

荧光成像技术在神经定位中的研究进展

胡世奇 黄晓峰 王育新

南京大学医学院附属口腔医院、南京市口腔医院口腔颌面外科 210008

通信作者:王育新, Email: 904489973@qq.com

【摘要】 术中神经定位困难常可增大神经损伤的风险,从而导致患者神经功能障碍。因此,如何在涉及神经的手术(如复发性腮腺肿瘤、前列腺等手术)中准确定位神经成为手术成功的关键因素之一。术中实时定位神经的方法众多,其中荧光成像技术具有高灵敏、易使用、低成本、无辐射的独特优势,因此受到越来越多研究者的关注。该文就荧光成像技术在神经定位中的相关研究成果进行综述。

【关键词】 立体定位技术;神经;光学成像;荧光;发展趋势

基金项目:江苏省科技项目(BE2018618)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2020.01.013

Research progress of fluorescence imaging in neural localization

Hu Shiqi, Huang Xiaofeng, Wang Yuxin

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Wang Yuxin, Email: 904489973@qq.com

【Abstract】 The difficulty of neural localization during operation often leads to the increased risk of nerve injury, which results in neurological dysfunction, so how to accurately locate the nerves in surgeries, such as operations for patients with recurrent parotid tumors and prostate surgery, has become one of the key factors for the success of the operation. There are many methods to locate nerves in real time during operation, among which fluorescence imaging has attracted more and more attention due to its unique advantages of high sensitivity, easy to use, low cost and no radiation. In this article, the related research progresses of fluorescence imaging in neural localization are reviewed.

【Key words】 Stereotaxic techniques; Nerve; Optical imaging; Fluorescence; Trends

Fund program: Jiangsu Science and Technology Program (BE2018618)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2020.01.013

各类外科手术中,常因神经定位困难而增大损伤神经的风险,从而导致肌肉麻痹、瘫痪、感觉丧失等功能障碍,使患者生活质量严重下降。目前肌电图(electromyogram, EMG)、超声、MRI 等检查常被应用于术中辅助神经定位和术后神经功能恢复的判断^[1]。EMG 通过记录目标神经受刺激所产生的肌张力活动和复合肌动作电位来反映神经电冲动,是目前术中定位神经最常用的技术,如应用于甲状腺及腮腺切除术^[2-3];超声可在术中定位较表浅、直径较大的神经,已被应用于神经阻滞麻醉时神经干的精准定位^[4];MRI 在各种神经外科疾病的诊断、手术计划制定和术后评估等方面应用广泛,但难以单独应用于术中^[5]。CT、PET 等也被用于定位神经病变部位^[6-8],但电离辐射的存在使其无法在术中应用。

荧光成像技术以其独特的选择性、可见性和可调性,已广泛应用于药物的研发和评价、特殊离子的标记、生物大分子检测、活细胞生物学行为的示踪、体内特殊器官或肿瘤的成像等诸多领域^[9-10]。荧光探针包括碳纳米材料、半导体量子点、稀土配合物、有机小分子荧光探针和聚合物荧光探针等,发射与激发波段位于紫外区至近红外区,其中近红外荧光探针(near infrared fluorescence probes, NIFPs)以其独特的

优势在肿瘤成像方面倍受关注^[11-12]。近年来,以荧光分子探针为基础的神经成像逐渐受到重视并显示出临床应用潜力。本文按照荧光分子非特异性和特异性与神经结合的方式分别对荧光分子用于神经成像的现状进行综述。

一、非特异性荧光分子成像

非特异性荧光分子成像是利用神经对荧光示踪剂的逆向运输,或将荧光示踪剂注入伴行血管间接标记神经的技术。主要包括 2 类:轴突运输示踪剂以及血管神经束染料。

1.轴突运输示踪剂。注射于目标神经附近,利用轴突逆行转运机制显示神经,已在动物模型上成功显示外周和中枢神经。目前此类示踪剂主要包括 NeuroTrace、Dio/FastDio、荧光金(Fluorogold)和快蓝(Fast Blue)等^[13],其发射、激发波长位于蓝区至紫外区。由于轴突运输示踪剂缺乏穿越血管神经屏障的能力,仅依赖轴突运输机制来标记神经,因此局部注射是其应用的主要方式。Samarasena 等^[14]利用 NeuroTrace 在激光共聚焦显微镜下成功观察了猪胃黏膜内肠神经元,由此避免了诊断胃肠动力疾病时行肠黏膜全层活组织检查(简称活检)。在模拟腮腺切除术的研究中,注射 FastDio 后 2 d 可在手术显微镜下定位面神经,术中寻找神经的时间较注射生理

盐水组缩短约 2 min^[15]。Marangos 等^[16]注射 Fast Blue 和 Fluorogold 后 4~7 d,大鼠和猴耳蜗核的听觉神经纤维可在术中紫外光下显影。尽管轴突运输示踪剂在神经术中定位方面取得了一定成果,但神经对其运输缓慢且受距离限制,因此神经显像时间长^[15-16],距注射点较远的神经段无法清晰显影。

2.血管神经束染料。其借助神经伴行血管的显像间接定位神经。吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)是 1958 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准可应用于临床的近红外染料。20 世纪 90 年代末,ICG 荧光成像开始被应用于各类外科手术中,如定位前哨淋巴结、评估安全切缘、胆管成像和器官灌注评估等^[17-20]。近年来,通过术中局部注射可使 ICG 聚集于神经周围小血管,再利用近红外成像系统使相应部位神经结构间接可视化^[21-22]。由于 ICG 发射的近红外荧光具有一定的组织穿透性,有利于深部组织内的神经结构成像,使其成为神经荧光成像中极具潜力的示踪剂。Wagner 等^[23]在机器人胸腺切除术中应用达芬奇机器人系统(daVinci-Si robot),研究结果显示 80%(8/10)的患者左胸膜中对侧膈神经显示 ICG 荧光。Chen 等^[24]在乳突和侧颅底术中,通过近红外成像系统成功对所有患者($n=16$)的面神经显像,但需重复给药使神经持续显像。Mangano 等^[25]将 ICG 用于机器人前列腺癌根治性切除术,术中应用近红外成像系统成功显示所有患者($n=26$)的术区神经血管束,手术时间并未增加且术后未出现神经功能障碍。神经 ICG 荧光成像亦受神经显露状况、肌肉等背景组织的荧光干扰等多种因素影响,导致成像准确性下降。

二、特异性荧光分子成像

由于非特异性示踪剂的神经靶向性差,随着近年来生物合成技术的迅速发展,具有更佳神经靶向性的特异性荧光示踪剂得以被开发并应用到临床前实验中。这些荧光示踪剂包括毒素-染料缀合物、髓鞘特异性探针和神经膜特异性探针等。

1.毒素-染料缀合物。一些毒素的部分亚单位可特异性结合神经,如破伤风毒素的无毒 C 片段介导神经细胞对完整破伤风毒素的摄取和逆行运输;霍乱毒素的非致病亚基 B 可与神经组织上表达的神经节苷脂 GM1 结合。2006 年,O'Malley 等^[26]将霍乱毒素的非致病亚基 B 与荧光染料结合,肌内注射该示踪剂后在显微镜下观察到兔面部神经荧光,但无法显示完整神经束。2009 年,Schellingerhout 等^[27]将破伤风毒素的无毒 C 片段与荧光染料合成示踪剂,肌内注射该示踪剂后 90 min,在小动物成像仪中观察到小鼠脊髓前部运动神经元的荧光显像。尽管非活性毒素亚单位具有神经特异性,但免疫原性和潜在系统毒性仍需验证。

2.髓鞘特异性探针。髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)是构成髓鞘骨架的一种特殊蛋白,可作为神经特异性荧光分子的结合靶点。基于此研发的分子探针主要包括二苯乙烯基苯衍生物(distyrylbenzene derivatives, DSB)、香豆素衍生物(coumarin derivatives, CMC)和神经节苷脂抗体,其中 CMC 和 DSB 是自体荧光分子,CMC 的发射、激发波长依据溶剂不同分布于蓝区至近红外区,DSB 则分布于红区及近红外区^[28-30]。2006 年,Wu 等^[28]合成了一种 DSB 探针 1,4-双(4-氨基苯乙烯基)-2-二甲氧基苯[(*E,E*)-1,4-bis(4-

aminostyryl)-2-dimethoxy-benzene, BDB]对髓鞘有较高选择性,可有效区分髓鞘病变组织;2008 年,另一种 DSB 探针 1,4-双(*p*-氨基苯乙烯基)-2-甲氧基苯[(*E,E*)-1,4-bis(*p*-aminostyryl)-2-methoxy-benzene, BMB]被发现,利用小动物多光谱成像系统能清晰显像小鼠中枢神经有髓白质^[29]。后续研究证明 DSB 探针 GE3082、GE3111 和 GE3126 在鼠及猪模型中可成像坐骨神经,在肌肉背景下与 BMB 相比,信号背景比(signal-to-background ratio, SBR)分别为 2.4、3.1 和 3.7^[31-33]。上述荧光探针已被成功应用于图像引导神经外科手术中^[29,31-33]。DSB 探针也存在诸多缺点:(1)与脂肪组织结合性高于神经,影响脂肪与神经的区分;(2)可跨越血-脑屏障,且毒性和动力学的研究证据尚不充分;(3)研究中应用的静脉注射配方中含有不适用于人体的溶剂,因此有学者尝试使用聚合物胶束运输显像剂来提高安全性^[34]。

香豆素是植物中天然存在的化合物,具有许多重要的生物活性,现已广泛应用于临床^[35]。2010 年,Wang 等^[30]应用 CMC 成功显示小鼠坐骨神经,用解剖荧光显微镜成像达到最大荧光 SBR 仅需 10 min,较 DSB (4 h)显著缩短。2011 年,Wang 等^[36]进一步研究证实 3-[4-(二甲氨基)苯基]-7-(3-氟代丙氧基)-2H-苯比吡喃-2-酮[3-(4-(dimethylamino)phenyl)-7-(3-fluoropropoxy)-2H-chromen-2-one, FTC]具有比 CMC 更强的神经结合能力。然而,由于 CMC 与 FIC 均可穿透血-脑屏障,因此在缺乏毒性和动力学研究支撑下,其临床应用受到限制。

2015 年,Massaad 等^[37]将神经节苷脂单克隆抗体与荧光探针 Dylight-550 结合,用解剖荧光显微镜对小鼠进行活体成像,高亮显示了小鼠坐骨神经及含有丰富神经丛的中空内脏器官,如胃、小肠、大肠和膀胱;最佳荧光成像时间在注射后 3~6 d,注射后第 6 天肌肉背景下 SBR 值最高为 4.2,但其潜在免疫学风险仍需进一步研究。

3.神经膜特异性探针。神经膜由致密的结缔组织构成,包括神经内膜、神经束膜和神经外膜。蛋白多糖(proteoglycans, PG)是神经膜中的主要组成蛋白,是一类具有一条或多条糖链的蛋白,被认为是神经荧光成像的结合靶点^[38]。凝集素是一类能够与碳水化合物紧密结合的蛋白质,可与 PG 发生特异性结合。Kleinjan 等^[39]的研究证实近红外荧光染料青色素 5 (Cy5)结合小麦胚芽凝集素靶向神经外膜上 PG 后,可在光谱动物荧光扫描仪中观察到小鼠坐骨神经显示荧光,其他凝集素如花生凝集素、红芸豆凝集素、番茄凝集素亦能使神经显示荧光,肌肉背景下小麦胚芽凝集素的 SBR 值为 1.86,而番茄凝集素和红芸豆凝集素的 SBR 值分别为 1.26 和 1.12。此类荧光示踪剂的缺点:(1)凝集素制剂需要直接注射到神经表面,因此无法应用于周围神经荧光成像;(2)常与邻近淋巴引流途径中的结缔组织相互作用,降低了荧光背景信噪比^[39]。

由噬菌体展示技术筛选得到的神经结合肽 NTQT-LAKAPEHT,又称 NP-41,可特异地与神经外膜上的层粘连蛋白结合。2011 年,Whitney 等^[40]使用 NP-41 与 5-羧基荧光素(FAM)或 Cy5 荧光基团结合来实现神经荧光成像,结果显示 FAM-NP-41 可显示人体内几乎所有运动和感觉神经,能显示细小到直径 50 μm 的神经,其中坐骨神经的荧光 SBR 达到

了 6.7。在小鼠腮腺模拟手术实验中, FAM-NP-41 定位面神经时间较白光下减少 27%; 在神经损伤模型中定位和解剖面神经残端所需时间减少 39.4%^[41-42]。

与 NP-41 类似, 寡肽序列 acetyl-SGQVPWPEEYV-VKSSGGCCONH₂ (又称 HNP-401) 亦可与神经靶向结合。2018 年, Hingorani 等^[43]将 HNP-401 与 FAM 结合, 研发出荧光示踪剂 FAM-HNP-401, 并成功使人腓肠肌神经、内侧前臂皮肤神经、喉神经和自主神经成像。与 FAM-NP-41 相比, FAM-HNP-401 结合神经后可产生 10 倍以上荧光强度, 神经肌肉荧光 SBR 也更高 (2.4 与 3.1)。生物安全性方面, FAM-HNP-401 具有低毒性和快速血液清除的特征, 而且其优先结合神经束膜, 对神经信号传导影响很小^[43]。

除靶向神经特异性蛋白外, 某些小分子化合物具有天然结合神经的特点。Park 等^[44]合成恶嗪 4 作为神经荧光示踪剂, 其发射波长位于近红外区内, 可产生自体荧光, 并亲和周围神经, 可用于深部组织内神经成像; 小鼠体内给药后 4 h, 在双通道近红外 FLARE 成像系统下观察到臂丛神经 SBR 值约为 3, 坐骨神经 SBR 值约为 2.1。尽管恶嗪 4 可实现神经荧光成像, 但其生物毒性不详、SBR 提高有限、脂肪组织对神经荧光成像产生干扰等缺点使其无法在临床应用。

三、结论和展望

神经荧光成像应用于术中神经定位受到越来越多的关注, 新方法、新化合物被不断研发应用。非特异性荧光分子探针种类丰富, 生物安全性好, 但显像等待时间长, 适用于粗大神经术中成像; 特异性荧光分子探针识别细小神经分支的能力更强, 但合成复杂, 生物安全性不能满足临床要求。目前这一新兴领域仍存在诸多问题亟待解决: 首先, 评价神经荧光成像效果主要依据相对荧光单位 (relative fluorescence units, RFU)、SBR 和背景结构等指标, 缺乏标准共识, 因此比较不同示踪剂的客观性和有效性存在不足; 其次, 动物模型及目标神经多样性使得研究缺乏统一性; 最后, 对于荧光示踪剂在神经成像的灵敏度、分辨率、穿透深度、毒性和生物动力学方面的研究匮乏。神经荧光成像技术是一个新兴领域, 随着研究深入, 可能实现术中实时神经定位。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Kim SM, Kim SH, Seo DW, et al. Intraoperative neurophysiologic monitoring: basic principles and recent update [J]. J Korean Med Sci, 2013, 28(9): 1261-1269. DOI:10.3346/jkms.2013.28.9.1261.
- [2] Kandil E, Mohamed SE, Deniwar A, et al. Electrophysiologic identification and monitoring of the external branch of superior laryngeal nerve during thyroidectomy [J]. Laryngoscope, 2015, 125(8): 1996-2000. DOI:10.1002/lary.25139.
- [3] Savvas E, Hillmann S, Weiss D, et al. Association between facial nerve monitoring with postoperative facial paralysis in parotidectomy [J]. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2016, 142(9): 828-833. DOI:10.1001/jamaoto.2016.1192.
- [4] Strakowski JA. Ultrasound-guided peripheral nerve procedures [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2016, 27(3): 687-715. DOI:10.1016/j.pmr.2016.04.006.
- [5] Newhart H, Patterson J, Gunasekaran A, et al. The incremental value of magnetic resonance neurography for the neurosurgeon: review of the literature [J]. World Neurosurg, 2019, 122: 331-341. DOI:10.1016/j.wneu.2018.10.212.
- [6] 伍露琴, 张慧纬, 管一晖. 中枢神经系统疾病 PET 显像剂研究进展 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(11): 756-761. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.11.012. Wu LQ, Zhang HW, Guan YH. Research progress on central nervous system PET tracers [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(11): 756-761. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.11.012.
- [7] 张宏. PET 分子影像: 神经核医学发展的机遇与挑战 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2017, 37(9): 525-526. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.09.001. Zhang H. PET molecular imaging: the opportunity and challenge for the development of neuro-nuclear medicine [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2017, 37(9): 525-526. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2017.09.001.
- [8] 何枫, 王云华. 阿尔茨海默病 PET 正电子分子影像探针研究进展 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(2): 128-133. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.02.014. He F, Wang YH. Research progress of positron-emitting molecular imaging probes for Alzheimer's disease [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(2): 128-133. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.02.014.
- [9] Umezawa K, Yoshida M, Kamiya M, et al. Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics [J]. Nat Chem, 2017, 9(3): 279-286. DOI:10.1038/nchem.2648.
- [10] Reja SI, Minoshima M, Hori Y, et al. Development of an effective protein-labeling system based on smart fluorogenic probes [J]. J Biol Inorg Chem, 2019, 24(4): 443-455. DOI:10.1007/s00775-019-01669-y.
- [11] 房含峰, 张永学, 兰晓莉. 上转换发光纳米材料在生物成像领域的应用及进展 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2018, 38(9): 632-635. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.09.014. Fang HY, Zhang YX, Lan XL. Applications of upconversion nanoparticles in bioimaging [J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2018, 38(9): 632-635. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2018.09.014.
- [12] Chinnathambi S, Shirahata N. Recent advances on fluorescent biomarkers of near-infrared quantum dots for *in vitro* and *in vivo* imaging [J]. Sci Technol Adv Mater, 2019, 20(1): 337-355. DOI:10.1080/14686996.2019.1590731.
- [13] Schmued LC. Development and application of novel histochemical tracers for localizing brain connectivity and pathology [J]. Brain Res, 2016, 1645: 31-35. DOI:10.1016/j.brainres.2016.03.053.
- [14] Samarasekera JB, Ahluwalia A, Shinoura S, et al. *In vivo* imaging of porcine gastric enteric nervous system using confocal laser endomicroscopy & molecular neuronal probe [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(4): 802-807. DOI:10.1111/jgh.13194.
- [15] de Melo GM, Cervantes O, Covelan L, et al. Facial nerve identification with fluorescent dye in rats [J]. Acta Cir Bras, 2016, 31(2): 92-102. DOI:10.1590/S0102-86502016002000003.
- [16] Marangos N, Illing RB, Krüger J, et al. *In vivo* visualization of the cochlear nerve and nuclei with fluorescent axonal tracers [J]. Hear Res, 2001, 162(1-2): 48-52. DOI:10.1016/S0378-5955(01)00368-9.
- [17] Newton AD, Predina JD, Shin MH, et al. Intraoperative near-infrared imaging can identify neoplasms and aid in real-time margin as-

- assessment during pancreatic resection [J]. *Ann Surg*, 2019, 270 (1): 12-20. DOI:10.1097/SLA.0000000000003201.
- [18] Ankersmit M, Hoekstra OS, van Lingen A, et al. Perioperative PET/CT lymphoscintigraphy and fluorescent real-time imaging for sentinel lymph node mapping in early staged colon cancer[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2019, 46 (7): 1495-1505. DOI:10.1007/s00259-019-04284-w.
- [19] Ambe PC, Plambeck J, Fernandez-Jesberg V, et al. The role of indocyanine green fluoroscopy for intraoperative bile duct visualization during laparoscopic cholecystectomy: an observational cohort study in 70 patients[J]. *Patient Saf Surg*, 2019, 13: 2. DOI:10.1186/s13037-019-0182-8.
- [20] van den Hoven P, Ooms S, van Manen L, et al. A systematic review of the use of near-infrared fluorescence imaging in patients with peripheral artery disease[J]. *J Vasc Surg*, 2019, 70(1): 286-297. DOI:10.1016/j.jvs.2018.11.023.
- [21] Gustafson TP, Yan Y, Newton P, et al. A NIR dye for development of peripheral nerve targeted probes[J]. *Medchemcomm*, 2012, 3 (6): 685-690. DOI:10.1039/C2MD00297C.
- [22] Debie P, Hernot S. Emerging fluorescent molecular tracers to guide intra-operative surgical decision-making [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 510. DOI:10.3389/fphar.2019.00510.
- [23] Wagner OJ, Louie BE, Vallières E, et al. Near-infrared fluorescence imaging can help identify the contralateral phrenic nerve during robotic thymectomy[J]. *Ann Thorac Surg*, 2012, 94(2): 622-625. DOI:10.1016/j.athoracsur.2012.04.119.
- [24] Chen SC, Wang MC, Wang WH, et al. Fluorescence-assisted visualization of facial nerve during mastoidectomy: a novel technique for preventing iatrogenic facial paralysis [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2015, 42(2): 113-118. DOI:10.1016/j.anl.2014.08.008.
- [25] Mangano MS, De Gobbi A, Beniamin F, et al. Robot-assisted nerve-sparing radical prostatectomy using near-infrared fluorescence technology and indocyanine green: initial experience[J]. *Urologia*, 2018, 85(1): 29-31. DOI:10.5301/uj.5000244.
- [26] O'Malley MR, Wittkopf JE, Cutler JL, et al. Fluorescent retrograde axonal tracing of the facial nerve [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116 (10): 1792-1797. DOI:10.1097/01.mlg.0000231344.92917.9c.
- [27] Schellingerhout D, Le Roux LG, Bredow S, et al. Fluorescence imaging of fast retrograde axonal transport in living animals[J]. *Mol Imaging*, 2009, 8(6): 319-329. DOI:10.2310/7290.2009.00029.
- [28] Wu C, Tian D, Feng Y, et al. A novel fluorescent probe that is brain permeable and selectively binds to myelin[J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(9): 997-1004. DOI:10.1369/jhc.5A6901.2006.
- [29] Wu C, Wei J, Tian D, et al. Molecular probes for imaging myelinated white matter in CNS [J]. *J Med Chem*, 2008, 51 (21): 6682-6688. DOI:10.1021/jm8003637.
- [30] Wang C, Popescu DC, Wu C, et al. In situ fluorescence imaging of myelination[J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(7): 611-621. DOI:10.1369/jhc.2010.954842.
- [31] Gibbs-Strauss SL, Nasr KA, Fish KM, et al. Nerve-highlighting fluorescent contrast agents for image-guided surgery[J]. *Mol Imaging*, 2011, 10(2): 91-101. DOI:10.2310/7290.2010.00026.
- [32] Cotero VE, Siclovan T, Zhang R, et al. Intraoperative fluorescence imaging of peripheral and central nerves through a myelin-selective contrast agent [J]. *Mol Imaging Biol*, 2012, 14 (6): 708-717. DOI:10.1007/s11307-012-0555-1.
- [33] Cotero VE, Kimm SY, Siclovan TM, et al. Improved intraoperative visualization of nerves through a myelin-binding fluorophore and dual-mode laparoscopic imaging [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6): e0130276. DOI:10.1371/journal.pone.0130276.
- [34] Hackman KM, Doddapaneni BS, Barth CW, et al. Polymeric micelles as carriers for nerve-highlighting fluorescent probe delivery [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (12): 4386-4394. DOI:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00582.
- [35] Lee S, Sivakumar K, Shin WS, et al. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(17): 4596-4599. DOI:10.1016/j.bmcl.2006.06.007.
- [36] Wang C, Wu C, Zhu J, et al. Design, synthesis, and evaluation of coumarin-based molecular probes for imaging of myelination [J]. *J Med Chem*, 2011, 54(7): 2331-2340. DOI:10.1021/jm101489w.
- [37] Massaad CA, Zhang G, Pillai L, et al. Fluorescently-tagged anti-ganglioside antibody selectively identifies peripheral nerve in living animals[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15766. DOI:10.1038/srep15766.
- [38] Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Chondroitin sulfate proteoglycans: key modulators in the developing and pathologic central nervous system [J]. *Exp Neurol*, 2015, 269: 169-187. DOI:10.1016/j.expneurol.2015.04.006.
- [39] KleinJan GH, Buckle T, van Willigen DM, et al. Fluorescent lectins for local *in vivo* visualization of peripheral nerves[J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9876-9892. DOI:10.3390/molecules19079876.
- [40] Whitney MA, Crisp JL, Nguyen LT, et al. Fluorescent peptides highlight peripheral nerves during surgery in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(4): 352-356. DOI:10.1038/nbt.1764.
- [41] Hussain T, Nguyen LT, Whitney M, et al. Improved facial nerve identification during parotidectomy with fluorescently labeled peptide [J]. *Laryngoscope*, 2016, 126 (12): 2711-2717. DOI:10.1002/lary.26057.
- [42] Hussain T, Mastrodimos MB, Raju SC, et al. Fluorescently labeled peptide increases identification of degenerated facial nerve branches during surgery and improves functional outcome [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119600. DOI:10.1371/journal.pone.0119600.
- [43] Hingorani DV, Whitney MA, Friedman B, et al. Nerve-targeted probes for fluorescence-guided intraoperative imaging [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4226-4237. DOI:10.7150/thno.23084.
- [44] Park MH, Hyun H, Ashitate Y, et al. Prototype nerve-specific near-infrared fluorophores [J]. *Theranostics*, 2014, 4 (8): 823-833. DOI:10.7150/thno.8696.

(收稿日期:2019-08-23)