为新型药物的研发提供基础。此外，在未来几年中，修饰和重组毒素将进一步扩展 BT 的应用前景。临床研究的快速发展及评估治疗手段的更加精准化，将有助于提高 BT 疗效，减少副反应发生，进一步拓展其临床应用范围，为更多的患者提供有效的、个体化的治疗。

【参考文献】

[1] LAM K H, JIN R S. Architecture of the botulinum neurotoxin complex: a molecular machine for protection and delivery[J]. Curr Opin Struct Biol, 2015,31: 89－95.

[2] GU S Y, RUMPEL S, ZHOU J, et al. Botulinum neurotoxin is shielded by NTNHA in an interlocked complex[J]. Science, 2012,335(6071): 977－981.

[3] FREVERT J, DRESSLER D. Complexing proteins in botulinum toxin type A drugs: a help or a hindrance? [J]. Biologics, 2010,4: 325－332.

[4] DOVER N, BARASH J R, HILL K K, et al. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene[J]. J Infect Dis, 2014,209(2): 192－202.

[5] MASLANKAS E, LÚQUEZ C, DYKES J K, et al. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid-like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin[J]. J Infect Dis, 2016,213(3): 379－385.

[6] ZHANG S C, MASUYER G, ZHANG J, et al. Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin[J]. Nat Commun, 2017,8: 14130.

[7] ELEOPRA R, TUGNOLI V, QUATRALE R, et al. Different types of botulinum toxin in humans[J]. Mov Disord, 2004,19(Suppl 8): S53－S59.

[8] BERGFELDT U, JONSSON T, BERGFELDT L, et al. Cortical activation changes and improved motor function in stroke patients after focal spasticity therapy: an interventional study applying repeated fMRI[J]. BMC Neurol, 2015,15: 52.

[9] VEVERKA T, HLUŠTÍK P, HOK P, et al. Sensorimotor modulation by botulinum toxin A in post-stroke arm spasticity: passive hand movement[J]. J Neurol Sci, 2016,362: 14－20.

[10] DELNOOZ C C, PASMAN J W, VAN DE WARRENBURG B P. Dynamic cortical gray matter volume changes after botulinum toxin in cervical dystonia[J]. Neurobiol Dis, 2015,73: 327－333.

[11] QUARTARONE A, SANT'ANGELO A, BATTAGLIA F, et al. Enhanced long-term potentiation-like plasticity of the trigeminal blink reflex circuit in blepharospasm[J]. J Neurosci, 2006,26(2): 716－721.

[12] BIELAMOWICZ S, LUDLOW C L. Effects of botulinum toxin on pathophysiology in spasmodic dysphonia[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2000,109(2): 194－203.

[13] MARCHAND-PAUVERT V, AYMARD C, GIBOIN L S, et al. Beyond muscular effects: depression of spinal recurrent inhibition after botulinum neurotoxin A[J]. J Physiol(Lond), 2013,591(4): 1017－1029.

[14] BOMBA-WARCZAK E, VEVEA J D, BRITTAIN J M, et al. Interneuronal transfer and distal action of tetanus toxin and botulinum neurotoxins A and D in central neurons[J]. Cell Rep, 2016,16(7): 1974－1987.

[15] WU C J, XIE N C, LIAN Y J, et al. Central antinociceptive activity of peripherally applied botulinum toxin type A in lab rat model of trigeminal neuralgia[J]. Springerplus, 2016,5: 431.

[16] CAI B B, FRANCIS J, BRIN M F, et al. Botulinum neurotoxin type A-cleaved SNAP25 is confined to primary motor neurons and localized on the plasma membrane following intramuscular toxin injection[J]. Neuroscience, 2017,352: 155－169.

[17] DRESSLER D, BIGALKE H. Immunological aspects of botulinum toxin therapy[J]. Expert Rev Neurother, 2017,17(5): 487－494.

[18] DRESSLER D, BIGALKE H. Botulinum toxin type B de novo therapy of cervical dystonia: frequency of antibody induced therapy failure[J]. J Neurol, 2005,252(8): 904-907.

[19] NAUMANN M, BOO L M, ACKERMAN A H, et al. Immunogenicity of botulinum toxins[J]. J Neural Transm(Vienna), 2013,120(2): 275-290.

[20] DRESSLER D. Five-year experience with incobotulinumtoxinA(Xeomin®): the first botulinum toxin drug free of complexing proteins[J]. Eur J Neurol, 2012,19(3): 385-389.

[21] CARRUTHERS J, SOLISH N, HUMPHREY S, et al. Injectable DaxibotulinumtoxinA for the treatment of glabellar lines: a phase 2, randomized, dose-ranging, double-blind, multicenter comparison with OnabotulinumtoxinA and placebo[J]. Dermatol Surg, 2017,43(11): 1321-1331.

[22] JANKOVIC J, TRUONG D, PATEL A T, et al. Injectable DaxibotulinumtoxinA in cervical dystonia: a phase 2 dose-escalation multicenter study[J]. Mov Disord Clin Pract, 2018,5(3): 273-282.

[23] SIMPSON D M, HALLETT M, ASHMAN E J, et al. Practice guideline update summary: botulinum neurotoxin for the treatment of blepharospasm, cervical dystonia, adult spasticity, and headache: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology[J]. Neurology, 2016,86(19): 1818-1826.

[24] 肉毒毒素治疗应用专家组,中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组.中国肉毒毒素治疗应用专家共识[J].中华神经科杂志,2018,51(10): 779-786.

[25] ZHANG X L, HU Y, NIE Z Y, et al. Treatment of Raynaud's phenomenon with botulinum toxin type A[J]. Neurol Sci, 2015,36(7): 1225-1231.

[26] ZHOU Y W, LIU Y, HAO Y H, et al. The mechanism of botulinum A on Raynaud syndrome[J]. Drug Des Devel Ther, 2018,12: 1905-1915.

[27] AHMED F, GAUL C, GARCÍA-MONCÓ J C, et al. An open-label prospective study of the real-life use of onabotulinumtoxinA for the treatment of chronic migraine: the REPOSE study[J]. J Headache Pain, 2019,20(1): 26.

[28] PARK J, PARK H J. Botulinum toxin for the treatment of neuropathic pain[J]. Toxins(Basel), 2017,9(9): E260.

[29] WU S Y, LIAN Y J, ZHANG H F, et al. Botulinum toxin type A for refractory trigeminal neuralgia in older patients: a better therapeutic effect[J]. J Pain Res, 2019,12: 2177-2186.

[30] NAJAFI S, SANATI E, KHADEMI M, et al. Intra-articular botulinum toxin type A for treatment of knee osteoarthritis: clinical trial[J]. Toxicon, 2019,165: 69-77.

[31] MENDES J G, NATOUR J, NUNES-TAMASHIRO J C, et al. Comparison between intra-articular botulinum toxin type A, corticosteroid, and saline in knee osteoarthritis: a randomized controlled trial[J]. Clin Rehabil, 2019,33(6): 1015-1026.

[32] HU L, ZOU Y, CHANG S J, et al. Effects of botulinum toxin on improving facial surgical scars: a prospective, split-scar, double-blind, randomized controlled trial[J]. Plast Reconstr Surg, 2018,141(3): 646-650.

[33] PHILLIPS T J, FUNG E, RIGBY M H, et al. The use of botulinum toxin type A in the healing of thyroidectomy wounds: a randomized, prospective, placebo-controlled study[J]. Plast Reconstr Surg, 2019,143(2): 375e-381e.