第 49 卷第 3 期
2024 年 5 月

声 学 学 报
ACTA ACUSTICA

Vol. 49, No. 3
May, 2024

纪念王威琪院士诞辰 85 周年

秀丽隐杆线虫对声表面波刺激的行为响应*

谢林洲 龙天洋 郭霞生 章 东†

(南京大学声学研究所 南京 210093)

2023 年 5 月 14 日收到
2023 年 6 月 14 日定稿

摘要 利用频率为 8.8 MHz 的声表面波, 刺激位于压电基底上琼脂表面秀丽隐杆线虫, 研究其对超声作用的行为响应。具体地, 分析了超声刺激后线虫的转向和后退行为与声表面波辐照时长、基底振动幅度及脉冲重复频率的关系, 发现线虫对高频声表面波脉冲刺激的响应与此前低频体波刺激所得规律一致, 即类似于可感知脉冲重复频率的带通滤波器。通过比较温度感知缺陷突变体线虫与野生型线虫的行为, 明确了机械振动在诱发线虫响应中占据主导地位, 而超声热效应并非主要因素。在此基础上, 尝试通过信号时–空分布的调节改变声场形态, 研究线虫在声场中的趋避性, 进而实现对线虫转向行为的初步干预。

关键词 超声神经调控, 声表面波, 行为响应, 声场趋避性

PACS 数 43.80 **DOI:** 10.12395/0371-0025.2023072

Behavioral responses of *Caenorhabditis elegans* to surface acoustic waves

XIE Linzhou LONG Tianyang GUO Xiasheng ZHANG Dong†

(*Institute of Acoustics*, *Nanjing University* Nanjing 210093)

Received May 14, 2023
Revised Jun. 14, 2023

Abstract Surface acoustic waves (SAW) at a frequency of 8.8 MHz were used to stimulate the nematode *Caenorhabditis elegans* on an agar surface on a piezoelectric substrate to study its behavioral response to sonication. Specifically, the dependency of the turning and reversal behaviors of the nematodes on the sonication period, the vibration amplitude of the substrate, and the pulse repetition frequency (PRF) were analyzed. It was found that the response of the nematodes to the high-frequency SAW stimulation was in accordance with the pattern obtained from the previous low-frequency bulk-wave stimulation, i.e., it was similar to the band-pass filters in terms of PRF. By comparing the behavior of temperature perception-deficient mutant nematodes with that of wild-type nematodes, it was clarified that mechanical vibration was dominant in evoking nematode responses, while ultrasonic-thermal effects were not a major factor. On this basis, attempts were made to change the acoustic field distribution through modulating the driving signals to study the acoustic-taxis behavior of the nematodes, and then to realize the preliminary intervention on the reversal behavior of the nematodes.

Keywords Ultrasonic neuromodulation, Surface acoustic waves, Behavioral response, Acoustic-taxis

引言

超声波能够方便地将声能传递到深部脑组织[1], 且具有无创、无电离辐射等优势。已有研究表明, 超声刺激可有效激活哺乳动物的脑神经, 从而引发各种运动反应[2], 即通过外部超声刺激改变生物体的神经或行为活动是可能的。

神经调控研究一般依赖于大量的动物实验, 而哺乳动物不仅生长周期长, 其神经系统也非常复杂。秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 下称线虫) 的生长周期短, 易于在实验室培养, 且采

* 国家自然科学基金项目 (11974179) 资助
† 通讯作者: 章东, dzhang@nju.edu.cn

购和饲养的成本低廉[3]。尤为关键的是, 野生型雌雄同体线虫只有 302 个神经元, 其超过 60% 的基因与人类同源, 且其神经回路的物理连接图谱已被完全解构[4]。因此, 可基于线虫这一模型生物研究超声响应的神经回路问题。考虑上述, 本文中选择线虫作为实验对象。

目前已有线虫受机械刺激[5] 和用于超声神经调控[6] 的研究报道。Ibsen 等发现, 线虫对低强度脉冲超声刺激不敏感, 但局部声振动经微气泡放大后可激活线虫的 TRP-4 机械感知通道, 并诱发行为响应[7]。郑海荣等发现, 利用声表面波脉冲可直接诱发线虫的行为响应; 他们将这种响应的机制归因于超声的机械效应[8]。Kubanek 等的实验结论也支持这一观点, 他们发现线虫对超声的响应依赖于 MEC-4 机械感知离子通道, 并进一步给出了线虫最为敏感的超声参数: 占空比 (Duty Cycle, DC) 为 50%, 脉冲重复频率 (Pulse Repetition Frequency, PRF) 为 300 Hz~3 kHz[9]。

本文采用声表面波装置刺激线虫, 进一步探究线虫在声场中的行为响应[10]。声表面波由压电基底上的叉指换能器 (interdigital transducers, IDTs) 产生, 声能被限制在压电基底的表面附近[11]。通过调整声源位置和声场强度, 观察到线虫表现出一定的趋向性。这意味着未来或可通过调节超声信号参数或调整声场的空间分布来调控线虫的行为及行为响应, 为建立大型动物或人体神经系统的超声调节优化方案提供依据和借鉴。

1 材料和方法

1.1 线虫的培养和使用

实验中使用了野生型线虫 N2 和温度感知缺陷突变体 IK597 *gcy-23*(*nj37*)*gcy-8*(*oy44*)*gcy-18*(*nj38*)IV, 两种虫株均来自美国线虫遗传学中心 (Caenorhabditis Genetics Center)。线虫培养基 (nematode growth medium, NGM) 按标准方法配制[12]。每 1L 培养基中含 975 mL 蒸馏水、3.0 g NaCl、2.5 g 蛋白胨、1.0 mL 胆固醇 (以 5g/L 溶于 95% 乙醇) 和 22 g 琼脂。线虫的生长环境温度和实验温度均为 20 ℃。实验采用年轻成虫 (young adults, YA) 进行。线虫年龄同步通过人工选取实现: 挑取培养基上的 L4 阶段幼虫, 转移至新培养基上培养 10 小时, 待其发育为年轻成虫即可进行实验。

1.2 实验设计和流程

采用的实验装置如图 1(a) 所示。由计算机控制任意波形发生器 (33622, Keysight, 美国) 生成电信号; 将其通过射频功率放大器 (325LA, E&I, 美国) 进行 50 dB 功率放大后用于驱动叉指换能器, 后者产生的声表面波直接作用于琼脂块表面上的线虫。这里, 琼脂块的成分与线虫培养基类似, 但不含蛋白胨和胆固醇成分, 并添加了甲基蓝染料以提高成像对比度。图 1(b)(c) 分别给出了器件的俯视图和侧视图。

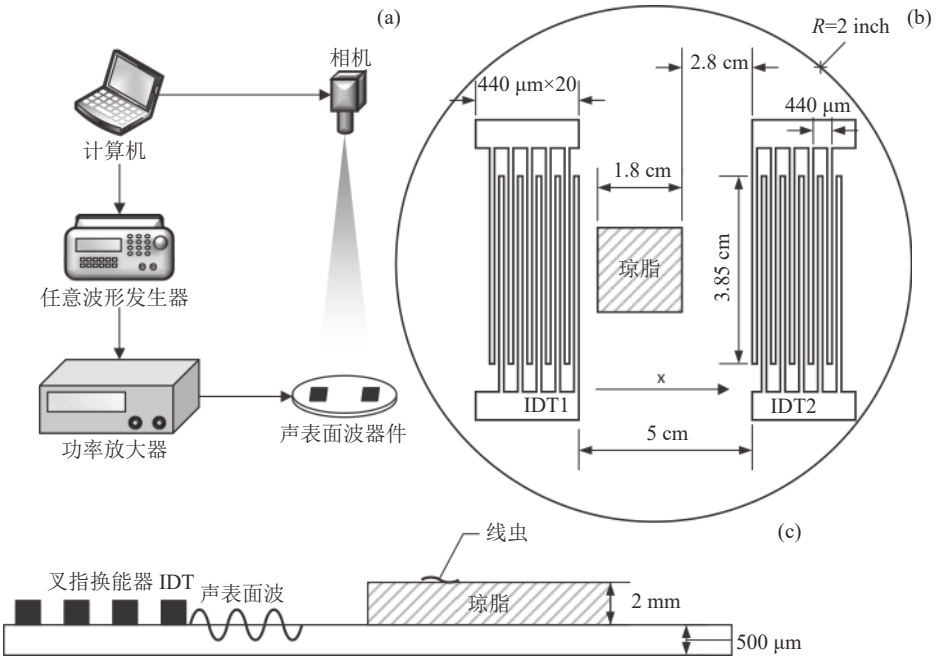

图 1 实验装置和声表面波器件 (a) 实验装置示意图; (b) 俯视图; (c) 侧视图

在器件周边搭建方形 (30 cm × 30 cm) 红色 LED 边框作为暗场光源, 在器件上方用相机 (BCE-B050-U, Mightex, 加拿大) 以 10 帧/秒的帧率记录线虫的行为。

每次实验仅对一只年轻成虫进行。具体步骤如下: 将一只年轻成虫转移到一块厚约 2 mm、面积约 1.8 cm × 1.8 cm 的琼脂块表面, 琼脂块所处位置如图 1(b)(c) 所示。待线虫自由活动 5 分钟后, 每 30 s 对其施加一次持续时间为 Δt (10 ms ≤ Δt ≤ 400 ms) 的超声刺激。同时, 用相机记录线虫的活动状态。每次实验中均使用新更换的琼脂块。须说明的是, 若琼脂太薄, 其透光性也会更好, 导致获取的图像对比度不佳。若选择更厚的琼脂, 则可能对声表面波产生更大的衰减。这里选择琼脂厚度为 2 mm, 是实验中多次尝试后的优选结果。

1.3　调幅波驱动信号

实验中采用调幅波信号激励叉指换能器, 具体形式分为两种: (1) 单次调幅波, 记为调幅波 1。如图 2 所示, 调幅波 1 为一个高频载波 $c(t)$ 被一个幅值介于 0~1 之间、占空比为 50% 的方波 $m(t)$ 进行幅度调制后得到; (2) 三次调幅波, 记为调幅波 2: 在调幅波 1 的基础上, 再进行两次不同频率、占空比为 50% 的方波调制。调幅波 1 事实上即与 Kubanek 等采用的信号类似, 调制频率与其脉冲重复频率等同, 而占空比固定为 50%。对于调幅波 2, 其一方面体现了调幅波 1 对应的重复频率, 另一方面也将平均功率降低为调幅波 1 的 1/4。

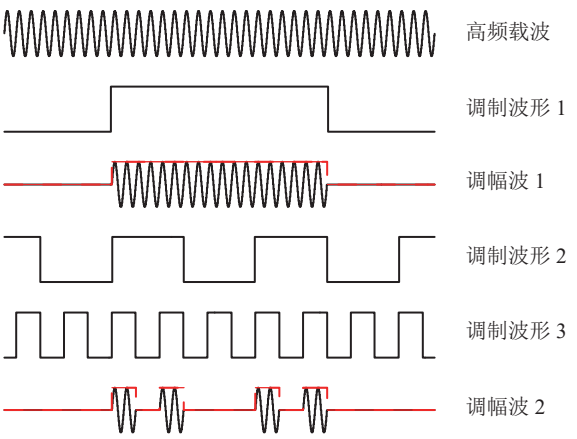

图 2　调幅波信号的构建 (红色虚线为信号的上包络)

1.4　叉指换能器的制备

叉指换能器基于微加工技术制备, 通过标准的剥离工艺 (lift-off 工艺) 将厚度为 150 nm 的金电极溅射到厚 500 μm 的铌酸锂衬底 (128° *YX*-$LiNbO_3$) 上, 电极宽度和间隔均为声表面波波长的 1/4。采用中心频率为 8.8 MHz 的平直型 IDTs, 其电极宽度和间隔均为 110 μm, 对应的声表面波波长为 440 μm。该频率与 Kubanek 等采用的频率 (10 MHz) 接近[9], 比 Zhou 等采用的频率 (28.11 MHz) 更低[8]; 但是总体而言, 所采用的 3 个频率对应的波长都远大于常见神经元的尺寸。因此, 若此处获得的结果与他们的结论相近, 则可证明相关结论在较宽频率范围内具备一定的普适性。

1.5　SAW 振幅和热效应测量

使用激光测振仪 (OFV-505, Polytech, 德国) 测量铌酸锂基底表面的离面位移振幅。其中, 考虑到铌酸锂的光学透明性质, 在基底表面、琼脂覆盖的区域制备不透明的、覆盖有金膜的测试点 (由磁控溅射技术制备), 以避免基底下表面反射激光信号导致的干扰。测量数据由示波器 (DOS9064A, Keysight, 美国) 采集, 再传输到计算机进行分析。

在温度测量实验中, 超声波发射和温度数据采集是同步的。将直径为 0.25 mm 的热电偶探针 (TJ72-CASS-010G-4, Omega, 美国) 插入琼脂块内, 再将探针连接到数据采集模块 (NI 9214, National Instruments, 美国), 通过 LabVIEW(National Instruments, 美国) 程序记录琼脂块中的温度变化。

1.6　行为分析

采用 LabVIEW 和 MATLAB (MathWorks, 美国) 程序联合量化分析线虫的行为。对于线虫的“Ω”转身 (Omega Turn)、后退 (Reversal) 和转身概率 (Turning Rate) 的量化, 均参考了前人的方法[13-14]。每次实验中对线虫施加 $N = 10$ 次超声刺激, 记第 i ($i = 1, \cdots, N$) 次刺激的开始时刻为 t_i, 分别提取 $t_i - 2$ s 至 t_i s 和 $t_i + 0.25$ s 至 $t_i + 2$ s 两个时间窗内线虫的平均速度矢量, 并计算这两个矢量的差, 记为 $\Delta \boldsymbol{v}_i$。将上述两个时间窗分别前移 2 s, 重复以上步骤, 得到 $\Delta \boldsymbol{v}_{i,0}$。若 $\Delta \boldsymbol{v}_i$ 与 $\Delta \boldsymbol{v}_{i,0}$ 存在显著性差异 ($p < 0.05$, t 检验), 则记录一次超声响应。统计超声响应次数占辐照次数 ($N = 10$) 的比例, 记为线虫的响应概率 (Response Rate)。此外, 若线虫在 $t_i \sim t_i + 2$ s 时间内发生了“Ω”转身 (或后退) 行为, 则将发生转身行为 (或后退行为) 的次数占超声辐照次数的比例记为转身 (或后退) 对应的响应概率。

2　实验结果

2.1　线虫对超声刺激的行为响应

单次实验中采用的超声辐照参数为: 持续时间

200 ms, 辐照间隔 30 s, 辐照次数 $N = 10$。通过 IDT1 向线虫发射调幅波 1, 载波频率 $f = 8.8$ MHz, 脉冲重复频率 $f_{PRF} = 1$ kHz, 占空比 50%, 器件声表面波位移振幅 $A = 4$ nm (加载在叉指换能器上的电功率约 1.2 W)。下文中若无特别标明, 均采用相同参数, 且各实验组所采用的线虫数量 $n \geqslant 10$。需要指出的是, 考虑到琼脂的高含水量 (约 98%), 其声学性质可近似认为与水一致。这里可以粗略地认为此类凝胶的声学性能与水等同, 其在声表面波传播距离不远时并不导致严重的声衰减。因此, 琼脂表面的声压可大致估算为 $p = 2\pi\rho_0 c_0 f A \approx 0.33$ kPa。这里采用了水的密度 $\rho_0 = 1000$ kg/m^3 和声速 $c_0 = 1500$ m/s.

图 3(a) 给出了线虫在超声作用前后的平均运动速率随时间的变化。线虫在受到超声刺激后, 爬行速率快速增加。尽管超声作用只持续了 200 ms, 但线虫运动速率在此后的 2 s 内均保持在较高水平, 相比刺激前增加了 50~100 μm/s。随后, 线虫的运动速率下降至低谷 (约 80 μm/s), 再缓慢回升 (至约 130~150 μm/s), 且略高于超声辐照前的水平 (约 100~120 μm/s)。

对应地, 图 3(b) 给出了线虫运动时的平均加速度大小。显然, 加速度大小也在超声作用后立即增加, 随后回落至低点, 然后再恢复到经受刺激前的水平。这说明线虫可能发生了“Ω”转身或后退行为, 图 3(c) 示意了这两种典型的行为响应。统计分析表明, 后退行为的发生概率显著高于“Ω”转身行为, 如图 3(d) 所示。

2.2 超声参数对线虫响应概率的影响

在明确线虫能够响应调幅波超声刺激后, 有必要进一步探究行为响应与超声参数之间的关系。为此, 采用调幅波 1 进行实验。应当明确的是, 调幅波 1 中的调制频率实际上等效于信号的脉冲重复频率 (f_{PRF})。实验结果表明, 线虫的响应概率与超声强度正相关。如图 4(a) 所示, 当铌酸锂基底表面位移振幅 $A \approx 3$ nm 时, 线虫响应较弱 (响应概率约为 0.1)。随着超声强度的增大, 线虫的响应概率也不断上升。当 $A \approx 10$ nm 时, 线虫的响应概率显著提高 (响应概率达到约 0.6)。

图 4(b) 中, 线虫的响应概率随着超声辐照时长

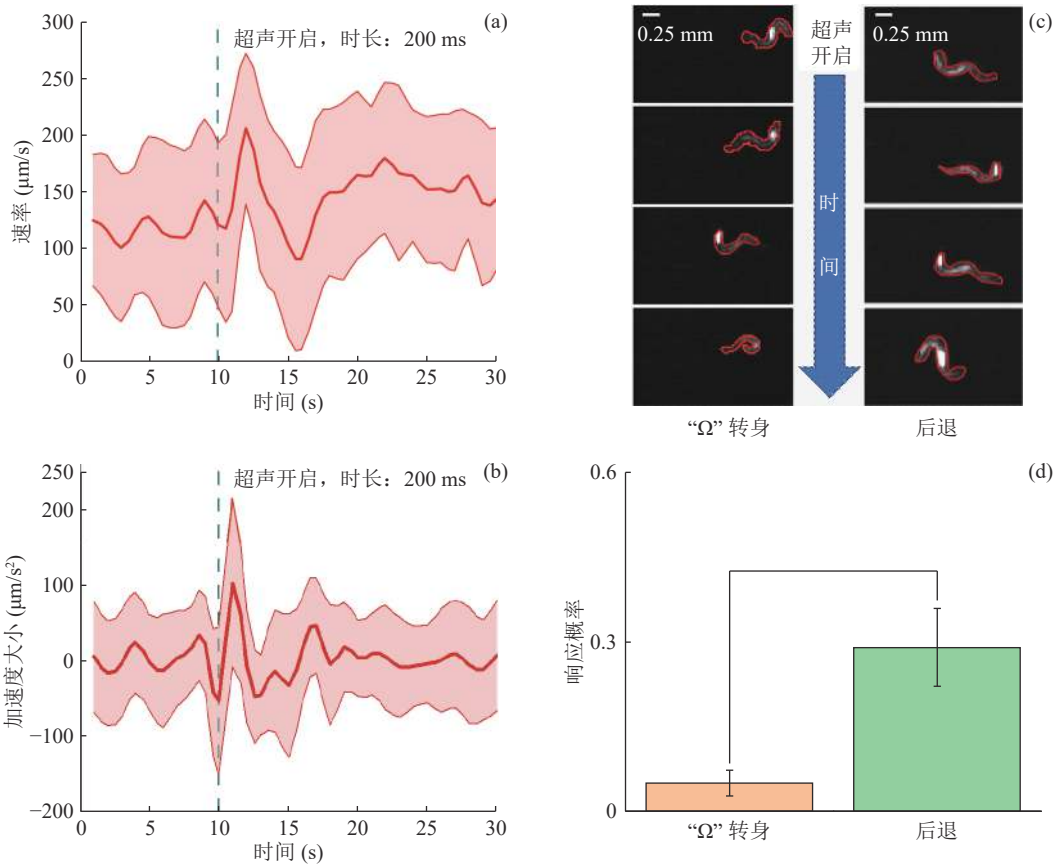

图 3 线虫的超声响应 (a) 野生型线虫的爬行速率 (平均值±标准差) 随时间的变化; (b) 线虫加速度大小 (平均值±标准差) 随时间的变化; (c) 超声刺激后 2 s 内发生的典型“Ω”转身 (左) 和后退 (右) 行为; (d) 线虫行为响应类型的比例 (平均值±标准差), **表示组间存在显著性差异, $0.001 < p < 0.01$, t 检验, $n = 10$

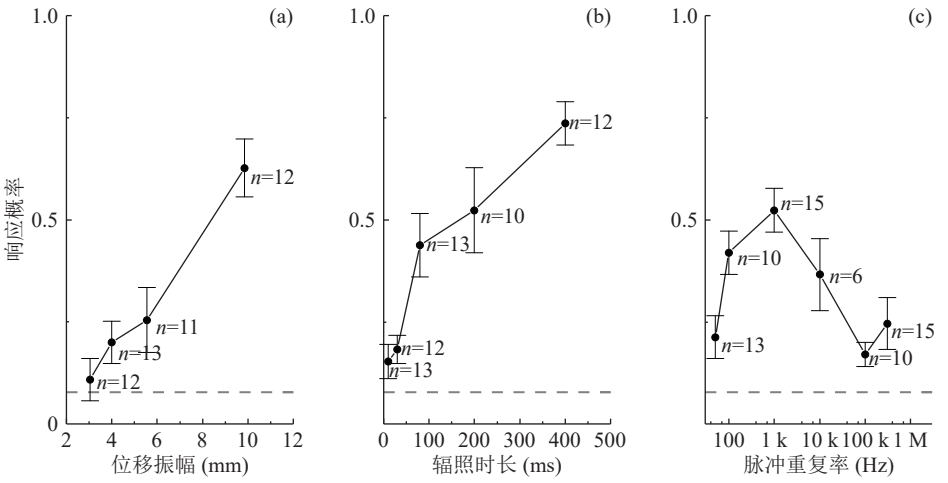

图 4　线虫在不同超声参数下的响应概率 (平均值±标准差), 其中虚线表示无超声对照组的平均水平, 载波频率 f = 19.9 MHz (a) 响应概率与超声强度 (用位移振幅表征) 的关系, 脉冲重复频率 f_{PRF} = 1 kHz, 辐照时长为 200 ms; (b) 响应概率与辐照时长的关系, 脉冲重复频率 f_{PRF} = 1 kHz, 振幅 A = 7 nm; (c) 响应概率与脉冲重复频率的关系, 辐照时长为 200 ms, 振幅 A = 7 nm

而增加, 这与 Kubanek 等的发现是一致的[9], 即线虫的响应概率与辐照时长呈正相关。注意到当 Δt = 10 ms 时, 仅 15.4% 的线虫对超声刺激产生了响应; 而在 Δt = 80 ms 时, 响应超声刺激的线虫占比达到 34.6%; 继续增加辐照时长至 Δt = 400 ms, 该比例提高至 70.1%。

此外, 如图 4(c) 所示, 当脉冲重复频率的范围在 50 Hz~1 kHz 时, 线虫的响应概率随着 f_{PRF} 的增大而增加; 此后, 响应概率则随着 f_{PRF} 的继续增加而下降。这与 Kubanek 等的实验结论也是接近的, 该研究发现线虫对 300 Hz~3 kHz 范围内的脉冲重复频率最为敏感[9]。考虑到本文实验中采用的脉冲重复频率与其不完全一致, 可以认为两种不同实验条件下观察到的规律基本一致。

2.3　热效应不是线虫响应超声的主导因素

超声作用于生物组织时, 不仅产生机械效应, 还会产生热效应。为此, 实验过程中测量了琼脂块表面的温度变化。当单次超声辐照时长为 200 ms, 两次辐照间隔为 30 s 时, 测得温升不超过 0.5 ℃。但考虑到线虫对温度的变化非常敏感, 甚至可能感受到约 0.2 °C 的温度变化[15], 实验中还测试了温度感知突变体 IK597 线虫的超声响应。尽管 IK597 线虫具有完整的 AFD 热感受器神经元, 但其缺乏感知温度微小变化的能力[16]。

图 5 是野生型线虫和突变体 IK597 线虫的超声响应对比。其中, 图 5(a) 中给出线虫存在其中特定一种行为 (“Ω”转身或后退) 的响应概率, 图 5(b) 中给出总体响应概率 (响应次数占辐照次数的比例)。结果表明, 温度感知缺陷的突变体 IK597 与 N2 的各种

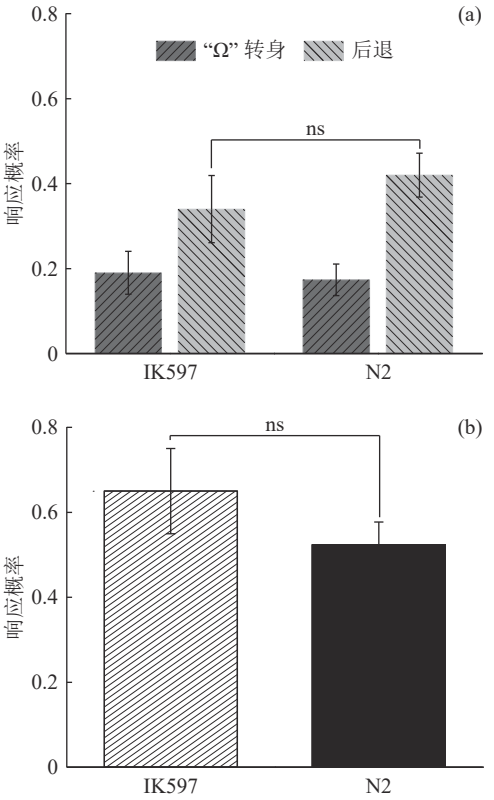

图 5　温度感知缺陷突变体 IK597 的超声响应, 野生型线虫 N2 (n = 10) 和 IK597 (n = 10) 线虫 (a) “Ω”转身和后退响应概率及 (b) 总体响应概率的比较

行为响应概率均没有显著差异。因此, 可认为超声诱导线虫的行为响应与线虫感知微小热波动的能力无关。换言之, 线虫超声响应并非超声热效应主导的, 这与 Zhou 等的观点一致[8], 该研究在用 28.11 MHz 声表面波刺激线虫时, 成功地诱发了线虫的后退行为, 并指出热感受神经元 AFD 没有被有效激活。

2.4 线虫在声场中的趋避性

考虑到线虫响应依赖于超声刺激的强度, 有理由推测线虫可能对超声刺激存在趋避性。为此, 对线虫施加来自不同方向的声场刺激, 观察线虫的响应。图 1(b) 中定义了 x 轴方向, 当线虫向 $+x$ 或 $-x$ 方向运动时, 其在 x 方向的速度分别定义为正值或负值。当 IDT1 或 IDT2 单独工作时, 声源分别位于 $-x$ 和 $+x$ 方向。

利用调幅波 1 进行实验, 并统计线虫沿 x 方向的运动速率。如图 6(a) 所示, $t = 0$ 时, 超声从 IDT1 发射, 线虫表现出背离声源方向运动的趋势 (运动速度为正)。但经过约 20 s 后, 运动方向又朝向声源方向 (运动速度为负), 说明在短时超声刺激 (辐照时长不足 1 s) 下, 线虫对超声刺激的趋避性并不显著。该过程中, 线虫先背离声源方向再朝向声源方向运动; 朝向声源方向运动时, 其可能已经对声场产生了一定程度的适应性。

进一步测试了线虫对调幅波 2 的超声响应。构建调幅波 2 时, 第 2 次和第 3 次调制采用的频率分别为第 1 次调制频率 (即 f_{PRF}) 的 2 倍和 4 倍。实验中, 采用的脉冲时长为 200 ms, 基底表面振幅 $A = 7$ nm。如图 6(b) 所示, 在调幅波 1 和调幅波 2 两种形式的超声信号作用下 (均由 IDT1 发射), 前者导致的响应概率较高 (图中, 用 OR 表示总体响应概率, 与此前定义相同; HR 是仅由速度矢量计算出的响应概率, 其中不包括“Ω”转身及后退行为)。但是, “Ω”转身和后退行为的发生概率在两类信号的驱动下并未表现出显著性差异 (p>0.05, t 检验, $n = 10$), 如图 6(c) 所示。这表明调幅波 2 可有效诱导线虫行为响应。

考虑到长时超声刺激可能会产生较强的热效应, 实验采用调幅波 2 进行, 以降低超声信号的平均功率。具体地, 由于调幅波 2 在调幅波 1 的基础上又进行了两次调制, 每次的占空比均为 50%, 因此其平均功率应为调幅波 1 的 1/4。与此同时, 鉴于温度感知缺陷突变体 IK597 的超声响应与 N2 没有显著差异 (见图 5), 选用 IK597 线虫进行长时超声辐照实验。

实验分两组进行: 组 A 中, IDT2 持续发射声表面波 (0~15 s), 随后 IDT2 关闭 (15~60 s); 组 B 中, IDT1 和 IDT2 均持续发射 (0~15 s), 随后 IDT1 停止工作 (15~30 s), IDT2 继续发射声表面波; 最后关闭 IDT2 (30~60 s), 线虫不再受超声刺激。换言之, 组 B 中的线虫首先受到来自两侧 IDT 的声场作用, 然后仅受单侧 IDT 的声场作用。

图 7 给出野生型线虫和 IK597 突变体在 x 方向上的位置随时间的变化情况。可见, 野生型线虫 (N2) 在长时声场中并未表现出明显的趋避性, 其在声场中 x 方向的位置基本不随时间变化。作为比较, 组 A 和组 B 中的 IK597 线虫则均表现出一定的声场趋避性: 随着时间的进行, 10 s 后线虫在 x 方向的位置趋向于远离声源 IDT2, 偏移距离分别达到了约 0.4 mm 和 0.5 mm。这意味着线虫可能对空间声场的分布敏感: 当空间仅存在单个声源时, 其运动存在避离声源的倾向; 而当多个声源存在时, 其运动趋势受到各声源强度的影响, 倾向于避离最近的声源。这里虽然观察到了线虫的趋避行为, 但该现象还是较为微弱, 这可能与采用的刺激参数并非最优有关。以上仅是针对长时刺激且基于 IK597 线虫得出的初步结论。线虫在声场中的运动模式是复杂的, 具体机制有待进一步研究。

2.5 线虫在时变声场中的行为

线虫在背离声源方向运动的过程中, 势必表现出较低的转身概率 (TR); 而在无序运动过程中, 转身概率则较高。因此, 若线虫存在背离声源运动的趋避性现象, 在声源强度随时间变化的声场中, 随着超声强度降低, 线虫的转身概率应降低; 若线虫在声场中做无序运动, 则转身概率不应降低。

为此, 实验中构建声源强度随时间变化的声场, 统计线虫在时变声场中的运动变化。在声场减弱实

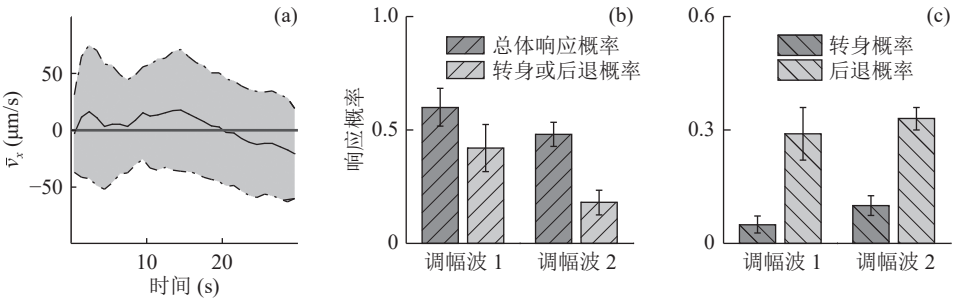

图 6 线虫在短时声场 (超声辐照时长不足 1 s) 中的趋避性 (a) x 方向运动速率随时间的变化; (b) 两种调幅波信号下 IK597 线虫的响应概率; (c) “Ω”转身及后退行为的占比 (两种刺激下, 均采用 $n = 10$)

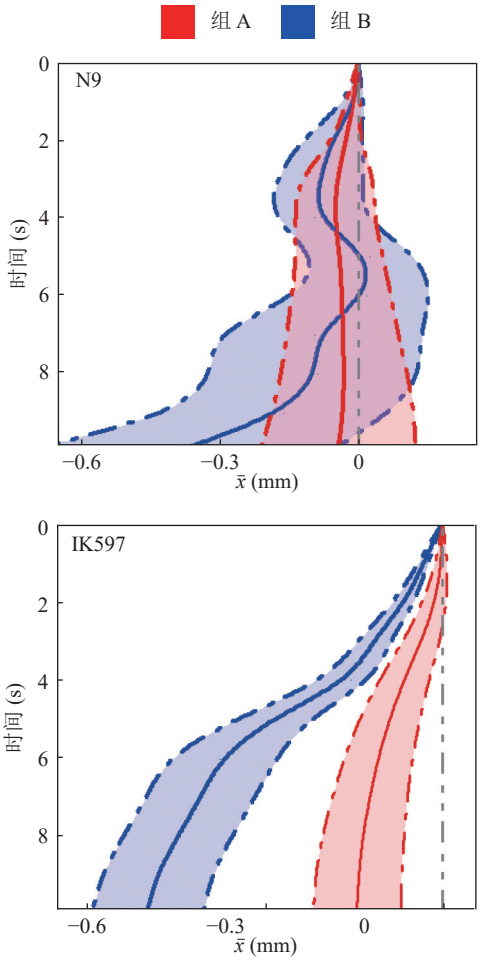

图 7　N2 和 IK597 线虫在长时声场中的趋避性 (红色表示组 A 中线虫在 x 方向上的位置, 蓝色代表组 B 的情况; 两组实验中, 均有 $n = 10$)

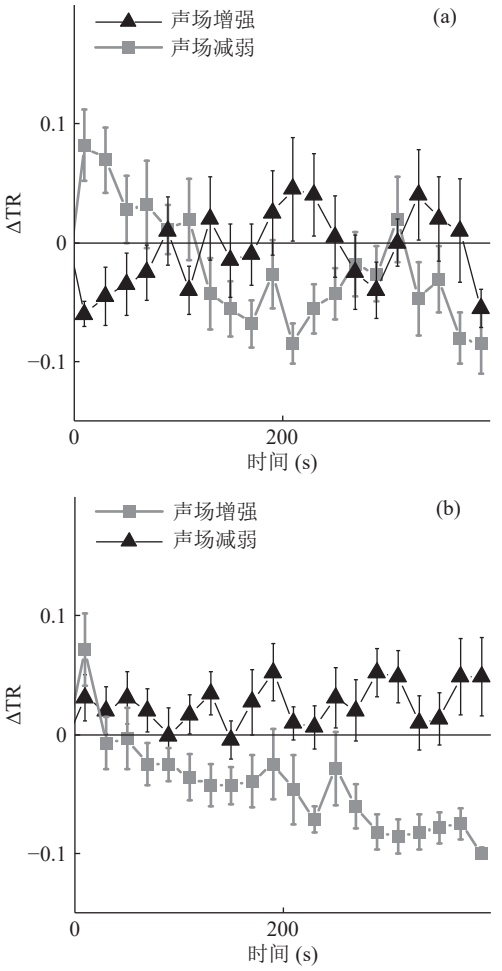

图 8　线虫在时变声场中的转身概率 (a) N2; (b) IK597 (两组实验中, 均有 $n = 10$)

验组中, 基底表面的振动幅度随时间线性递减, 由 IDT2 于 $t = 60$ s 时刻开始产生调幅波 1, 持续时间 400 s, 振幅从 10 nm 逐渐减小至 0; 而在声场增强实验组, 振幅从 0 逐渐递增至 10 nm。

如图 8(a) 所示, 声场减弱实验组中, 野生型线虫 (蓝色线) 在超声刚入射时 ($t = 60$~100 s) 表现出较高的转身概率; 此后, 转身概率逐渐下降, 保持在相对较低的水平。而在声场增强实验组 (红色线), 线虫的转身概率有明显的升高趋势。类似地, 温度感知缺陷突变体 IK597 也存在同样的转身概率变化规律 (图 8(b))。这意味着当声源强度降低时, 线虫并不积极改变运动方向; 而当超声强度升高时, 线虫积极地探索新的方向以远离超声, 表现出对声源的趋避性。但需要指出的是, 本文对于线虫在声场中趋避性的研究仍是非常初步的。例如, 尽管图 7 中两组线虫的横向位置存在差异, 但差异并不大。同时, 图 8 中的现象也并不显著。因此, 尽管线虫可能表现出对声源的趋避性, 但当前采用的声学参数对于趋避性未必是最优的。在未来工作中, 有必要进一步开展体系性的参数化研究。

3　讨论

超声神经调控的生物机制至今尚不明确, 秀丽隐杆线虫能够感知微小的热波动和机械刺激[16-17], 是神经科学研究中的优秀模式生物。本文实验结果表明, 线虫对超声刺激敏感, 主要表现为“Ω”转身和后退行为。线虫的响应概率与超声辐照强度、时长、频率及脉冲重复频率等参数有关。其中, 线虫的响应概率在 $f_{PRF} = 1$ kHz 时最强, 说明线虫对高频脉冲超声的响应可能类似带通滤波器。该结论与 Kubanek 等的发现[9] 基本一致。但是, 鉴于本文声波频率 (8.8 MHz) 与该研究采用的频率 (10.0 MHz) 不同, 且本文波动加载形式 (声表面波) 与其实验中采用的 (体波) 也不同, 可以认为所得结论具有一定的普遍性。热敏缺陷突变体 IK597 对超声刺激的响应与 N2 线虫没有显著差异, 这进一步说明超声热效应

并非线虫对超声刺激产生行为响应的主导因素。这与 Zhou 等的研究结论相近: 该实验中, 温升不超过 0.5 ℃ 时, 温度感知缺陷突变体 *tax*-4 与野生型线虫的超声响应没有显著差异[8]。基于上述现象, 有理由推测机械效应是引发线虫超声响应的主要原因。事实上, 由于凝胶状的琼脂中无法产生声流, 影响线虫行为的物理机制很可能是声辐射力或者调幅波信号表现出来的千赫兹频率的周期性; 其中具体的机制还有待后续研究。

此外, 实验中还发现线虫对声源存在趋避性, 主要表现为朝回避声源方向运动。在强度变化的声场下, 线虫的转向运动可以被激发或抑制。实际上, 除声场趋避性外, 已有研究表明尽管线虫缺乏形态学上的光感器官[12], 却能够表现出避光行为, 这有利于其在黑暗的土壤中生存[18]。Kocabas 等发现, 通过不断给线虫输送异戊醇蒸气, 能够降低线虫的后退和转向行为[19]。

但在强度梯度下降的声场中, 线虫的转向概率仍然高于无超声场的情况。一个可能的原因是, 目前实验中采用的换能器难以准确地刺激线虫的单个神经元, 可能同时激活了线虫身体内的多个可感知超声的神经元。而上述现象正是多个神经元共同作用的结果。若要进一步确认线虫各个部分对超声响应的贡献, 须构建更加精确的声场来刺激线虫的特定部位。例如, 一种可能的方式是构建高频、聚焦的声表面波场, 在较高的时间精度下选择性地作用于线虫身体的不同部位。

线虫存在很多类似的对于特定环境的趋避行为[20-21]。例如, 其运动方向与温度梯度[22]或化学浓度梯度有关[23]; 在氯化铵的作用下, 线虫会朝向化学浓度上升的方向运动。在线虫的学习行为研究中也发现了类似的现象, Qin 等在一个微流腔迷宫中观察到经训练的线虫会趋向向原本存在食物的方向前进[24]。线虫对各种气味剂和水溶性化学吸引剂 (如 NaCl) 同样存在趋向性[25], 主要表现为两种模式: 平行或垂直于化学梯度方向[26]。而在趋化剂浓度降低的气味场中, 线虫表现为无序运动[23]。Kocab 等研究指出, 化学气味成分通过激活线虫的神经系统, 调控线虫趋化过程中的运动转向及其频率[19]。基于这些发现, 在今后的研究中, 可以通过改变超声刺激的方式, 来抑制或者增强线虫的特定行为, 以实现对其活动的进一步干预。例如, 基于本文线虫趋避性的发现, 或许可以通过调节声源的强度变化, 诱导受治疗者对特定刺激的配合程度。同时, 在对特定神经核团直接施加超声刺激时, 为避免热效应导致组织损伤, 可以采取多次调幅信号的形式 (如文中的调幅波 2) 来降低超声功率。

4 结论

野生型线虫 (N2) 的行为响应与超声辐照时长和声压强度正相关, 且对特定脉冲重复频率 (1 kHz) 敏感。温度感知缺陷突变体线虫 (IK597) 与野生型线虫的超声响应概率没有显著性差异, 因此超声热效应对线虫响应超声的过程基本无影响。此外, 线虫表现出一定程度的声场趋避性, 即趋向于回避声源方向。上述发现为线虫的超声操控建立了基础, 并可为其他超声神经调控研究提供参考。

参 考 文 献

1 殷宇昕, 阎守国, 黄娟, 等. 经颅超声聚焦方法和声场特性研究. 声学学报, 2023; **48**(1): 162−172

2 郑海荣, 蔡飞燕, 严飞, 等. 多功能生物医学超声: 分子影像、给药与神经调控. 科学通报, 2015; **60**(20): 1864−1873

3 刘倩, 范誉川, 刘重慧, 等. 模式生物秀丽隐杆线虫在肠道菌群研究中的应用. 生命科学, 2019; **31**(1): 74−79

4 王亚辉. 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)—一个研究神经系统的最简单模型. 中国神经科学杂志, 2000; **16**(1): 60−64

5 吴金晶, 任婧, 王煜, 等. 以秀丽线虫为模式生物的机械痛研究进展. 中国疼痛医学杂志, 2013; **19**(2): 106−109

6 张阳, 罗林姣, 郭霞生, 等. 声振动对秀丽隐杆线虫转向行为的影响. 科学通报, 2016; **61**(Z1): 536−542

7 Ibsen S, Tong A, Schutt C, *et al*. Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Comm.*, 2015; **6**: 8264

8 Zhou W, Wang J J, Wang K Y, *et al*. Ultrasound neuro-modulation chip: Activation of sensory neurons in *Caenorhabditis elegans* by surface acoustic waves. *Lab Chip*, 2017; **17**(10): 1725−1731

9 Kubanek J, Shukla P, Das A, *et al*. Ultrasound elicits behavioral responses through mechanical effects on neurons and ion channels in a simple nervous system. *J. Neurosci.*, 2018; **38**(12): 3081−3091

10 赵秉珍, 罗林姣, 温泉. 一套用于秀丽隐杆线虫多感觉信息整合机制研究的行为学系统. 中国科学技术大学学报, 2021; **51**(5): 353−359

11 程曦, 徐晓东, 刘晓峻. 利用激光超声研究功能梯度材料中声表面波的传播特性. 声学学报, 2011; **36**(2): 145−149

12 Brenner S. Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1974; **77**(1): 71−94

13 Eastwood A L, Sanzeni A, Petzold B C, *et al*. Tissue mechanics govern the rapidly adapting and symmetrical response to touch. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015; **112**(50): E6955−E6963

14 赵娜, 任长虹, 刘虎岐, 等. 秀丽隐杆线虫学习行为研究方法. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2009; **37**(11): 55−61

15 Mohammadi A, Rodgers J B, Kotera I, *et al*. Behavioral response of *Caenorhabditis elegans* to localized thermal stimuli. *BMC Neurosci.*, 2013; **14**: 66

16 Ramot D, MacInnis B L, Goodman M B. Bidirectional temperat-

ure-sensing by a single thermosensory neuron in *C. elegans*. *Nat. Neurosci.*, 2008; **11**(8): 908−915

17 李慧慧, 朱曼, 李玉宏, 等. 秀丽隐杆线虫 Wnt 途径异常对机械感知神经元的影响. 中国科学: 生命科学, 2019; **49**(7): 916−920

18 王从丽, 李春杰, 胡岩峰. 利用 Pluronic 三维胶系统研究植物寄生线虫的趋化性. 土壤与作物, 2016; **5**(1): 1−13

19 Kocabas A, Shen C H, Guo Z C V, *et al*. Controlling interneuron activity in *Caenorhabditis elegans* to evoke chemotactic behaviour. *Nature*, 2012; **490**(7419): 273−277

20 薛雅丹, 康利军. 感觉神经元交互抑制调控秀丽线虫回避行为的发生. 中国科学: 生命科学, 2015; **45**(4): 413−414

21 邹伟, 王琦, 林容, 等. 秀丽隐杆线虫病原逃避行为调控的分子机制研究进展. 云南大学学报 (自然科学版), 2018; **40**(6): 1277−1282

22 Luo L J, Cook N, Venkatachalam V, *et al*. Bidirectional thermotaxis in *Caenorhabditis elegans* is mediated by distinct sensorimotor strategies driven by the AFD thermosensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2014; **111**(7): 2776−2781

23 Pierce-Shimomura J T, Morse T M, Lockery S R. The fundamental role of pirouettes in *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *J. Neurosci.*, 1999; **19**(21): 9557−9569

24 Qin J H, Wheeler A R. Maze exploration and learning in *C. elegans*. *Lab Chip*, 2007; **7**(2): 186−192

25 Iino Y, Yoshida K. Parallel use of two behavioral mechanisms for chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 2009; **29**(17): 5370−5380

26 Soh Z, Sakamoto K, Suzuki M, *et al*. A computational model of internal representations of chemical gradients in environments for chemotaxis of Caenorhabditis elegans. *Sci. Rep.*, 2018; **8**: 17190