

## 新型噁嗪类荧光染料用于术中神经成像

包瑞楚, 李昌盛, 顾月清<sup>\*</sup>

(中国药科大学, 南京 211198)

**摘要** 利用神经特异性荧光剂作为动物的神经标志物用于指导手术操作, 可降低术中神经损伤的发生率。本研究在噁嗪母核结构的基础上进行结构修饰, 通过质谱和核磁共振氢谱证实得到一系列噁嗪衍生物荧光染料YQN-3~YQN-6, 以突出大鼠的周围神经结构。在一系列靶向荧光染料中, YQN-3在NIR附近具有发射峰值, 静脉注射4 h后在臂丛神经和坐骨神经中显示出高特异性神经靶向信号。此外, 在甲状腺切除术中, YQN-3能精准定位并识别出喉返神经, 从而在术中保留这些神经的完整性。YQN-3合成工艺简单, 毒性小, 具有潜在的临床神经组织显像应用前景。

**关键词** 荧光引导手术; 噁嗪; 荧光染料; 荧光成像; 神经靶向

中图分类号 R981 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)06-0716-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220611

引用本文 包瑞楚, 李昌盛, 顾月清. 新型噁嗪类荧光染料用于术中神经成像[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(6): 716–724.

Cite this article as: BAO Ruichu, LI Changsheng, GU Yueqing. Novel oxazine fluorescent dyes for intraoperative neuroimaging[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(6): 716–724.

## Novel oxazine fluorescent dyes for intraoperative neuroimaging

BAO Ruichu, LI Changsheng, GU Yueqing<sup>\*</sup>

China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** Nerve-specific fluorescent agents can be used as nerve markers in animals to guide surgical procedures and reduce the incidence of intraoperative nerve injury. In this study, the structure of oxazine mother nucleus was modified. A series of oxazine derivative fluorescent dyes YQN-3-YQN-6 were obtained by mass spectrometry and <sup>1</sup>H NMR, which can highlight the peripheral nerve structure of rats. Among a series of targeted fluorescent dyes, YQN-3 had emission peaks near NIR and showed highly specific nerve targeting signals in the brachial plexus and sciatic nerves 4 h after intravenous administration. In addition, YQN-3 can accurately locate and identify recurrent laryngeal nerves during thyroidectomy, thus preserving the integrity of these nerves during surgery. With its simple synthesis and low toxicity, YQN-3 can be potentially applied for clinical neural tissue imaging.

**Key words** fluorescence guided surgery; oxazine; fluorescent dye; fluorescence imaging; nerve targeting

外科手术是大多数疾病和损伤最有效的治疗选择, 全世界每年有超过3亿次手术<sup>[1]</sup>。外科手术的最终目标是通过保留神经组织、血管等重要结构来移除或修复组织, 同时最大限度地减少并发症。医源性神经损伤是最令人头疼的术后并发症之一, 其引起的慢性神经疾病不仅降低了患者的生活质量, 而且增加了医疗费用<sup>[2]</sup>。尽管外科技术和医疗设备不断发展, 核磁共振成像<sup>[3]</sup>、肌电图<sup>[4]</sup>、超声波<sup>[5]</sup>、光学相干断层扫描<sup>[6]</sup>和共聚焦显微内镜

检查已被应用于辅助术中神经识别。但是, 这些技术缺乏特异性、分辨率和宽视场成像功能, 使得神经实时监测变得困难。荧光引导手术通过增强术中特定组织的可视化<sup>[7]</sup>, 有效地将术前成像和手术指导结合起来, 具有革新手术的潜力, 非常适合神经组织等重要结构保护。然而, 已经发现的几类神经特异性荧光团, 包括二苯乙烯衍生物<sup>[8]</sup>、二苯乙烯基苯(DSB)<sup>[9]</sup>、香豆素衍生物<sup>[10]</sup>、苯乙烯基吡啶(FM)、三碳菁、神经特异性多肽<sup>[11]</sup>和钠通道选

择性多肽<sup>[12]</sup>都受到发射波长较短、组织非特异性摄取高的困扰, 而噁嗪类荧光团<sup>[13]</sup>是发射波长在可见光波段的神经特异性荧光染料, 具有较强的荧光信号、结构可修饰空间。

临床中, 喉返神经的医源性损伤是一种常见的甲状腺术后并发症, 通过肉眼识别进而保护喉返神经是甲状腺手术中保证喉返神经安全的金标准<sup>[14]</sup>。然而, 对于需进行二次甲状腺手术的患者, 由于正常的解剖结构的破坏, 再次手术过程中单纯通过肉眼识别喉返神经的难度大大增加。因此, 在甲状腺再次手术过程中如何精准定位、识别喉返神经, 是避免术中神经损伤的关键。

MBP 是神经髓鞘的主要成分, 在形成和维持髓磷脂的稳定中起着至关重要的作用, 对于神经系统的正常功能非常重要<sup>[15]</sup>。MBP 是 1,4-双(对氨基苯乙烯基)-2-甲氧基苯(BMB) 的潜在分子靶标<sup>[16]</sup>, 可能与髓鞘碱性蛋白中的  $\beta$ -折叠片状构象有关<sup>[17]</sup>。在目前已经开发或发现的神经荧光染料中, 同一类别的物质具有相似的性质, 噁嗪类衍生物基于与 BMB 的化学相似性, MBP 也可能是其潜在分子靶标。有文献报道, 除大鼠外, 对猪神经进行噁嗪 4 的免疫组织化学研究, 可以应用兔抗髓鞘碱性蛋白来显示髓鞘, 同时用 MBP 抗体染色, 结果显示噁嗪 4 与纤维束中的髓鞘共定位<sup>[15]</sup>。

本研究中在噁嗪类化合物母核结构基础上进行结构修饰, 得到了 YQN-3 ~ YQN-6 4 个化合物, 其结构经质谱和核磁共振氢谱确证, 并且其最大吸收和最大发射波长分别在 625 nm 和 640 nm 左右, 具有较好的光谱性质。进一步在大鼠中筛选出具有神经组织高特异性靶向的 YQN-3, 最后在甲状腺手术切除过程中验证了, 探针 YQN-3 具有喉返神经特异性靶向能力, 能很好地靶向、定位喉返神经, 有效地避免术中损伤。YQN-3 具有良好的安全性, 具有潜在的临床神经显影应用前景。

## 1 材 料

### 1.1 试 剂

高氯酸(70%)、二甲基亚砜、高氯酸噁嗪 4(阿拉丁生化科技股份有限公司);叔丁醇钾、间羟基-*N,N*-二乙基苯胺、间溴苯甲醚(毕得医药科技股份有限公司);四(三苯基膦)钯(阿达玛斯试剂有限

公司);环丁胺、环己胺(分析纯, 迈瑞尔化学技术有限公司);水合氯醛(分析纯, 贤鼎生物科技有限公司);胎牛血清(生物级, 美国赛默飞世尔科技公司);Cell Counting Kit-8(碧云天生物技术有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(源叶生物科技有限公司);DMEM 培养基、胰蛋白酶(生物级, 凯基生物技术有限公司)。

### 1.2 仪 器

Hei-VAP Core 型旋转蒸发仪(德国海道夫有限公司);Avance-400 型核磁共振波谱仪(德国布鲁克公司);6540-ESI-MS 型高分辨质谱仪(美国安捷伦科技公司);UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津仪器有限公司);F-4700 型荧光光谱仪(日本日立有限公司);IVIS Lumia III 小动物活体成像仪(美国珀金埃尔默公司);Leica CM1950 型冷冻切片机(德国徕卡有限公司);ELx800 型酶标仪(美国伯腾有限公司)。

### 1.3 动 物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体重( $210 \pm 10$ )g, 由南京青龙山动物繁殖中心提供, 许可证号: SCXK(浙)2019-0002。手术前, 用腹腔注射水合氯醛麻醉动物(120 mg/kg)。在所有研究完成后, 用吸入二氧化碳的方法对小鼠实施安乐死, 然后再进行颈椎脱位。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

## 2 方 法

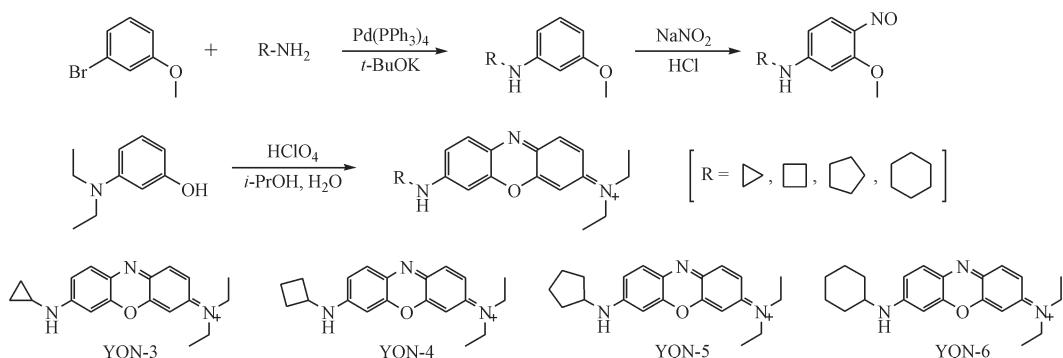
### 2.1 合成方法和表征数据

化合物 YQN-3 ~ YQN-6 的合成路线示意图如路线 1 所示。

#### 2.1.1 化合物 YQN-3 的合成

步骤一: 25 mL 三颈瓶中, 加入间溴苯甲醚 1.50 g(8.02 mmol), 环丙胺 0.73 g(12.79 mmol), 叔丁醇钾 1.36 g(12.12 mmol), 四(三苯基膦)钯 0.05 g(0.043 mmol) 和甲苯(8 mL), 氮气保护下 80 °C 加热反应 8 h。降至室温后将反应液旋干、硅胶柱色谱纯化, 可得到棕色油状液体 *N*-环丙基-3-甲氧基苯胺。MS, *m/z*: 164.14。

步骤二: 取将步骤一得到的 *N*-环丙基-3-甲氧基苯胺 200 mg(1.23 mmol) 溶解在冷的稀盐酸(2 mol/L) 溶液 5 mL 中, 随后加入亚硝酸钠 103 mg(1.49 mmol), 冰水浴中搅拌反应 2 h(控制反应液

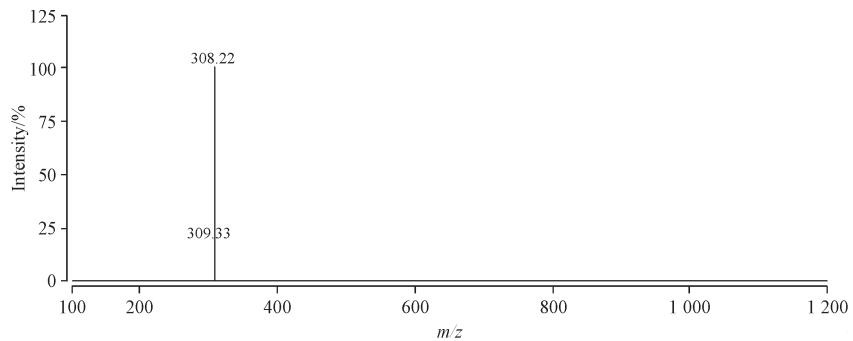


**Scheme 1** Synthetic route of YQN-3–YQN-6

温度<5℃),反应结束后将反应液滴入饱和碳酸钾溶液中,再用乙酸乙酯萃取、无水硫酸钠干燥后,旋干得黄绿色固体N-环丙基-3-甲氧基-4-亚硝基苯胺。MS, *m/z*: 192.09。

步骤三:间羟基-N,N-二乙基苯胺86 mg(0.52 mmol)溶解在*i*-PrOH-H<sub>2</sub>O(9:1, 4 mL)中80℃搅拌30 min后,将N-环丙基-3-甲氧基-4-亚硝基苯胺100 mg(0.52 mmol)和高氯酸(70%, 47 μL)的*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O(9:1, 4 mL)溶液缓慢加到反应中,氮气保护下80℃反应8 h(反应体系由棕色渐变为绿

色,最后变成深蓝色),反应完全后旋干、经硅胶柱色谱纯化,得YQN-3(40 mg,收率24.9%),深蓝色固体,经质谱、核磁氢谱确证结构。MS, *m/z*: 308.22, <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.53(s, 1H), 7.87~7.77(m, 1H), 7.77~7.67(m, 1H), 7.49~7.40(m, 1H), 7.16~7.08(m, 1H), 7.05(s, 1H), 7.00~6.89(m, 1H), 3.76(q, *J*=7.0 Hz, 4H), 2.94~2.84(m, 1H), 1.26(t, *J*=7.1 Hz, 6H), 1.01~0.94(m, 2H), 0.72~0.65(m, 2H)。如图1和图2所示。



**Figure 1** Mass spectra of YQN-3

### 2.1.2 YQN-4的合成

化合物YQN-4的合成参考YQN-3合成,其中在步骤一中以环丁胺代替环丙胺进行反应,得到N-环丁基-3-甲氧基苯胺,后续合成方法参考YQN-3合成中的步骤二、三,最终得目标化合物YQN-4(40 mg,收率23.8%),深蓝色固体,经质谱、核磁氢谱确证结构。MS, *m/z*: 322.21, <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.67(d, *J*=6.5 Hz, 1H), 7.79(d, *J*=9.4 Hz, 1H), 7.73(d, *J*=9.3 Hz, 1H), 7.47~7.33(m, 1H), 7.15(d, *J*=9.3 Hz, 1H), 6.97(s, 1H), 6.67(s, 1H), 4.44~4.24(m, 1H), 3.74(q, *J*=7.1 Hz, 4H), 2.49~2.39(m, 2H), 2.09(p, *J*=9.6 Hz,

2H), 1.84(q, *J*=9.1, 8.6 Hz, 2H), 1.25(t, *J*=7.0 Hz, 6H)。如图3和图4所示。

### 2.1.3 YQN-5的合成

化合物YQN-5的合成参考YQN-3合成,其中在步骤一中以环戊胺代替环丙胺进行反应,得到N-环戊基-3-甲氧基苯胺,后续合成方法参考YQN-3合成中的步骤二、三,最终得目标化合物YQN-5(60 mg,收率34.3%),深蓝色固体,经质谱、核磁氢谱确证结构。MS, *m/z*: 336.22, <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 9.59~9.23(m, 1H), 7.81(d, *J*=9.5 Hz, 1H), 7.73(d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.43~7.32(m, 1H), 7.23~7.12(m, 1H), 7.00(d, *J*=21.0 Hz,

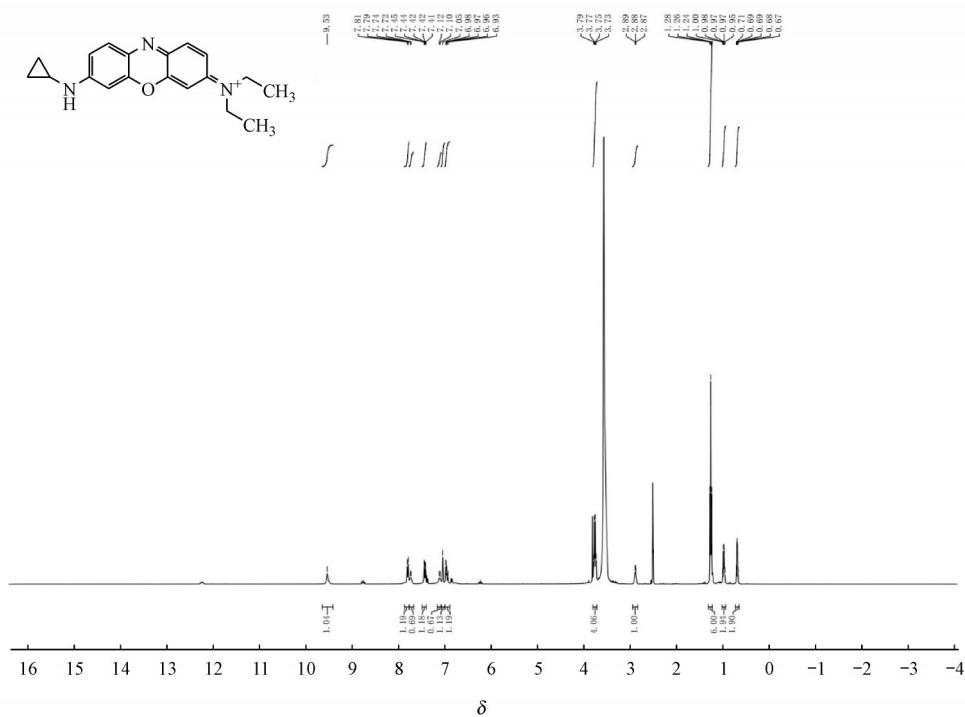
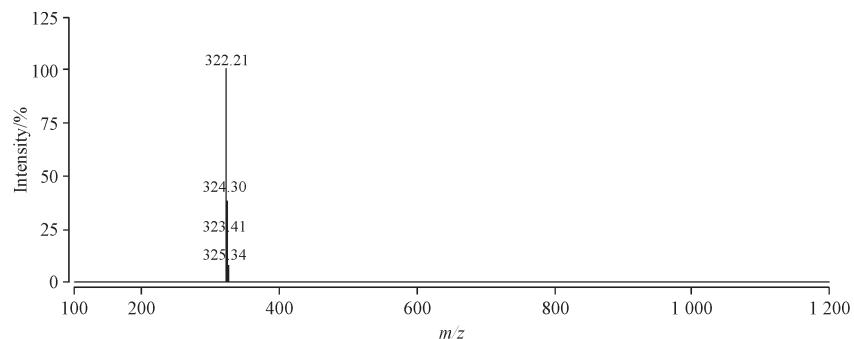
Figure 2  $^1\text{H}$  NMR spectra of YQN-3

Figure 3 Mass spectra of YQN-4

1H), 6.86(s, 1H), 4.33~4.13(m, 1H), 3.74(q,  $J=7.0$  Hz, 4H), 2.16~1.95(m, 2H), 1.89~1.41(m, 6H), 1.25(t,  $J=7.0$  Hz, 7H)。如图5和图6所示。

#### 2.1.4 YQN-6的合成

化合物YQN-6的合成参考YQN-3合成,其中在步骤一中以环己胺代替环丙胺进行反应,得到N-环己基-3-甲氧基苯胺,后续合成方法参考YQN-3合成中的步骤二、三,最终得目标化合物YQN-6,深蓝色固体,经质谱、核磁氢谱确证结构(47 mg,收率 25.8%)。MS,  $m/z$ : 350.24,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.39(s, 1H), 7.80(d,  $J=9.5$  Hz, 1H), 7.73(d,  $J=9.5$  Hz, 1H), 7.38(d,  $J=8.9$  Hz, 1H), 7.19(d,  $J=9.4$  Hz, 1H), 7.07~6.75(m,

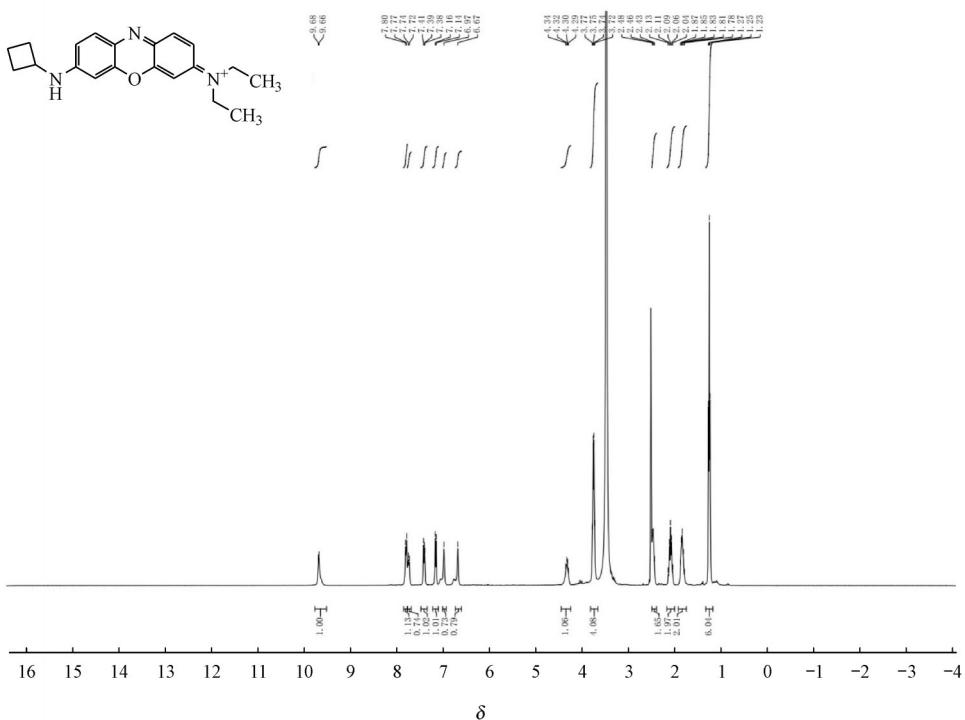
2H), 3.74(q,  $J=7.1$  Hz, 5H), 2.04~1.89(m, 2H), 1.83~1.71(m, 2H), 1.69~1.55(m, 1H), 1.53~1.26(m, 6H), 1.26~1.16(m, 6H)。如图7和图8所示。

#### 2.1.5 荧光染料YQN-3等的光谱特性

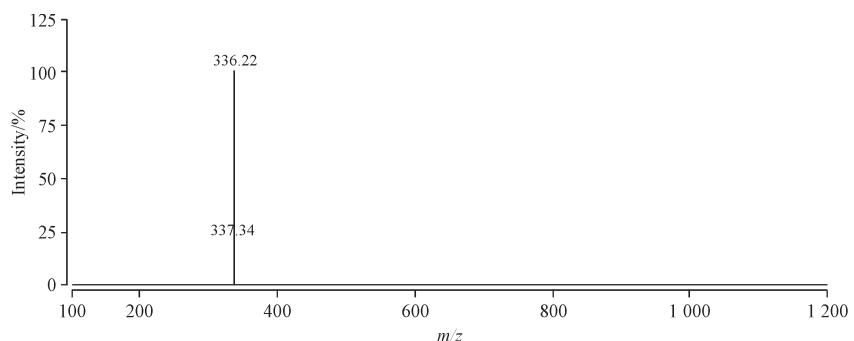
用乙腈将荧光染料YQN-3~YQN-6配成浓度125  $\mu\text{mol/L}$ 溶液备用。分别用紫外可见分光光度计和荧光光谱仪测定这4种荧光染料的紫外和荧光光谱(比色皿:1.0 cm,石英,四通),确定各染料的最大吸收波长和最大发射波长。

#### 2.2 荧光染料YQN-3等活体神经显像和毒性研究

**2.2.1 荧光染料噁嗪4和YQN-3等活体神经组织成像** 通过小动物活体成像仪,探究荧光染料噁



**Figure 4**  $^1\text{H}$  NMR spectra of YQN-4



**Figure 5** Mass spectra of YQN-5

嗪 4、YQN-3 ~ YQN-6 在正常大鼠中的坐骨神经和臂丛神经组织的靶向能力。实验过程中选取 620 nm 为激发波长, 荧光接受信号选取 670 nm 波段。荧光染料噻嗪 4、YQN-3 ~ YQN-6 采用二甲基亚砜-聚氧乙烯氢化蓖麻油-胎牛血清-PBS 缓冲液 (2:1:13:4) 的混合液溶解, 按 1.54 mg/kg 剂量尾静脉注射给药 4 h 后, 将脂肪和肌肉组织进行剥离, 暴露出坐骨神经、臂丛神经后, 再进行活体成像。

2.2.2 YQN-3在术中喉返神经荧光成像 上述研究结果表明,YQN-3具有最好的神经组织靶向能力,组织背景信号最低,可进一步开发应用于手术过程中神经组织荧光成像,有效避免神经损伤而导致功能性损伤。

在大鼠甲状腺手术切除过程中, YQN-3 按 1.54 mg/kg 剂量给药 4 h 后, 对大鼠甲状腺附近的脂肪、肌肉组织进行剥离, 暴露出甲状腺和喉返神经, 在大鼠甲状腺手术切除过程中, YQN-3 能有效地显示喉返神经, 对其神经组织完整性进行检视, 后续对荧光部位进行切除经组织病理 HE 染色。

### 2.2.3 荧光染料噁嗪4和YQN-3的细胞毒性

CCK-8试剂法：将人脑胶质瘤细胞U87<sup>[15]</sup>于37 °C，5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养，待细胞密度达到90%后，加0.25%胰蛋白酶进行消化，再加含血清的培养基终止消化，离心(1 000 r/min, 5 min)后倒除上清液后再加含血清的培养基1 mL进行重悬。于96孔板中每孔加入约5 000个细胞和血清1 mL，

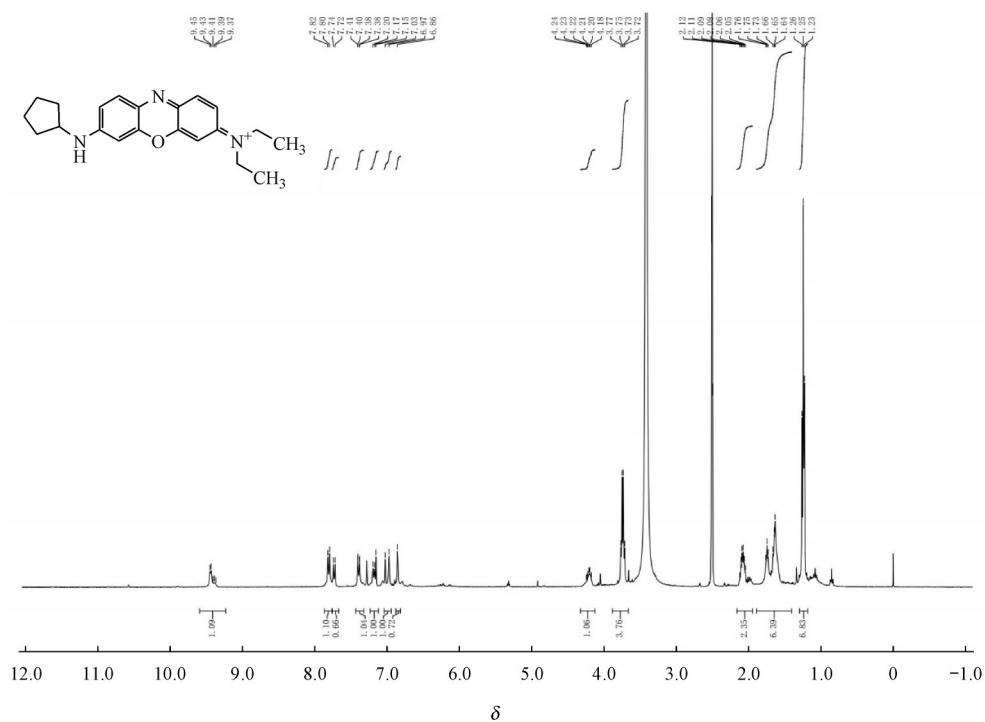


Figure 6  $^1\text{H}$  NMR spectra of YQN-5

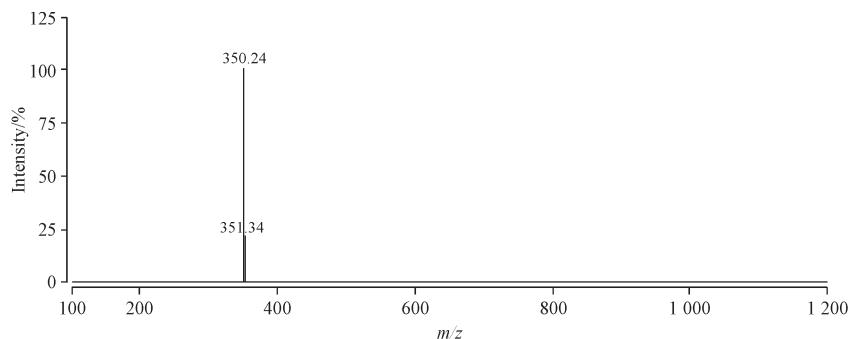


Figure 7 Mass spectra of YQN-6

37 °C, 5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中预培养 24 h 后, 分别加入 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3 mg/mL 的空白液、噁嗪 4 和 YQN-3, 再继续孵育 48 h, 然后往各孔中加入 CCK-8 溶液 10 μL 后继续培养 4 h, 待颜色变为橙色后进行检测。利用酶联免疫检测仪于 450 nm 波长检测各孔的吸收度 A。细胞存活率 =  $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$ , 采用 GraphPad Prism 对 CCK-8 结果进行数据分析。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 YQN-3 等设计思路与结构确证

利用生物电子等排体在荧光染料噁嗪 4 的结构基础上进行修饰得到的, 即以环丙烷、环丁烷、

环戊烷和环己烷对乙基进行替换得到化合物 YQN-3、YQN-4、YQN-5、YQN-6。在不改变噁嗪母环的结构基础上进行官能团替换, 旨在提高染料对神经组织的靶向能力, 制备得到的 YQN-3 等化合物都经质谱、核磁氢谱确证结构(如图 1~图 8 所示)。

#### 3.2 YQN-3 等的光谱性质

在乙腈中测定 YQN-3 等的最大吸收波长在 630 nm 左右, 如图 9 所示; 最大荧光发射波长在 645 nm 左右, 如图 10 所示。因此, YQN-3 等具有较长的发射波长, 适合用于活体显像。

#### 3.3 YQN-3 等在体神经显像

如图 11 所示, 在噁嗪 4、YQN-3、YQN-4、YQN-5

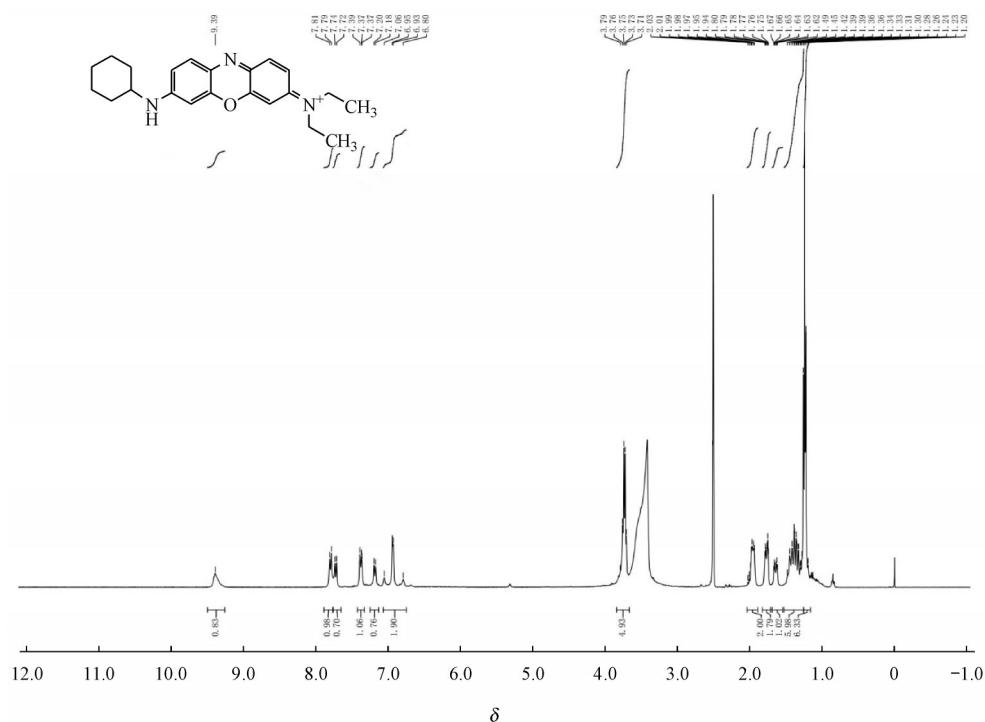


Figure 8  $^1\text{H}$  NMR spectra of YQN-6

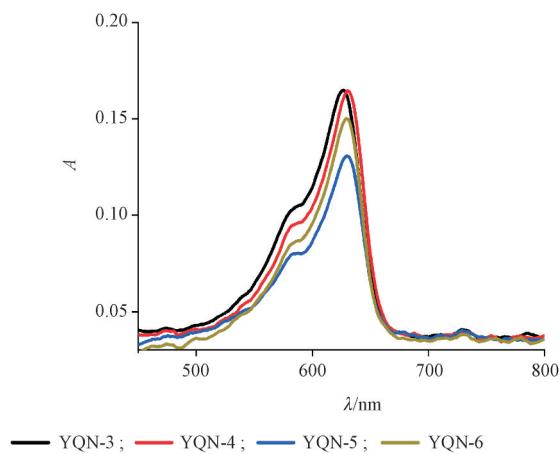


Figure 9 Absorption spectra of fluorescent dyes YQN-3–YQN-6

和 YQN-6 的大鼠臂丛神经和坐骨神经显像中, YQN-3 表现出最强的神经特异性, 具有最强的神经荧光信号和最低的背景吸收(脂肪和肌肉组织), 随着取代环烷基环的增大, 神经靶向能力减弱, 肌肉和脂肪分布增加。因此, 选 YQN-3 作为候选化合物做进一步研究。

### 3.4 YQN-3 在甲状腺再次手术中的成像

YQN-3 具有良好的神经靶向能力, 能很好地

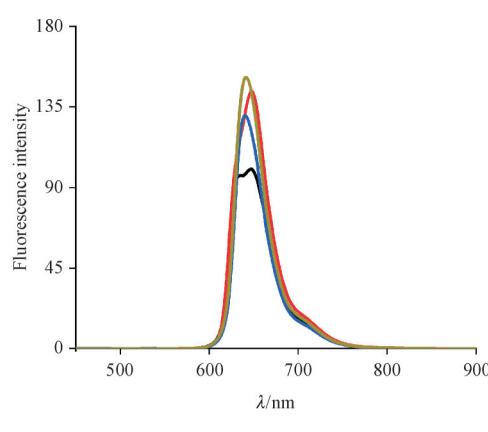
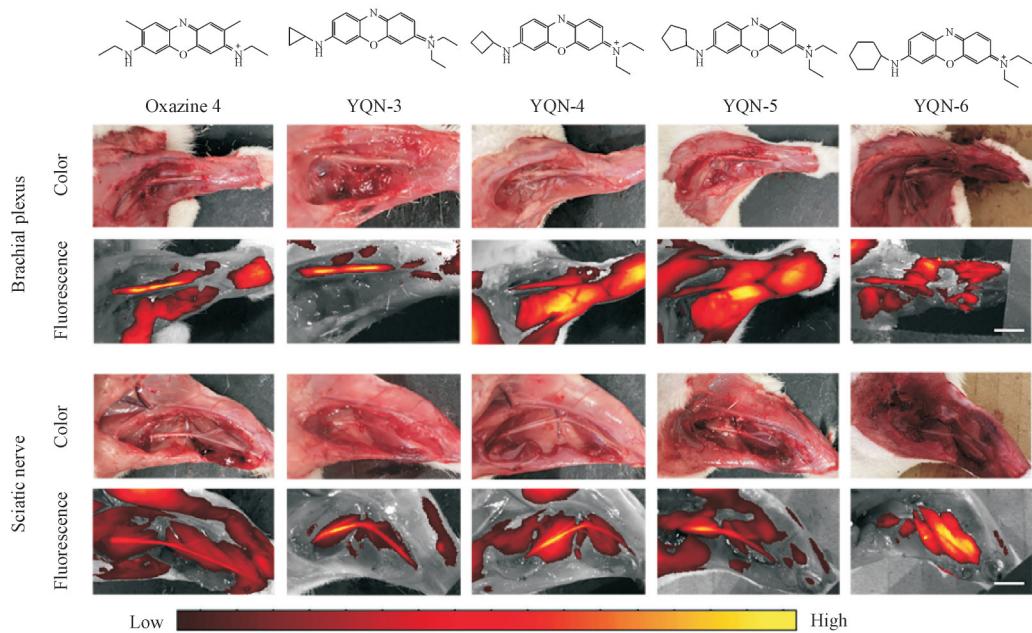
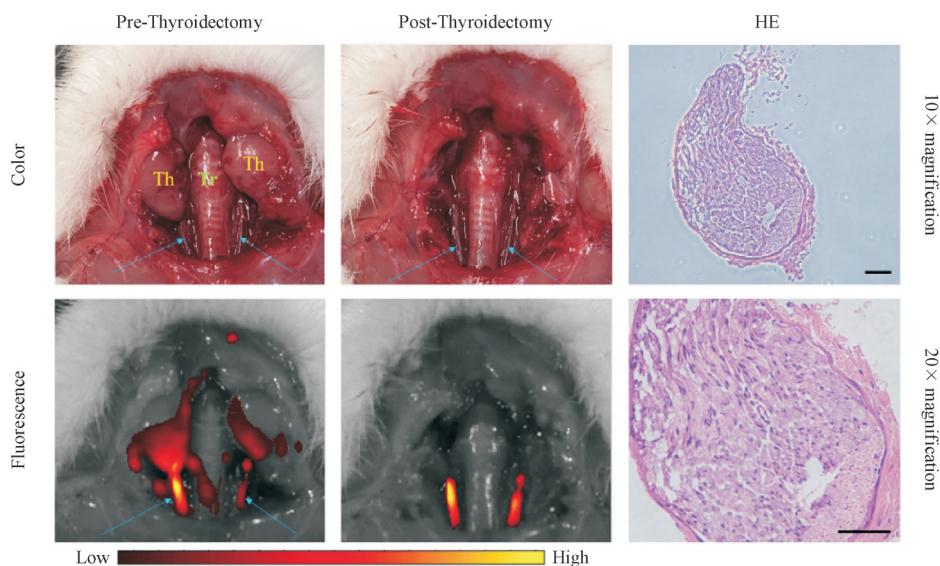


Figure 10 Emission spectra of fluorescent dyes YQN-3–YQN-6

显示神经组织, 可用于术中神经造影和检视。在甲状腺切除手术过程中, 甲状腺切除前后, 可以利用 YQN-3 对喉返神经进行检视, 能有效避免手术过程对神经造成损伤, 同时还能在术后对神经进行检视, 进行有效预后。最后, 将术后荧光信号部位进行切除, 经病理组织 HE 染色分析, 结果显示为神经组织。结果如图 12 所示。



**Figure 11** *In vivo* nerve imaging of oxazine 4, YQN-3, YQN-4, YQN-5 and YQN-6 (scale: 5 mm)



**Figure 12** Imaging of YQN-3 in thyroid operation

Th: Thyroid; Tr: Trachea, blue arrow indicates recurrent laryngeal nerve (scale: 200  $\mu\text{m}$ )

### 3.5 YQN-3 体外毒性研究

以噁嗪4为阳性对照,在0.01、0.05、0.1、0.2、0.3 mg/mL质量浓度范围内,在低于0.2 mg/mL质量浓度的YQN-3和噁嗪4几乎没有细胞毒性(细胞存活率均高于75%),结果如图13所示,因此,YQN-3具有良好的安全性,可进一步开发应用于临床神经显像。

### 4 结论与展望

本文设计并合成了4个噁嗪类荧光染料YQN-3~YQN-6,其结构经质谱、核磁氢谱确证;YQN-3等在630 nm左右有着最大吸收,在645 nm左右有最大发射波长。进一步在臂丛神经和坐骨神经显像中,YQN-3表现出最强的神经靶向能力和最低的背景吸收,还能用于甲状腺手术切除过程中,对

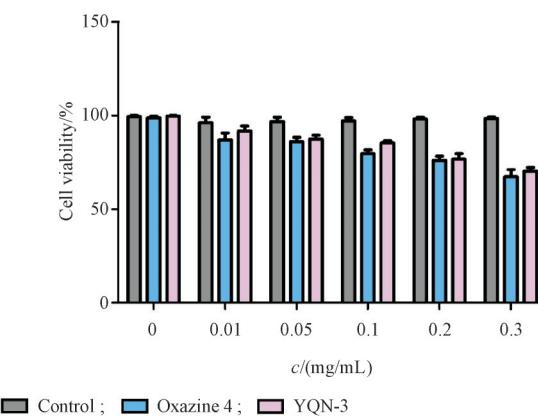


Figure 13 Cytotoxicity test of YQN-3 and oxazine 4 on U87 cells

神经组织进行有效检视和保护,同时具有良好的安全性,具有潜在的临床神经显像应用前景。

本研究工作仍有需要进一步研究加以改善的地方:(1)YQN-3 神经染料的发射波长较短,穿透深度有限。手术过程中先将神经解剖后才能有效成像,具有较大的局限性,无法契合临床需求,需提高神经染料的发射波长;(2)荧光探针的给药途径应根据探针的光学特性、成像系统的性能以及手术期间的实际情况仔细考虑。例如,在头颈部肿瘤切除过程中,需要突出显示所有神经,以避免任何神经损伤。但是,在某些情况下,如根治性前列腺切除术,不可能保留所有周围的神经组织;由于前列腺内广泛的神经荧光,全身系统性使用探针可能会降低最重要海绵体神经的信噪比。因此,在手术前需要合理评估选择最适合的给药途径来实现想要的识别和保留神经的效果。

## References

- [1] Barth CW, Gibbs SL. Fluorescence image-guided surgery—a perspective on contrast agent development [J]. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*, 2020, **11222**: 112220J.
- [2] Wallner C, Lange MM, Bonsing BA, et al. Causes of fecal and urinary incontinence after total mesorectal excision for rectal cancer based on cadaveric surgery: a study from the cooperative clinical investigators of the Dutch total mesorectal excision trial [J]. *J Clin Oncol*, 2008, **26**(27): 4466-4472.
- [3] Merlini L, Vargas MI, Anooshiravani M, et al. Look for the nerves! MR neurography adds essential diagnostic value to routine MRI in pediatric practice: a pictorial overview [J]. *J Neuroradiol*, 2011, **38**(3): 141-147.
- [4] 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.
- [5] Kermarrec E, Demondion X, Khalil C, et al. Ultrasound and magnetic resonance imaging of the peripheral nerves: current techniques, promising directions, and open issues [J]. *Semin Musculoskelet Radiol*, 2010, **14**(5): 463-472.
- [6] Peters TM. Image-guidance for surgical procedures [J]. *Phys Med Biol*, 2006, **51**(14): R505-R540.
- [7] 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.
- [8] Wu CY, Wei JJ, Tian DH, et al. Molecular probes for imaging myelinated white matter in CNS [J]. *J Med Chem*, 2008, **51**(21): 6682-6688.
- [9] Stankoff B, Wang YM, Bottlaender M, et al. Imaging of CNS myelin by positron-emission tomography [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(24): 9304-9309.
- [10] Wang CN, Wu CY, Zhu JQ, et al. Design, synthesis, and evaluation of coumarin-based molecular probes for imaging of myelination [J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(7): 2331-2340.
- [11] Glasgow HL, Whitney MA, Gross LA, et al. Laminin targeting of a peripheral nerve-highlighting peptide enables degenerated nerve visualization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(45): 12774-12779.
- [12] Gonzales J, Demetrio de Souza Franca P, Jiang Y, et al. Fluorescence imaging of peripheral nerves by a Nav1.7-targeted inhibitor cystine knot peptide [J]. *Bioconjugate Chem*, 2019, **30**(11): 2879-2888.
- [13] Barth CW, Gibbs SL. Direct administration of nerve-specific contrast to improve nerve sparing radical prostatectomy [J]. *Theranostics*, 2017, **7**(3): 573-593.
- [14] Chan WF, Lang BHH, Lo CY. The role of intraoperative neuro-monitoring of recurrent laryngeal nerve during thyroidectomy: a comparative study on 1000 nerves at risk [J]. *Surgery*, 2006, **140**(6): 866-872.
- [15] Park MH, Hyun H, Ashitate Y, et al. Prototype nerve-specific near-infrared fluorophores [J]. *Theranostics*, 2014, **4**(8): 823-833.
- [16] Osuchowski MF, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data [J]. *Muscle Nerve*, 2009, **40**(4): 610-616.
- [17] Xiang ZM, Nesterov EE, Skoch J, et al. Detection of myelination using a novel histological probe [J]. *J Histochem Cytochem*, 2005, **53**(12): 1511-1516.