酿酒酵母中表达神经肉毒素 A 及其功能研究

NDIKUBWIMANA Jean de Dieu， 邵侃凯， 高晓冬， 中西秀树*
（江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：肉毒神经毒素(BoNT)是肉毒梭菌产生的神经毒素，是最强大的毒素之一。为了研究肉毒神经毒素 A 在酵母中的活性及功能，在酿酒酵母细胞中表达 BoNT/A LC，观察其对酵母生长影响以及通过蛋白免疫印迹方法研究其在酵母中蛋白表达水平。结果表明：BoNT/A 抑制野生型酵母的生长；在酿酒酵母细胞中 BoNT/A 具有水解酶活性，当其活性位点突变后，BoNT/A 突变体的表达不会抑制酿酒酵母的生长；过量表达酵母的 SNAP25 同源基因 *SEC*9 可以回补 BoNT/A 轻链过表达的酵母的生长。在 BoNT/A 轻链表达的酵母细胞中，其催化活性可以通过酵母的生长来检测。因此，这类特殊的酵母细胞可以用来分析 BoNT/A。

关键词：肉毒神经毒素 A(BoNT/A)；酿酒酵母；*SEC*9
中图分类号：Q 786　**文章编号**：1673-1689(2019)02-0087-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.013

Expression of Botulinum Neurotoxins A in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Functional Research

NDIKUBWIMANA Jean de Dieu， *SHAO Kankai*， *GAO Xiaodong*， *NAKANISHI Hideki**
（School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Botulinum toxin （BoNT） is a neurotoxin produced by *Clostridium botulinum*，which is one of the most powerful toxin. To study the activity and function of BoNT/A in yeast，BoNT/A LC in yeast is expressed，observing the yeast growth and BoNT/A protein expressing level by western blot. Expression of LC of BoNT cerotype A caused a growth defect in yeast cells，and the toxicity is due to the hydrolytic activity. It is because catalytically inactive BoNT/A LC does not cause a growth defect in yeast cells. Overexpression of a yeast SNAP-25 homologue gene，*SEC*9，could rescue the growth defect in BoNT/A LC expressing cells. The results demonstrate that，in BoNT/A LC expressing yeast cells，the hydrolytic activity can be monitored through their growth. Thus，such cells can be used to analyze BoNT/A.

Keywords：botulinum neurotoxins A(BoNT/A)，*Saccharomyces cerevisiae*，*SEC*9

收稿日期：2016-03-28
基金项目：国家“111 计划”项目（111-2-06）；教育部科学研究项目（313027）；高等学校博士学科点专项科研基金项目（20120093110001）；江南大学自主科研项目(JUSRP311A02)。
* **通信作者**：中西秀树(1973—)，男，日本人，博士，教授，博士研究生导师，主要从事分子生物学、酵母遗传学、细胞生物学和糖生物学方面的研究。E-mail：hidekinakanishi@hotmail.com
引用本文：NDIKUBWIMANA Jean de Dieu，邵侃凯，高晓冬，等. 酿酒酵母中表达神经肉毒素 A 及其功能研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(02)：87-92.

基因组测序表明,在真核生物中,囊泡融合机制是高度保守的,SNARE 蛋白是膜融合蛋白中的重要成员。SNARE 蛋白是保守性很强的蛋白家族,经常被分为 Q-SNARE 蛋白和 R-SNARE 蛋白[1]。SNARE 蛋白位于特定的膜上,只有当 Q-SNARE 蛋白 R-SNARE 蛋白结合时,泡膜才能融合[1-2]。SNARE 蛋白最初是从神经元细胞中分离得到,在突触囊泡融合中,syntaxin-1 和 SNAP-25 扮演 Q-SNARE 角色,synaptobrevin 则扮演着 R-SNARE 角色[1-2]。当囊泡膜上的 synaptobrevin 与 syntaxin-1 和 SNAP-25 结合在一起时,突触囊泡中的神经递质就会释放出来,传递给突触末段。和突触囊泡融合 SNARE 蛋白同源物类似,在酿酒酵母细胞中,Q-SNARE 蛋白 Sso1/2 和 Sec9 与 R-SNARE 蛋白 Snc1/2 结合在一起,形成一个平行的四螺旋复合体从而导致酵母细胞膜融合的进行[2-3]。

肉毒神经毒素(BotuIinum Neurotoxin,BoNT)是由厌氧梭状肉毒芽胞杆菌属生长过程中分泌的多分子复合物外毒素[4],肉毒神经毒素根据 α-血清中和能力分为 A-G7 种亚型[5],绝大部分脊椎动物只要摄入微量即可引起肉毒中毒[6]。肉毒神经毒素是目前已知毒性最强的神经毒素,被美国疾病控制预防中心(CDC)列为 A 级生物恐怖剂[7]。肉毒神经毒素是 AB 结构的神经毒素,由轻链(LC,~50 kDa)和重链(HC,~100 kDa)通过二硫键结合在一起组成[8]。轻链由一个锌离子依赖的金属蛋白酶区域组成,它可以降解 SNARE 蛋白;肉毒神经毒素类型 A,C,E 可以降解 SNAP25,类型 B,D,F,G 降解 VAMP-2,另外类型 C 还可以降解 Syntaxin 1a[9-13]。重链由两个区域组成:一个 N 端转运结构域(HCT,~50 kDa)和一个 C 端受体结合区域(HCR,~50 kDa)[14]。HCR 进一步分为 HCRN 和 HCRC 两个更小的区域。HCRN 没有功能活性,但可能参与调整 HCT 最优的帮助轻链进入宿主细胞,而 HCRC 介导肉毒神经毒素结合到宿主受体[15-16]。Lacy 和 Stevens 解决了肉毒神经毒素 A 的晶体结构[17]。

BoNT 不仅仅是一种神经毒素,它还可以作为一种治疗药物。早在 1954 年,Brooks 发现在极度活跃的肌肉注射少量的 BoNT/A 会破坏运动神经末梢乙酰胆碱的释放,从而引起短暂的肌肉松弛[18]。这一发现导致了第 1 次使用 BoNT/A 作为治疗药物替代传统手术治疗人类斜视[19]。这些开创性的研究后,治疗用 BoNT/A 扩展到各种各样由于功能失调的胆碱能终端引起的神经障碍,例如痉挛性斜颈、眼睑痉挛、面部瘫痪、肌张力障碍和痉挛状态[20-21]。BoNT/A 还用于美容治疗和头痛治疗[22]。

虽然目前有不少关于 BoNT/A 的研究,但关于 BoNT/A 抗性药物及其作为药物用于医用治疗并不是十分成熟,而且没有关于酵母肉毒中毒的研究。本研究在酿酒酵母细胞中表达了 BoNT/A 轻链,在酿酒酵母中来研究 BoNT/A 轻链的功能及其能否降解 Sec9 蛋白。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母出发菌株 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499,BoNT/A 表达用质粒 pRS426-GAL1$_{pr}$,*SEC*9 表达用质粒 pRS414-TEF$_{pr}$ 及引物相关信息见表 1。*SEC*9 基因由 HXS 33 和 HXS 34 引物 PCR 获得,△*Nsec*9 基因由 HXO 573 和 HXS 34 引物 PCR 获得,*BoNT/A* 基因由 HXO 72 和 HXO 73 引物 PCR 获得,BoNT/AE224Q 由 HXS 76 和 HXS 77 引物 PCR 获得。

1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNA T4 连接酶及 Ligation Mix 连接酶购于 TaKaRa 公司(大连);KOD-Plus Neo DNA 聚合酶购于东洋纺公司(上海);PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒及脱脂奶粉购于上海生工;ClarityTM Western ECL Substrate 显色剂、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于碧云天生物技术研究所;Mouse anti-HA 一抗、Goat anti-mouse IGg-HRP 二抗购于北京全式金生物技术有限公司,v5 抗体购于近岸蛋白质科技有限公司(上海),PVDF 膜购于美国伯乐公司。无水甲醇、无水乙醇及异丙醇等其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 主要仪器

压力蒸汽灭菌器(立式)购于上海申安器械厂;电泳仪购于北京六一仪器厂;pH 计、电子天平购于梅特勒-托利多仪器公司(上海);无菌操作台、恒温培养箱购于上海三发科学仪器公司;恒温摇瓶柜购于江苏太仓强乐设备厂;PCR 仪、移液枪购于德国 Eppendorf 公司;凝胶成像系统购于美国 Bio-Rad 公司;半干电转仪、SDS-PAGE 凝胶电泳仪购于美

表 1　本研究所用的菌株、质粒和引物

Table 1　Lists of strains, plasmids and primers used in this study

菌株/质粒/引物		说明/基因型/序列(5/–3/)	来源
菌株	*YPH499*	*MATa, ade2 - 101, his3–△200, leu2 - △1 , trp1–△63, ura3△52*	实验室保藏
	sec9△	*MATa, ade2 - 101, his3–△200, leu2 - △1 , trp1–△63, ura3△52/sec9△::Kan*	本研究
质粒	pRS414–TEF_{pr}	*TRP1* 标记单拷贝含有 *TEF* 启动子	本研究
	pRS426–GAL_{pr}	*URA3* 标记多拷贝含有 *GAL1* 启动子	本研究
	pRS414–TEF–*SEC9*	*TRP1* 标记单拷贝含有 *TEF* 启动子含有 *SEC9* 基因	本研究
	pRS414–TEF–△*Nsec9*	*TRP1* 标记单拷贝含有 *TEF* 启动子含有 N 端截断的 *SEC9* 基因	本研究
	pRS426–GA*Lpr*–BoNT/A–v5	*URA3* 标记多拷贝含有 *GAL1* 启动子含有 BoNT/A 基因	本研究
	pRS426–GA*Lpr*–BoNT/A^{E224Q}–v5	*URA3* 标记多拷贝含有 *GAL1* 启动子含有 *BoNT/A*^{E224Q} 基因	本研究
引物	HXS 33	TGACGGATCCAGAATGGGATTAAAGAAATT	本研究
	HXS 34	CAGGCTCGAGCTATCTGATACCTGCCAACC	本研究
	HXO 573	TCGCGGATCCATGGCAGAAGATGAAGCAGTAGATG	本研究
	HXO 72	GTGTACTAGTATGCCATTTGTTAATAAACA	本研究
	HXO 73	GTGTCTCGAGTTAAGTAGAATCCAAACCCAACA	本研究
	HXS 76	CAGCTGTTACTTTGGCTCATcAATTGATTCATGCTGGTCATAG	本研究
	HXS 77	CTATGACCAGCATGAATCAATTgATGAGCCAAAGTAACAGCTG	本研究

国伯乐公司；紫外分光光度计、ImageQuantTMLAS 400 mini 购置于美国 GE 公司；荧光倒置显微镜购自日本尼康公司。

1.4　培养基及其他溶液配制

1)YPAD 培养基：酵母抽提物(Yeast Extract) 20 g/L，蛋白胨(Peptone)10 g/L，腺嘌呤(Adeline) 30 mg/L，琼脂粉(Agar)20 g/L(固体培养基)，葡萄糖 20 g/L。2)LB 培养基：胰蛋白胨(Tryptone)10 g/L，酵母抽提物 5 g/L，氯化钠(NaCl)10 g/L，琼脂粉(Agar) 20 g/L (固体培养基)；3)YNB 选择培养基：YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acids)6.7 g/L，缺陷型粉末 2 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂粉 20 g/L(固体培养基)。SG 培养基是用半乳糖代替葡萄糖。4)8 mol/L 尿素：480.48 g 尿素，8.766 g NaCl，25 mmol/L(pH 8.0)，加去离子水定容至 1 L。5)TBST 溶液：5 mol/L NaCl 30 ml，1 mol/L Tris·HCl(pH 8.0) 10 mL，Tween20 500 uL，加去离子水定容至 1 L。6)5% 脱脂牛奶：称取 5 g 脱脂奶粉，用 TBST 定容至 100 mL。7)转膜缓冲溶液：称取甘氨酸 14.4 g，Tris·HCl 3.03 g，量取无水甲醇 200 mL，加去离子水定容至 1 L。

1.5　实验方法

1.5.1　细胞生长分析　将质粒 pRS426–*GALpr*，pRS426–*GALpr*–BoNT/A 转化至 *YPH499* 细胞中，在 SD 尿嘧啶缺陷平板上筛选阳性克隆。将阳性转化子在以葡萄糖为碳源的尿嘧啶缺陷培养平板划线培养 48 h，分别用牙签挑取不同的转化子在以葡萄糖和半乳糖为碳源的尿嘧啶缺陷平板上划线，在 30 ℃培养 3 d，观察细胞的生长情况。

1.5.2　蛋白质提取　将不同细胞接种在 5 mL 以葡萄糖为碳源的 SD 尿嘧啶培养基中于 30 ℃培养至 OD_{660}=1.0，收集细胞转移至 25 mL 以葡萄糖为碳源的 SD 尿嘧啶培养基上于 30 ℃培养至 OD_{660}=1.0，收集细胞转移至 30 mL 以半乳糖为碳源的 SD 尿嘧啶培养基中，起始 OD_{660}=0.2，30 ℃培养至 OD_{660}=0.8~1.0。不同转化子收集相同数量的细胞，用去离子水洗细胞 1 次，加 8 mol/L 尿素缓冲溶液和蛋白酶抑制剂 PMSF，加玻璃珠震荡破碎细胞，15 000 g，离心 10 min 取上清即为所提取蛋白。用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。

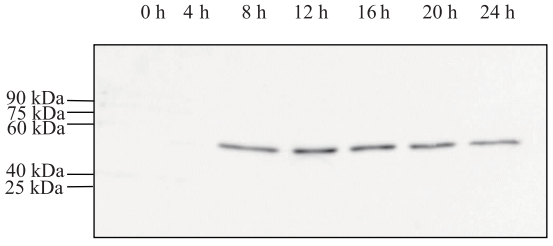
1.5.3　蛋白质免疫印迹

1)电泳：取 100 μg 蛋白样品上样跑电泳，浓缩胶电压 80 V，30 min，分离胶电压 120 V，60 min。2)转膜：采用半干式转膜方式，电压 25 V，电流 1.0 A，时间 30 min。3)封闭：5% 的脱脂奶粉封闭 1 h。4)孵育抗体：一抗 1∶5 000，室温 1 h；二抗 1∶5 000 室温 1 h。5)显色：ECL 显色液 A 和 B 混匀，涂于膜上，用 ImageQuant LAS4000mini 显色。

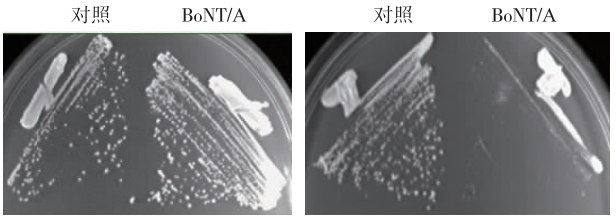
2 结果与讨论

2.1 BoNT/A 抑制酿酒酵母 *YPH499* 生长

在人体内,BoNT/A 作用于神经元细胞内腔,特异性降解突触体相关蛋白 SNAP25 抑制神经递质释放从而导致相关疾病，而酵母细胞中存在 SNAP25 的同源蛋白 Sec9。尽管酵母是真核生物,是研究真核生物的模式生物,但是酵母细胞和哺乳动物细胞存在很大的差异，不知能否在酵母中检测到 BoNT/A 的表达?在酿酒酵母 *YPH499* 细胞中表达 BoNT/A 是否会抑制酵母细胞的生长？如图 1 所示,在酿酒酵母 *YPH499* 细胞中半乳糖诱导培养 8 h 之后可以检测到表达的 BoNT/A,表达 BoNT/A 会抑制酵母细胞的生长，这种抑制作用可能是因为 BoNT/A 过表达在酵母细胞中累积对细胞有毒害作用;也可能是因为过表达 BoNT/A 降解酵母细胞中膜融合所需要的 SNARE 蛋白或其他生长必需蛋白。



(a)Anti-V5的蛋白质免疫印迹结果



(b)SD尿嘧啶平板的30 ℃培养结果　(c)SG尿嘧啶平板的30 ℃培养结果

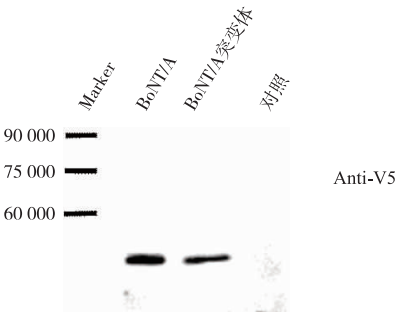
注：对照为空载 pRS426GALpr,BoNT/A 为 pRS426GALpr-BoNT/A-V5

图 1　BoNT/A 抑制酿酒酵母 *YPH499* 生长

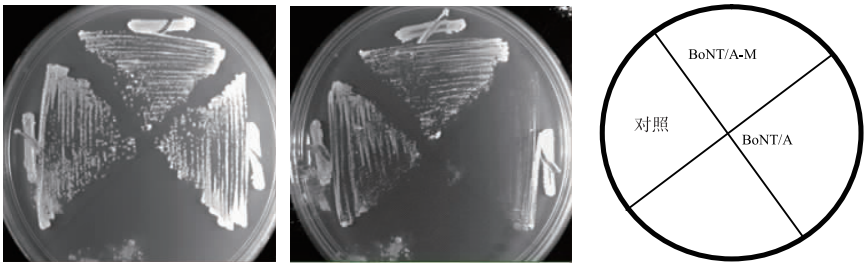
Fig. 1　BoNT/A inhibits the growth of yeast

2.2 BoNT/A 活性突变体不抑制酿酒酵母 *YPH499* 的生长

为了研究在酵母细胞中 BoNT/A 的活性位点 Glu224 突变为 Gln 后，突变的 BoNT/A 表达水平稳定性有无影响,对酵母的生长有无影响。如图 2 所示,当活性位点突变后,突变体 BoNT/A 表达水平稳定性几乎没有变化，并且不抑制酿酒酵母的生长。与本研究结果类似,Kukreja 等研究发现,BoNT/A 的催化活性区域 HEXXH 的 Glu224 突变成 Gln 后,BoNT/A 的催化活性完全失去[23],这都说明 BoNT/A 对酿酒酵母的生长抑制作用是通过其水解酶催化活性来实现的。



(a)Anti-V5的蛋白质免疫印迹结果



(b)SD与SG尿嘧啶平板的30 ℃培养结果　(c)示意图

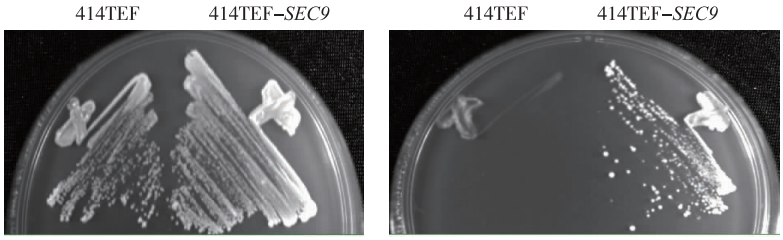
注:BoNT/A-M 为 pRS420GAL$_{pr}$-BoNT/A^{E224Q}-V5

图 2　BoNT/A 活性突变体不抑制酿酒酵母 *YPH499* 生长

Fig. 2　BoNT/A mutant does not inhibit the growth of yeast

2.3 在 *sec9*△中过表达 Sec9 可以回补酵母的生长

由于 SEC9 是酵母生长必须基因，在 YPH499 中敲除 SEC9 基因的酵母不能生长，因此我们在酵母中先导入一个 pRS316–SEC9 质粒在敲除 SEC9 基因。如图 3 所示，*sec9*△(*pRS316–SEC9*)中导入 pRS414TEF–*SEC9* 质粒，5–FOA 移除 pRS316–SEC9 质粒后 sec9△(pRS414TEF–*SEC9*)仍可以生长，这说明 pRS414TEF–*SEC9* 质粒可以在酵母中表达并能回补 *sec9*△菌株的生长。



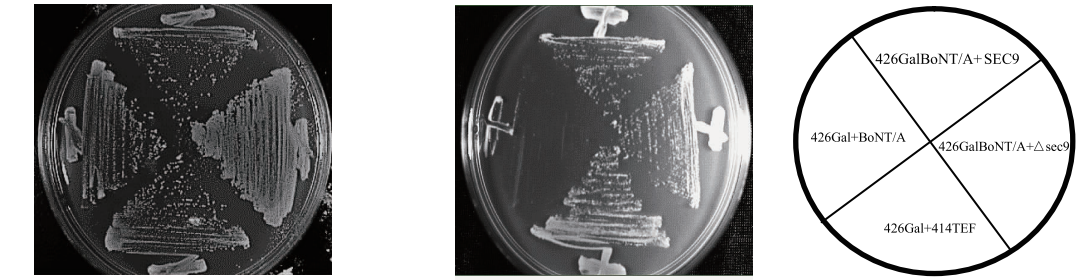
(a)SD色氨酸平板的30 ℃培养结果　(b)5-FOA色氨酸平板的30 ℃培养结果

图 3　在 *sec9*△中过表达 Sec9 可以回补酵母的生长

Fig. 3　Overexpression of Sec9 in *sec9*△ could rescue the yeast growth

2.4 在酵母中过表达 Sec9 可以解除 BoNT/A 对生长的抑制

从图 2 可知，BoNT/A 对酵母细胞的生长抑制作用是基于其水解酶蛋白活性。在动物细胞中 SNAP25 是 BoNT/A 的降解底物，而在酵母中只有 SNAP25 的同源基因 SEC9，因此，为了探究 Sec9 蛋白是否会被 BoNT/A 降解，本文在酵母中过表达 Sec9 蛋白，观察是否能回补被 BoNT/A 抑制的酵母的生长。如图 4 所示，过表达 Sec9 可以回补被 BoNT/A 抑制的酵母的生长。



(a)SD尿嘧啶色氨酸双缺平板的30 ℃培养结果　(b)SG尿嘧啶色氨酸双缺平板的30 ℃培养结果　(c)示意图

注：*EC9* 为 pRS414TEF–*SEC9*，△*sec9* 为 pRS414TEF–△*Nsec9*。

图 4　过表达 Sec9 可以回补 BoNT/A 对酿酒酵母 *YPH499* 的抑制

Fig. 4　Overexpression of Sec9 could rescue the inhibition of BoNT/A to *YPH499*

3 结　语

本研究在酿酒酵母细胞中表达了 BoNT/A，研究发现，在酿酒酵母细胞中 BoNT/A 通过其水解酶活性抑制酵母细胞的生长，当活性位点被突变，失去水解酶活性的 BoNT/A 不会抑制酵母细胞的生长。可以利用酵母细胞研究 BoNT/A 的功能，同时还可以在酵母细胞中进行 BoNT/A 抗性药物的筛选。同时研究还发现，在表达 BoNT/A 的酿酒酵母细胞中过表达 Sec9 蛋白可以解除 BoNT/A 对酵母细胞的生长抑制作用。可以推测 Sec 蛋白可能是 BoNT/A 在酵母细胞中的识别底物，BoNT/A 是通过降解 Sec9 蛋白从而抑制酵母的生长。本研究为酵母中肉毒神经毒素的研究提供了一定的理论依据，可以通过在酵母中表达肉毒神经毒素，可以对其功能进行进一步研究，可以在酵母中建立肉毒神经毒素筛选系统，还可以探索在酵母中是否存在肉毒神经毒素新的降解底物。

参考文献:

[1] FASSHAUER D,SUTTON R B,BRUNGER A T,et al. Conserved structural features of the synaptic fusion complex:SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,1998,95(26):15781-15786.

[2] WANG Liping,SHAO Kankai,GAO Xiaodong,et al. Functional analysis of the SNARE domain of syntaxin family proteins using yeast sporulation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,30(5):530-535.(in Chinese)

[3] STROP P,KAISER S E,VRLJIC M,et al. The structure of the yeast plasma membrane SNARE complex reveals destabilizing water-filled cavities[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,2008,283(2):1113-1119.

[4] SIMPSON L. The life history of a botulinum toxin molecule[J]. **Journal of the International Society on Toxinology**,2013,68:40-59.

[5] SMITH T J,LOU J,GEREN I N,et al. Sequence variation within botulinum neurotoxin serotypes impacts antibody binding and neutralization[J]. **Infection and Immunity**,2005,73(9):5450-5457.

[6] ROSSETTO O,PIRAZZINI M,MONTECUCCO C. Botulinum neurotoxins:genetic,structural and mechanistic insights [J]. **Nature Reviews Microbiology**,2014,12(8):535-549.

[7] SHAPIRO R L,HATHEWAY C,BECHER J,et al. Botulism surveillance and emergency response. A public health strategy for a global challenge[J]. **Jama**,1997,278(5):433-435.

[8] DASGUPTA B R,DEKLEVA M L. Botulinum neurotoxin type A:sequence of amino acids at the N-terminus and around the nicking site[J]. **Biochimie**,1990,72(9):661-664.

[9] BLASI J,CHAPMAN E R,LINK E,et al. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25[J]. **Nature**,1993,365(6442):160-163.

[10] BLASI J,CHAPMAN E R,YAMASAKI S,et al. Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin[J]. **The EMBO Journal**,1993,12(12):4821-4828.

[11] SCHIAVO G,SHONE C C,ROSSETTO O,et al. Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1993,268(16):11516-11519.

[12] SCHIAVO G,MALIZIO C,TRIMBLE W S,et al. Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1994,269(32):20213-20216.

[13] SCHIAVO G,BENFENATI F,POULAIN B,et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin[J]. **Nature**,1992,359(6398):832-835.

[14] LOMNETH R,GIMENEZ J,MARTIN T F,et al. Calcium-dependent release of norepinephrine from permeabilized PC12 cells is inhibited by approximately 48 and approximately 112 kDa fragments of botulinum neurotoxin type E [J]. **Neuropharmacology**,1993,32(3):285-289.

[15] LALLI G,HERREROS J,OSBORNE S L,et al. Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains[J]. **Journal of Cell Science**,1999,112(16):2715-2724.

[16] RUMMEL A,KARNATH T,HENKE T,et al. Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G[J]. **Journal of Biological Chemistry**,2004,279(29):30865-30870.

[17] LACY D B,TEPP W,COHEN A C,et al. Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity[J]. **Nature Structural Biology**,1998,5(10):898-902.

[18] BROOKS V B. The action of botulinum toxin on motor-nerve filaments[J]. **Journal of Physiology**,1954,123(3):501-515.

[19] SCOTT A B. Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus [J]. **Transactions of the American Ophthalmological Society**,1981,79:734-770.

[20] JANKOVIC J,BRIN M F. Botulinum toxin:historical perspective and potential new indications [J]. **Muscle & Nerve Supplement**,1997,6:129-145.

[21] ERBGUTH F J. Historical notes on botulism,Clostridium botulinum,botulinum toxin,and the idea of the therapeutic use of the toxin[J]. **Journal of the Movement Disorder Society**,2004,19(8):2-6.

[22] LUVISETTO S,GAZERANI P,CIANCHETTI C,et al. Botulinum toxin type a as a therapeutic agent against headache and related disorders[J]. **Toxins**,2015,7(9):3818-3844.

[23] KUKREJA R V,SHARMA S,CAI S,et al. Role of two active site Glu residues in the molecular action of botulinum neurotoxin endopeptidase[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**,2007,1774(2):213-222.