

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：超声调控海马神经元兴奋性的动力学机制研究

姓 名：卢艺萱 学 号：21300220017

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学（强基计划）

指导教师：薛磊 职 称：教授

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2025 年 5 月 13 日

超声调控海马神经元兴奋性的动力 学机制研究

完成人

卢艺萱

指导小组成员

薛磊 教授

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、前 言.....	1
1.1 研究背景	1
1.2 研究内容概述.....	2
二、材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.2 实验试剂.....	3
2.2.1 商品试剂.....	3
2.2.2 自配试剂.....	4
2.3 实验仪器.....	6
2.4 实验方法	6
2.4.1 大鼠海马神经元的分离与原代培养.....	6
2.4.2 全细胞膜片钳记录.....	7
2.4.3 钙成像.....	8
2.5 数据处理	8
三、研究结果.....	10
3.1 超声刺激条件筛选	10
3.2 超声对海马神经元兴奋性的精细调控动力学	11
3.2.1 超声促进海马神经元自发动作电位发放.....	11
3.2.2 超声增强海马神经元突触传递过程.....	13

3.3 超声刺激通过钙依赖的方式调控神经元兴奋性	15
四、讨 论.....	19
参考文献.....	21
致 谢.....	24

摘要

超声神经调控在神经系统疾病治疗中展现出潜力，已有研究表明，超声可提高神经元兴奋性，改善中枢神经系统功能，但其内在调控机制尚未明确。驻波 (standing wave) 形式的声表面波 (surface acoustic wave, SAW) 超声是一种无损的神经调控技术，被广泛应用于神经元、脑片生理功能调控实验中。本课题选取原代培养的大鼠海马神经元为实验材料，利用集成化 SAW 超声换能器在刺激过程中同步记录培养海马神经元的电生理活动与钙成像信号，系统探究超声刺激对神经元兴奋性与突触传递的调控作用及其分子机制。

我们的研究结果发现，低强度短期超声刺激能够显著提高神经元兴奋性，神经元对超声的响应可分为快速激活的即刻响应、数分钟后显现兴奋性增强的延迟响应，以及维持基线活动的无响应形式。钙成像结果显示，随着胞外钙离子浓度的上升，超声激活神经元的比例逐渐升高，表明超声刺激对神经元兴奋性的调控是一种钙依赖的过程。本课题的研究结果为超声调控神经兴奋性提供了机制基础，并为相关临床应用提供了有价值的参考。

关键词：声表面波，超声神经调控，神经兴奋性，突触传递，钙信号

Abstract

Ultrasound neuromodulation shows promise for treating neurological disorders. Previous studies have shown that ultrasound can enhance neuronal excitability and improve central nervous system functions. However, its intrinsic regulatory mechanisms remain unclear. Standing wave-based surface acoustic wave (SAW) ultrasound, as a non-invasive neuromodulation technology, has been widely applied in physiological regulation experiments involving neurons and brain slices. This study employed primary cultured rat hippocampal neurons as experimental subjects, utilizing an integrated SAW ultrasound transducer to record electrophysiological activities or calcium imaging signals during stimulation, systematically investigating the regulatory effects of ultrasound stimulation on neuronal excitability and synaptic transmission, as well as their molecular mechanisms.

Our findings revealed that low-intensity short-term ultrasound stimulation significantly enhances neuronal excitability. Neuronal responses to ultrasound could be categorized into three distinct patterns: immediate response showing rapid activation, delayed response exhibiting facilitation after several minutes, and non-response maintaining baseline activity. Calcium imaging results demonstrated that the proportion of ultrasound-activated neurons progressively increased with elevated extracellular calcium ion concentration, indicating that ultrasound-mediated regulation of neuronal excitability is a calcium-dependent process. This research provides mechanistic insights into ultrasound-based neural excitability modulation and offers valuable references for clinical applications.

Key words: Surface acoustic wave (SAW), Ultrasound neuromodulation, Neuronal excitability, Synaptic transmission, Calcium signaling

一、前言

1.1 研究背景

物理因素介导的神经调控技术 (neuromodulation) 在生命科学领域和临床诊疗中日益得到广泛应用, 特别是非侵入性神经调节技术, 可应用于慢性疼痛^[1]、偏头痛^[2]、阿尔茨海默病^[3-5]和脊髓损伤^[6]的治疗, 以及促进小分子透过血脑屏障进行传递^[7]。其中, 最常用的技术有经颅磁刺激、经颅直流刺激和经皮神经刺激。然而, 受制于其时空分辨率, 这些方法难以对靶向区域的神经元兴奋性和突触传递进行精准调节。

超声刺激则具有在毫米范围内调节神经活动的的能力^[8], 例如可诱发神经元产生动作电位^[9-11]。从基本的运动反应到癫痫放电, 超声刺激能够影响非人灵长类动物的各项生理功能^[12-14], 具有广泛的神经调节作用。其中, 低强度脉冲经颅聚焦超声刺激是最常用的在体超声神经调控手段^[12, 15], 具有无创、可逆、良好的组织穿透能力和高时空分辨率等优势^[16]。Yoo 等人的研究发现, 聚焦超声可以在数百毫秒内激活皮层神经元^[17]。

在超声神经调控的体外研究中, 除了聚焦形式的超声外, 驻波形式的声表面波 (SAW) 超声也被广泛应用于神经元、脑片电生理功能的联合实验研究中。与传统的体声波换能器相比, SAW 装置产生的高频 (MHz 范围) 声波被限制在压电基板的表面, 能够实现自热更少、范围更小的精准细胞刺激^[10, 18-20]。Lin 等人证明, 在海马脑片中 SAW 可以通过调节离子通道动态诱发动作电位并调节神经元活动^[10, 18], 他们基于 SAW 的超声刺激装置能够在基板上高空间分辨率地调控实时神经元活动。此外, Guo 等人开发了一种可调节的“声学井”技术, 用于精确调控细胞之间的相互作用^[21]。虽然这些研究为 SAW 在神经调节中的应用奠定了基础, 但 SAW 介导的神经元兴奋性调节的精细动力学, 以及兴奋性调控过程中的内在分子细胞机制仍有待深入探究。

神经元的兴奋水平是决定神经系统整体兴奋性的基础, 是神经调控的一个重要靶点。神经元内在兴奋性 (intrinsic excitability) 是调控神经环路效率的重要因素, 神经细胞的自发动作电位 (spontaneous action potential, sAP) 发放频率、自发

兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents, sEPSC)、胞内钙浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 等是衡量神经兴奋性水平的重要参数^[22]。已有研究表明, 超声可直接增强大脑整体回路中的神经元活动和兴奋性, 改善中枢神经系统功能, 进而为相关神经疾病的治疗提供帮助^[1, 23, 24]。在细胞水平上, 超声可以通过机械激活离子通道来改变动作电位的起始动力学^[10, 25]。先前的研究表明, 超声主要通过激活各种电压门控离子通道来调节神经元的兴奋性, 包括电压门控钠离子通道 (voltage-gated sodium channels, VGSC)^[10, 26]、电压门控钾离子通道 (voltage-gated potassium channels, K_v)^[18, 27] 和电压门控钙离子通道 (voltage-gated calcium channels, VGCC)^[11, 13], 这些通道对于维持和精细调节神经元的内在兴奋性至关重要。然而, 在短期超声刺激后, 不同神经元类型的兴奋性变化动力学有所不同。例如, Clennell 等人发现, 短期的超声刺激会对神经元兴奋性产生长时间的影响^[25], 远远长于超声诱导离子通道打开的时间。这一实验结果提出了一个重要的问题: 超声的神经调节作用通过何种分子机制实现长时间的影响? 此外, 超声的神经调节作用是否依赖于神经元的内在兴奋性, 以及超声刺激本身是否驱动了神经元内在兴奋性的变化仍需进一步明确。

1.2 研究内容概述

基于上述研究背景, 本课题将以原代培养的大鼠海马神经元为标本, 通过高精度膜片钳技术检测 sAP、sEPSC 等兴奋性电生理特征, 并结合钙成像记录不同胞外钙浓度条件下胞内钙水平变化, 探究超声刺激对神经元兴奋性和突触强度的精细调控动力学及其细胞机制。本课题有望为深入理解超声对神经系统的调控机制提供有价值的参考, 为优化超声的临床治疗应用提供一定的实验基础。

二、材料与amp;方法

2.1 实验材料

海马神经元原代培养所用的实验动物为出生第 1 天的 Sprague-Dawley (SD) 乳鼠，购自上海必凯科翼生物科技有限公司。

2.2 实验试剂

2.2.1 商品试剂

表 2.1 商品试剂

试剂名称	公司	货号	产地
DMEM 培养基	ThermoFisher	11995065	美国
Neurobasal A 培养基	ThermoFisher	10888022	美国
胎牛血清	ThermoFisher	10099141	美国
青霉素-链霉素	ThermoFisher	15140122	美国
0.25%胰蛋白酶	ThermoFisher	25300054	美国
100× GlutaMax	ThermoFisher	35050061	美国
Poly-D-Lysine	碧云天	ST508	中国
50× B27 supplement	ThermoFisher	17504044	美国
Hank's balance salt solution (HBSS)	碧云天	C0218	中国
Fura-2 AM	ThermoFisher	F1221	美国
DMSO	Sangon	A503039	中国
PBS	碧云天	C0221A	中国
NaCl	Merck	S5886	德国
KCl	Merck	V900068	德国
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck	M2670	德国
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck	C5080	德国
NaHCO ₃	Merck	S5761	德国
NaH ₂ PO ₄	Merck	S0751	德国
NaOH	Merck	S5881	德国

KOH	Merck	P4494	德国
抗坏血酸	Merck	A5960	德国
丙酮酸钠	Merck	V900232	德国
肌醇	Merck	V900492	德国
葡萄糖	Merck	V900392	德国
葡萄糖酸钾	Merck	P1847	德国
磷酸肌醇二钠盐	Merck	P7936	德国
三磷酸腺苷镁盐	Merck	A9187	德国
三磷酸鸟苷钠盐	Merck	G8877	德国
EGTA	Merck	E0396	德国
HEPES	Merck	H3375	德国

2.2.2 自配试剂

表 2.2 CM 培养基

组分	浓度 (V/V, %)	体积 (mL/50 mL)
Neurobasal A 培养基	96	48
100× GlutaMax	1	0.5
50× B27 supplement	2	1
青霉素-链霉素	1	0.5

表 2.3 完全培养基

组分	浓度 (V/V, %)	体积 (mL/50 mL)
DMEM 培养基	89	45.5
胎牛血清	10	5
青霉素-链霉素	1	0.5

表 2.4 人工脑脊液

组分	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
NaCl	58.44	125	0.365

KCl	74.55	2.5	0.009
NaHCO ₃	84.01	25	0.105
NaH ₂ PO ₄	119.98	1.25	0.008
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.30	1	0.025 mL (2 M stock)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.01	2	0.050 mL (2 M stock)
葡萄糖	180.16	25	0.225
抗坏血酸	176.12	0.4	0.004
肌醇	180.16	3	0.027
丙酮酸钠	110.04	2	0.011

渗透压: 310-320 mOsm/L, pH: 7.4±0.1 (NaOH 调节), 0.22 μm 过滤后储存于 4°C。

对于不同钙离子浓度的细胞外液，加入 CaCl₂ (2 M stock) 的量不同，并通过调节 NaCl 的加入量以平衡渗透压，其他组分含量不变，具体调节方法见表 2.5:

表 2.5 不同钙离子浓度细胞外液配方

组分	0 mM		0.5 mM		3.5 mM	
	浓度	质量	浓度	质量	浓度	质量
	(mmol/L)	(g/50 mL)	(mmol/L)	(g/50 mL)	(mmol/L)	(g/50 mL)
NaCl	129	0.377	128	0.374	123	0.357
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	0 mL (stock)	0.5	0.0125 mL (stock)	3.5	0.875 mL (stock)

表 2.6 含 K⁺电极内液

组分	分子量 (g/mol)	浓度 (mmol/L)	质量 (g/50 mL)
葡萄糖酸钾	234.25	125	1.464
KCl	74.55	20	0.075
三磷酸腺苷镁盐	507.18	4	0.101
三磷酸鸟苷钠盐	523.18	10	0.008
磷酸肌醇二钠盐	255.08	0.3	0.128
HEPES	238.30	10	0.500 mL (stock)

EGTA	380.35	0.5	0.025 mL (stock)
pH: 7.4±0.1 (KOH 调节), 0.22 μm 过滤后储存于-20℃。			

2.3 实验仪器

表 2.7 实验仪器

试剂名称	公司	型号	产地
恒温培养箱	ThermoFisher	BB15	美国
生物安全柜	ThermoFisher	MSC1.2	美国
恒温摇床	Eppendorf	ThermoMixer C	美国
低温超速离心机	Eppendorf	5424R	美国
倒置荧光显微镜	Olympus	IX73	日本
膜片钳放大器	Molecular Devices	Axopatch 200B	美国
数模转换器	Molecular Devices	Digidata 1550B	美国
微操作器	Sensapex	uMp	芬兰
防震台	AMETEK	TMC	美国
单色光发生器	CoolLED	pE-340 ^{fura}	英国
数字 CMOS 相机	HAMAMATSU	C11440	日本
任意波形发生器	Agilent	33522A	中国
超声刺激换能器	自研	无	中国
电极拉制仪	Sutter	P-97	美国
渗透压仪	Gonotec	OSMOMAT 3000	德国
分析天平	Mettler Toledo	LE104E	美国

2.4 实验方法

2.4.1 大鼠海马神经元的分离与原代培养

- 1) 将细胞爬片置于 24 孔板内, 用 Poly-D-lysine 于 4℃ 浸泡过夜后, 回收 Poly-D-lysine, 用无菌水清洗 1-2 遍, 晾干待用。
- 2) 使用 75%乙醇对 SD 乳鼠进行消毒, 断头处死, 并将头置于盛有预冷的 HBSS 的 10 cm 培养皿中, 将血清清洗干净。

- 3) 沿正中线从断颈处依次将皮肤及颅骨剪开，将脑组织取出置入冰浴的 HBSS 中。
- 4) 沿中线切开左右脑，去除延髓、小脑及大脑枕叶部分。
- 5) 在解剖镜下用尖镊将包裹海马组织的血管膜和血管移除，后使用维纳斯剪将海马组织与其它脑组织分离。
- 6) 将分离得到的海马组织用一次性巴斯德吸管转移至 15 mL 离心管中，短暂离心，弃去多余的 HBSS 溶液。
- 7) 根据海马组织的数量加入适量 0.25%胰蛋白酶，于 37°C 下 500 rpm 震荡消化 10 min。
- 8) 消化结束后，用 1 mL 移液枪反复吹打 20-30 次，直至无肉眼可见的组织，加入与 0.25%胰蛋白酶等体积的完全培养基终止消化。
- 9) 1000 rpm 离心 5 min，去除上清，用完全培养基重悬细胞，将细胞接种在加有完全培养基的 24 孔板上，置于 37°C，5% CO₂ 培养箱培养 2-3 h 后，将完全培养基换为等量 CM 培养基继续培养，随后每 2-3 天用 CM 培养基半换液培养。

2.4.2 全细胞膜片钳记录

海马神经元培养至 DIV10-14 后进行全细胞膜片钳记录。

- 1) 搭建超声刺激平台，并在记录槽内加入预热的人工脑脊液或对应实验所需钙浓度的细胞外液，后将细胞爬片置于记录槽内，使用磁铁固定爬片。
- 2) 使用电极拉制仪拉制玻璃电极，电极电阻为 4-6 M Ω ，并灌入含 K⁺电极内液。
- 3) 在倒置显微镜下选择形态适宜的细胞，通过微操作器，将灌有电极内液的玻璃电极缓慢地靠近待检测的细胞并施以负压，完成高阻封接（封接电阻大于 1 G Ω ）。
- 4) 形成高阻封接后静置约 1-2 min，待封接稳定（漏电流小于 20 pA）后，给予负压打破细胞膜，形成全细胞记录模式。
- 5) 自发兴奋性突触后电流记录采用的是电压钳 Episodic stimulation 模式，钳制电位为 -70 mV，单次记录时长 1 min，重复 20 次。
- 6) 自发动作电位记录采用电流钳 I=0 下的 Gap free 模式，记录时长 20 min。

2.4.3 钙成像

- 1) 将 Fura2-AM 指示剂短暂离心后, 加入 50 μL DMSO 溶解, 制备 1 mmol/L 的 Fura2-AM 母液。
- 2) 使用前用 HBSS 溶液将 Fura2-AM 母液稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度, 若使用 BAPTA 螯合胞内钙离子, 需将 BAPTA-AM 母液在 Fura2-AM 工作液中稀释至 5 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度; 若使用 EGTA 螯合, 需将 EGTA-AM 母液稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$ 的工作浓度。该步骤注意避光。
- 3) 吸去培养基, 用 HBSS 清洗 1-2 次后, 加入适量 Fura2-AM 工作液完全浸没细胞爬片, 置于 37°C, 5% CO_2 培养箱中避光孵育 30-40 min。
- 4) 吸去 Fura2-AM 工作液, 使用 HBSS 清洗 1-2 次。
- 5) 在钙成像记录槽中加入预热的人工脑脊液或对应实验所需钙浓度的细胞外液, 并将细胞爬片置于其中, 使用磁铁固定爬片。
- 6) 使用 Metaflour 软件记录 340 nm 和 380 nm 激发光下的荧光强度的比值, 采集速度为 1 fps, 共采集 1200 s。
- 7) 选取前 2 min 的比值作为基线进行归一化处理。

2.5 数据处理

数据以平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ S.E.M) 表示, n 表示细胞数量。两组之间采用 unpaired t-test 检验, 多组间差异性检验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 后进行 Dunnett's *post-hoc* 校正。即刻响应和延迟相应组神经元比例检验采用 Fisher's exact test。* $p < 0.05$ 表示具有统计学差异; ** $p < 0.01$ 表示具有极显著统计学差异。

数据采集和分析主要软件见表 2.8:

表 2.8 数据采集和分析软件

软件名称	公司	版本	国家
Clampex	Molecular Devices	10.7	美国
Clampfit	Molecular Devices	10.7	美国
MetaFluor	Molecular Devices	7.0	美国
Excel	Microsoft	16.96.1	美国

Igor Pro 9	WaveMetrics	9.05	美国
CorelDRAW 2021	Corel	23.1.0.389	加拿大

三、研究结果

3.1 超声刺激条件筛选

本实验的超声刺激由 SAW 超声换能器产生。SAW 超声换能器以钽酸锂 (LiTaO₃) 晶片为基底，根据叉指密度的不同具有不同的中心频率。我们将 SAW 超声换能器通过同轴电缆与波形发生器的输出端相连接，置于电生理记录平台（图 3.1 A, B），从而实现超声刺激和电生理记录的同步进行。使用激光多普勒测振仪检测 SAW 超声换能器的目标位点表面振动位移（图 3.1 C），可检测其实际中心频率，经测算后，我们发现中心频率为 11.95 MHz 的换能器输入和输出强度呈较好的线性关系，故后续实验选定 11.95 MHz 为输出频率。波形发生器的输出波形为正弦波，可依据超声换能器的实际中心频率设置对应的输出频率，通过调整峰峰值 (V_{pp}) 大小来调节输出强度，最终在钽酸锂晶片表面产生一系列驻波声场（图 3.1 E）。

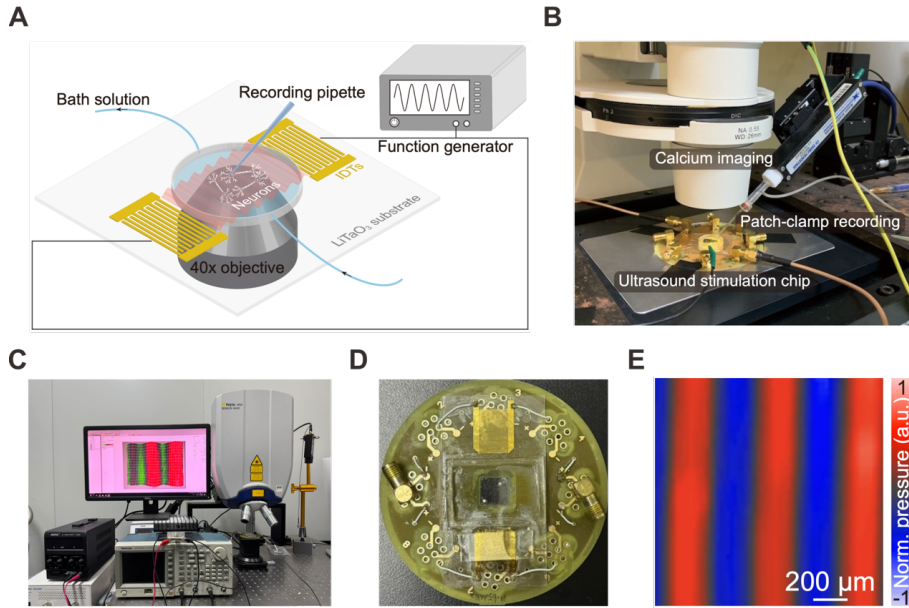


图 3.1 整合超声刺激模块的电生理-细胞成像平台与 SAW 超声换能器的参数检测

（A, B）整合超声刺激模块的电生理-细胞成像平台结构示意图和实物图；（C）利用激光测振仪对 SAW 超声换能器参数进行定标；（D）中心频率为 11.95 MHz 的 SAW 超声换能器；（E）换能器记录槽中心区域声压分布

为了确定合适的超声刺激强度，我们对原代培养海马神经元进行梯度连续刺激，并记录其 sAP 的发放情况。我们的超声刺激模式为：连续刺激 2 min 后，间

隔 2 min，增加强度继续刺激，波形发生器的输出峰峰值按 0、3、6、9 Vpp 依次递增（图 3.2 A）。结果显示，3 Vpp 和 6 Vpp 的刺激强度均能显著提高神经元 sAP 的发放频率，且 6 Vpp 刺激对 sAP 发放的增强作用最为显著；而当刺激强度为 9 Vpp 时，神经元 sAP 的发放频率相较于 3 Vpp 和 6 Vpp 有所下降（图 3.2 B；表 3.1），说明过高的刺激强度可能会对神经元产生一定的损伤。因此，后续实验中我们使用 6 Vpp 作为刺激强度。

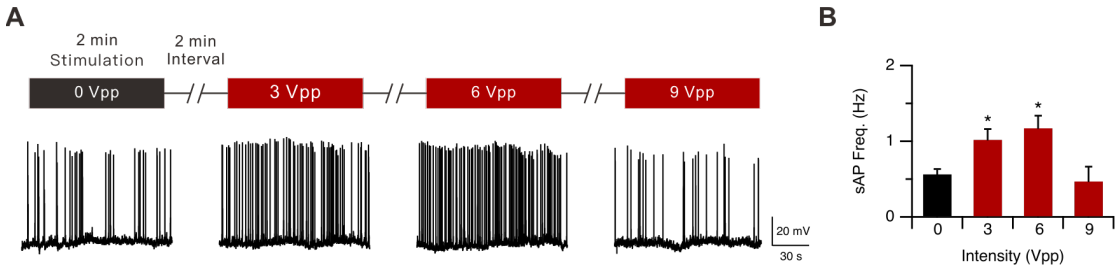


图 3.2 不同强度的超声刺激对海马神经元 sAP 发放频率的影响

（A）神经元 sAP 发放随超声强度变化示意图；（B）神经元 sAP 发放频率随超声强度变化统计图（ $n = 5$, one-way ANOVA with Dunnett’s *post-hoc* test）

表 3.1 不同强度的超声刺激下海马神经元 sAP 发放频率统计

	0 Vpp	3 Vpp	6 Vpp	9 Vpp
Freq. (Hz)	0.58 ± 0.07	1.03 ± 0.15	1.19 ± 0.17	0.48 ± 0.20
P value	-	0.025	0.011	0.674

3.2 超声对海马神经元兴奋性的精细调控动力学

3.2.1 超声促进海马神经元自发动作电位发放

为进一步明确超声刺激过程中海马神经元兴奋性的精细动态变化，我们对海马神经元的 sAP 发放进行了连续 20 min 的实时监测。我们选取了超声刺激前（黑色标记，Pre，2 min）、超声刺激过程中（红色标记，US，2 min）、超声刺激结束后短时间内（蓝色标记，Post_{init}，2 min），以及超声刺激结束后 10 min 左右（绿色标记，Post_{late}，2 min）这 4 个时间窗口对神经元 sAP 的发放动态进行表征。我们观察到，不同细胞对相同强度的超声响应存在差异。根据 sAP 发放频率的不同，可分为以下三类：部分神经元在 US 时间段内 sAP 频率相较于刺激前显著提高（图 3.3 A,D 左；表 3.2），我们将其称为即刻响应（immediate response, IR）神

神经元；部分神经元 US 和 $\text{Post}_{\text{init}}$ 时间段 sAP 发放频率并无显著变化，而是在超声刺激约 10 min 后才发生显著提高（图 3.3 B, E 左；表 3.2），我们将这一类神经元称为延迟响应 (delayed response, DR) 神经元；还有一部分神经元在记录的 20 min 内对超声刺激一直未表现出明显的响应（图 3.3 C, F 左；表 3.2），我们将其称为无响应 (non-response, NR) 神经元。同时，我们检测了海马神经元的静息膜电位 (membrane potential, MP) 变化，观察到 IR 和 NR 神经元的膜电位一直没有显著变化，DR 神经元的膜电位则在 $\text{Post}_{\text{late}}$ 时间段发生显著上升（图 3.3 D-F 右；表 3.2）。

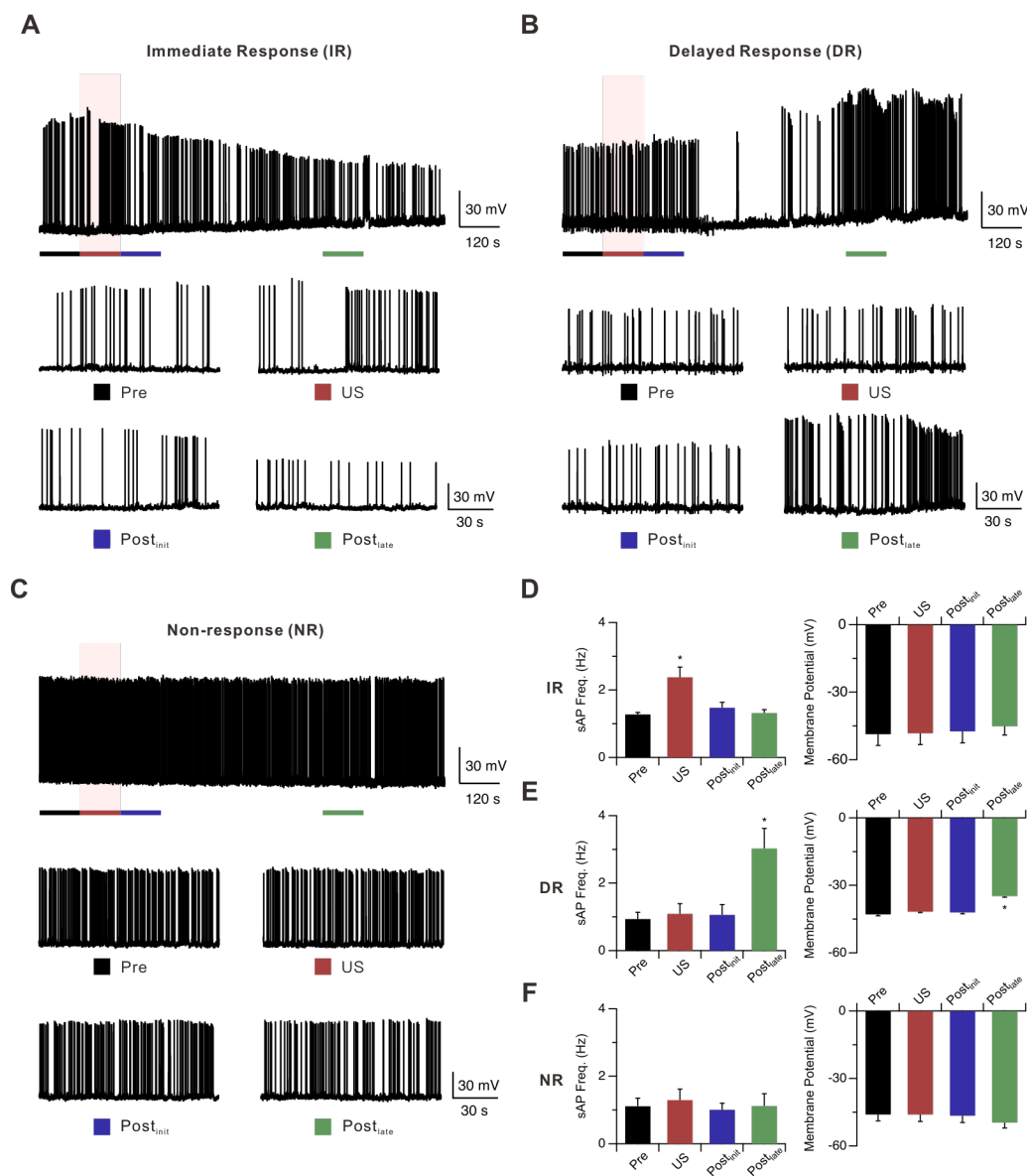


图 3.3 超声刺激动态调控海马神经元 sAP 发放和静息膜电位

(A-C) 20 min 记录中超声对即刻响应 (IR)、延迟响应 (DR)、无响应 (NR) 神经元 sAP 发放的调控；(D) IR 神经元 sAP 发放频率 (左) 和膜电位 (右) 在 20 min

内的变化统计统计图 (n = 3, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (E) DR 神经元 sAP 发放频率 (左) 和膜电位 (右) 在 20 min 内的变化统计统计图 (n = 3, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (F) NR 神经元 sAP 发放频率 (左) 和膜电位 (右) 在 20 min 内的变化统计统计图 (n = 4, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

表 3.2 超声刺激对海马神经元 sAP 发放的调控

Group		Pre	US	Post _{init}	Post _{late}
IR	Freq. (Hz)	1.28 ± 0.06	2.38 ± 0.30	1.48 ± 0.16	1.32 ± 0.10
	P value	-	0.011	0.281	0.756
	MP (mV)	-48.60 ± 5.02	-48.23 ± 5.03	-47.38 ± 5.17	-45.12 ± 3.91
	P value	-	0.961	0.874	0.614
DR	Freq. (Hz)	0.94 ± 0.20	1.09 ± 0.30	1.06 ± 0.31	3.03 ± 0.60
	P value	-	0.690	0.755	0.030
	MP (mV)	-42.89 ± 1.85	-48.23 ± 0.51	-47.38 ± 1.64	-45.12 ± 1.20
	P value	-	0.569	0.737	0.021
NR	Freq. (Hz)	1.12 ± 0.24	1.30 ± 0.33	1.01 ± 0.19	1.12 ± 0.36
	P value	-	0.674	0.736	0.993
	MP (mV)	-45.96 ± 2.87	-45.95 ± 3.09	-46.49 ± 3.03	-49.52 ± 2.45
	P value	-	0.997	0.907	0.399

上述实验结果表明, 超声刺激可以提高部分神经元 sAP 的发放频率, 不同神经元在超声刺激后兴奋性提高的动力学时程不同; 膜电位的检测结果暗示, 超声可能通过提高神经元的静息膜电位以促进 sAP 的发放。

3.2.2 超声增强海马神经元突触传递过程

除了神经元本身 sAP 的发放, 神经元之间的突触传递也是神经兴奋性调控的重要靶点。为明确超声对海马神经元自发突触传递之间的精细调控作用, 我们对神经元的 sEPSC 也进行了连续 20 min 的记录。

超声刺激对神经元 sEPSC 的调控作用与 sAP 相似, 不同神经元 sEPSC 的发放频率同样表现出不同的响应类型。IR 神经元的 sEPSC 频率在超声刺激过程中

显著上升, sEPSC 的幅度呈现一定的上升趋势, 但没有统计学差异 (图 3.4 A, D; 表 3.3); DR 神经元的 sEPSC 频率在超声刺激结束约 10 min 后显著提高, 其幅度变化无统计学差异 (图 3.4 B, E; 表 3.3); NR 神经元的 sEPSC 频率和幅度则在记录的 20 min 内始终未产生显著变化 (图 3.4 C, F; 表 3.3)。上述结果显示, 超声刺激能够增强部分海马神经元的突触传递过程, 且不同神经元的响应同样存在时程差异性。

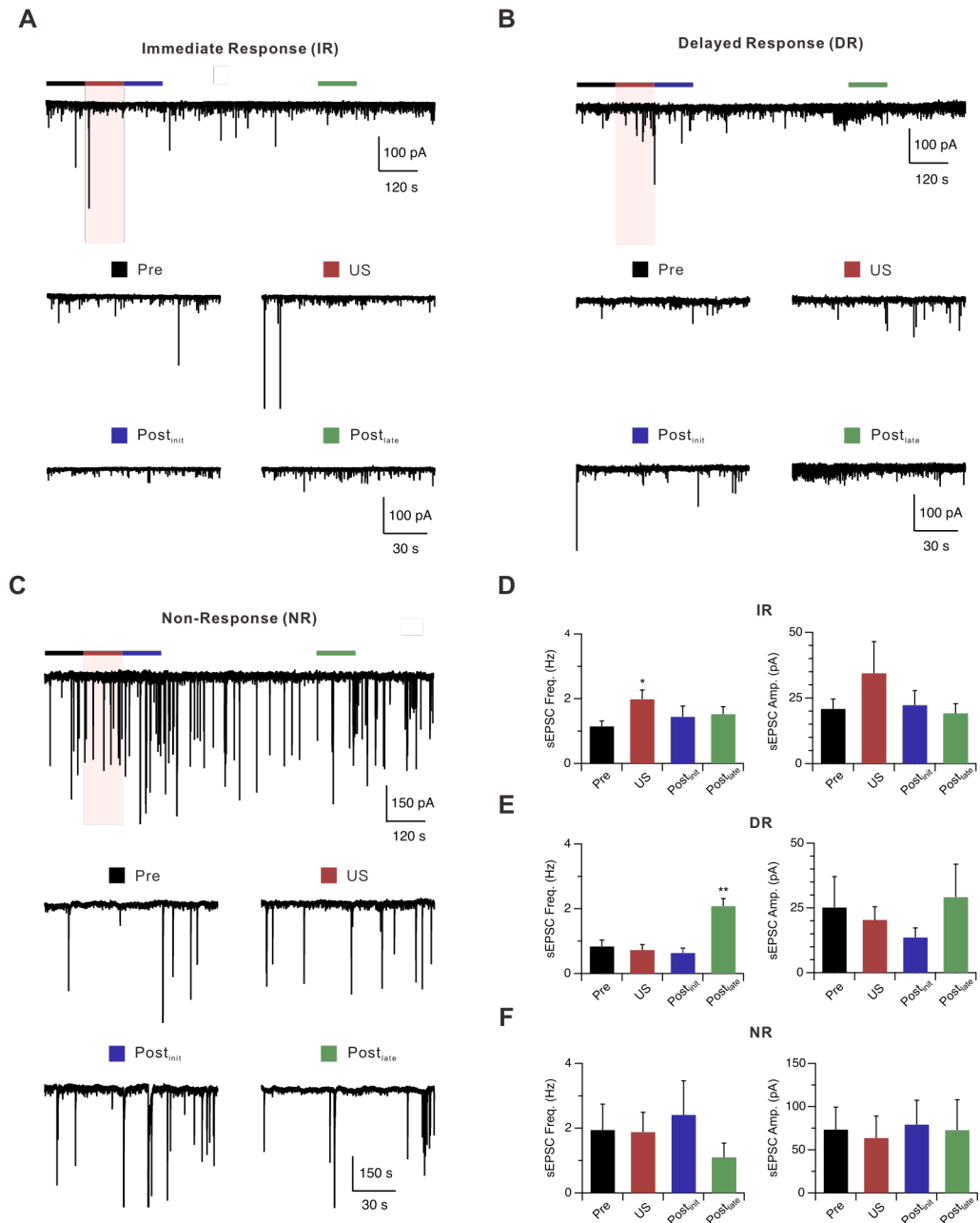


图 3.4 超声刺激动态调控海马神经元 sEPSC 发放

(A-C) 20 min 记录中超声对即刻响应 (IR)、延迟响应 (DR)、无响应 (NR) 神经元 sEPSC 发放的调控; (D) IR 神经元 sEPSC 发放频率 (左) 和幅度 (右) 在 20 min 内的变化统计统计图 (n = 5, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (E)

DR 神经元 sEPSC 发放频率（左）和幅度（右）在 20 min 内的变化统计图 (n = 4, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (F) NR 神经元 sEPSC 发放频率（左）和幅度（右）在 20 min 内的变化统计图 (n = 3, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test)

表 3.3 超声刺激对海马神经元 sEPSC 发放的调控

Group		Pre	US	Post _{init}	Post _{late}
IR	Freq. (Hz)	1.15 ± 0.17	1.98 ± 0.29	1.44 ± 0.33	1.52 ± 0.23
	P value	-	0.035	0.448	0.223
	Amp (pA)	20.89 ± 3.77	34.39 ± 12.04	22.29 ± 5.54	19.13 ± 3.71
	P value	-	0.316	0.840	0.749
DR	Freq. (Hz)	0.72 ± 0.21	0.64 ± 0.18	0.60 ± 0.19	1.94 ± 0.24
	P value	-	0.772	0.679	0.008
	Amp (pA)	25.17 ± 11.90	20.40 ± 5.05	13.64 ± 3.68	29.19 ± 12.73
	P value	-	0.725	0.390	0.825
NR	Freq. (Hz)	1.94 ± 0.80	1.88 ± 0.61	2.41 ± 1.05	1.09 ± 0.45
	P value	-	0.950	0.472	0.406
	Amp (pA)	73.40 ± 25.94	63.72 ± 25.43	79.24 ± 28.18	72.62 ± 35.42
	P value	-	0.803	0.886	0.987

3.3 超声刺激通过钙依赖的方式调控神经元兴奋性

神经元的突触传递过程受到钙离子调控^[28, 29]，为进一步探究超声调控神经元兴奋性的分子细胞机制，我们利用钙成像技术检测了超声刺激过程中海马神经元胞内钙离子浓度的变化。结果显示，超声刺激后胞内钙离子浓度的变化与 sEPSC 的动态响应同样一致，可分为 IR、DR、NR 三类。IR 神经元（占比 11.54%）胞内钙浓度在超声刺激阶段和刺激后较短时间内（US 到 Post_{init}）快速上升，并且持续到超声刺激后约 10 min (Post_{late})（图 3.5 A）；DR 神经元（占比 59.61%）胞内钙浓度在超声刺激后上升较缓，到 Post_{late} 时间段开始快速上升（图 3.5 B）；NR 神经元（占比 28.85%）胞内钙浓度在检测全程无显著变化（图 3.5 C）。

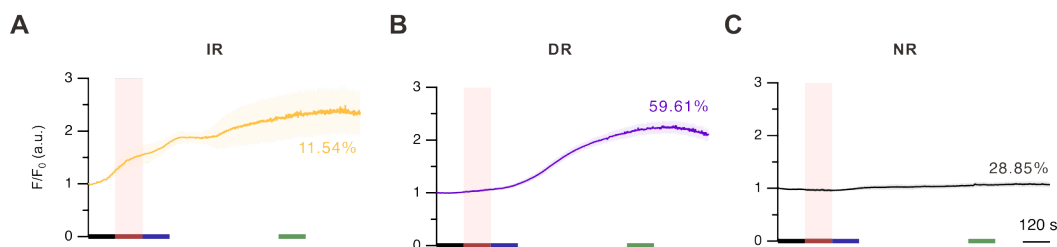


图 3.5 海马神经元胞内钙浓度对超声刺激的不同响应形式

(A) 超声调控 IR 神经元胞内钙浓度变化 ($n = 6$); (B) 超声调控 DR 神经元胞内钙浓度变化 ($n = 31$); (C) 超声调控 NR 神经元胞内钙浓度变化 ($n = 15$)

随后,我们在不同胞外钙浓度 ($[Ca^{2+}]_o$) 条件下(无钙:0 mM; 低钙:0.5 mM; 高钙: 3.5 mM)记录钙信号以及 sEPSC 的频率和幅度,以探究不同大小的钙内流对超声介导的神经兴奋性调控的影响。结果发现,在 0 mM $[Ca^{2+}]_o$ 条件下,超声对海马神经元 sEPSC 及胞内钙浓度均无显著影响(图 3.6 A, D; 表 3.4); 在 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ 条件下, sEPSC 频率和幅度仍无明显变化,胞内钙浓度变化出现延迟响应,比例约为 1/3,其余为无响应,无 IR 神经元(图 3.6 B, E; 表 3.4); 将胞外钙浓度增加至 3.5 mM 后,海马神经元 sEPSC 频率和幅度在 Post_{late} 时间段表现出显著增加,出现 IR 神经元, DR 神经元比例相较于 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$ 条件上升至 41.67% (图 3.6 C, F; 表 3.4), 各反应类型神经元的占比相对于无钙和低钙条件也产生显著差异(图 3.6 G)。然而,与 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ 条件相比(图 3.5),高钙条件下各反应类型神经元的占比并无显著变化(图 3.6 G)。

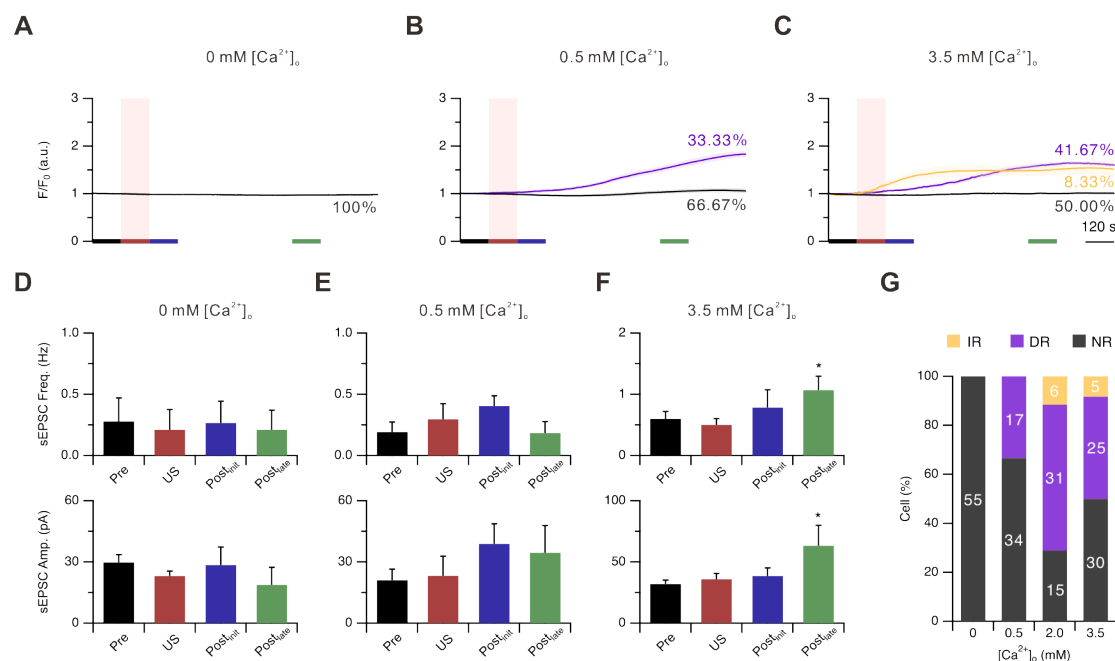


图 3.6 胞外钙浓度升高促进超声对海马神经元兴奋性的增强作用

(A, D) 0 mM 胞外钙条件下, 神经元胞内钙成像结果以及 sEPSC 频率和幅度统计 ($n = 4$, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (B, E) 0.5 mM 胞外钙条件下, 神经元胞内钙成像结果以及 sEPSC 频率和幅度统计 ($n = 4$, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (C, F) 3.5 mM 胞外钙条件下, 神经元胞内钙成像结果以及 sEPSC 频率和幅度统计 ($n = 7$, one-way ANOVA with Dunnett's *post-hoc* test); (G) 不同胞外钙浓度下各反应类型神经元占比 (3.5 mM vs 0 mM: $p < 0.001$; 3.5 mM vs 0.5 mM: $p < 0.001$; 3.5 mM vs 2 mM: $p = 0.081$, Fisher's exact test)

表 3.4 不同胞外钙浓度下超声刺激对海马神经元 sEPSC 发放的调控

[Ca ²⁺] _o (mM)		Pre	US	Post _{init}	Post _{late}
0	Freq. (Hz)	0.28 ± 0.19	0.21 ± 0.17	0.27 ± 0.18	0.21 ± 0.16
	P value	-	0.800	0.963	0.798
	Amp (pA)	29.72 ± 3.91	23.08 ± 2.37	28.50 ± 8.84	18.82 ± 8.57
	P value	-	0.587	0.928	0.427
0.5	Freq. (Hz)	0.19 ± 0.08	0.30 ± 0.13	0.40 ± 0.08	0.18 ± 0.09
	P value	-	0.519	0.123	0.949
	Amp (pA)	21.00 ± 5.44	23.28 ± 9.53	38.92 ± 9.82	34.62 ± 13.22
	P value	-	0.842	0.162	0.378
3.5	Freq. (Hz)	0.60 ± 0.12	0.50 ± 0.10	0.79 ± 0.29	1.07 ± 0.23
	P value	-	0.454	0.445	0.042
	Amp (pA)	31.90 ± 3.27	35.84 ± 4.70	38.55 ± 6.55	63.37 ± 16.60
	P value	-	0.483	0.567	0.040

为了排除随机因素造成的影响并证实胞内钙浓度的上升确实是由超声引起, 我们不施加任何超声刺激 (Sham), 对胞内钙浓度变化进行了 20 min 的连续记录。结果表明, 海马神经元胞内钙浓度在无超声刺激情况下基本没有变化(图 3.7 A)。由于不同神经元本身胞内钙浓度水平不同, 是形成不同超声响应类型的可能原因, 我们使用 BAPTA 和 EGTA 螯合胞内钙离子, 控制海马神经元胞内钙浓度至一个相同的较低水平。使用 BAPTA 螯合胞内钙离子后, 海马神经元胞内钙浓度在超声刺激下无显著上升(图 3.7 B); 而使用 EGTA 作为螯合剂时, 整体上神经元的胞内钙浓度在超声刺激约 4 min 后逐步升高(图 3.7 C)。

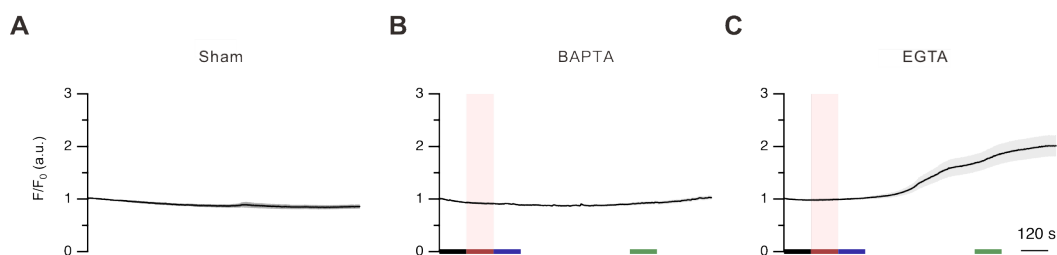


图 3.7 不施加超声刺激及药物螯合海马神经元胞内钙离子后的钙成像结果

(A) 不施加超声刺激时海马神经元胞内钙浓度变化 ($n=25$); (B) BAPTA 螯合海马神经元胞内钙离子后超声刺激下的胞内钙浓度变化 ($n=48$); (C) EGTA 螯合海马神经元胞内钙离子后超声刺激下的胞内钙浓度变化 ($n=39$)

上述实验结果显示, 在生理条件下超声能够显著提高海马神经元胞内钙水平, 且同样表现出不同的响应时程。胞外钙浓度的降低会逐渐抑制超声的对神经元兴奋性的增强作用, 在无钙或 BAPTA 螯合胞内钙离子条件下超声的神经调控效果完全消失, 证明超声通过钙依赖的方式调控神经元兴奋性。

四、讨 论

本课题以原代大鼠海马神经元为样本，通过 sAP 和 sEPSC 频率、胞内钙浓度等指标探究了超声对神经元兴奋性的调控作用。我们发现，超声可显著提高神经元 sAP、sEPSC 频率以及胞内钙水平，这种兴奋性增强可维持 10 min 以上。不同神经元在超声刺激后兴奋性提高的动力学时程不同，可分为即刻响应 (IR)、延迟响应 (DR) 和无响应 (NR)。当改变细胞外钙离子浓度时，超声对神经兴奋性的调控亦随之改变，随胞外钙浓度提高，超声响应神经元的比例有所升高；不施加超声刺激或螯合胞内钙离子时，超声对神经元调控神经元兴奋性的过程被抑制，证明超声对神经元兴奋性的增强为钙依赖过程。

超声调控神经元兴奋性可以从两个方面进行评价，一是对神经元自身兴奋性的作用，二是对神经元之间兴奋传递的作用。我们的研究发现，神经元兴奋性在低强度连续超声刺激 (6 Vpp, 2 min) 后表现出增强作用 (图 3.2)。这种刺激能持续改变 sAP 发放 (图 3.3 A, B, C)、sEPSC (图 3.4 A, B, C) 和胞内钙水平 (图 3.5)，且在响应时程上，神经元对超声刺激呈现异质性 (图 3.3-3.6)。神经元的动作电位是神经信息编码的基本单元，其发放水平受到神经元静息膜电位、去极化电流阈值和膜电导等因素影响^[22]。我们的结果显示，在超声刺激后 10 min 左右，DR 神经元的静息膜电位显著升高，从而促进动作电位的发放 (图 3.3 E)，增强内在兴奋性。此外，我们观察到，尽管在生理条件 (2 mM $[Ca^{2+}]_o$) 下 sEPSC 幅度在超声刺激后无显著变化 (图 3.4 D-E)，但提高胞外钙浓度至 3.5 mM，sEPSC 幅度在 Postlate 时间段发生显著提高 (图 3.6 F)，提示超声通过促进钙内流调控突触递质释放，进而增强神经元的自发突触传递过程。

通过改变神经元胞外钙离子浓度，我们发现在无钙或低钙环境下，超声刺激对神经元自发兴奋性无显著提升作用 (图 3.6 A, B, D, E)。在生理钙浓度 (2 mM $[Ca^{2+}]_o$) 下，神经元的总体兴奋 (包括 IR 和 DR) 比例相较于无钙和低钙显著提高 (0 mM $[Ca^{2+}]_o$: 0%; 0.5 mM $[Ca^{2+}]_o$: 33.33%; 2 mM $[Ca^{2+}]_o$: 71.15%)，但进一步提高胞外钙浓度至 3.5 mM 后，神经元的总体兴奋比例相较于生理钙浓度并无显著差异 (图 3.6 G)。这可能是因为 2 mM $[Ca^{2+}]_o$ 带来的激活比例已达到超声调控神经元兴奋性的上限，且由于部分神经元可能恰好位于驻波声波的波节附近 (图

3.1 E), 此处的声波振幅较小, 无法达到有效的刺激强度, 从而导致神经元对超声刺激的响应不显著, 这部分神经元的数量也在一定程度上决定了 NR 神经元的比例。

为了探究胞内钙离子浓度本身的差异是否影响神经元对超声的响应, 我们使用钙离子螯合剂 BAPTA 和 EGTA 控制神经元胞内钙浓度维持一个相同的较低水平。我们在实验过程中观察到, 施加 BAPTA 后神经元胞内钙浓度在超声刺激下基本无变化, 但施加 EGTA 后, 部分神经元在超声刺激约 4 min 后胞内钙浓度逐渐上升, 且不同神经元上升的开始时间具有异质性, 而部分神经元胞内钙水平始终不变 (图 3.7 B, C)。考虑到 EGTA 对钙离子的结合能力相对较弱, 螯合速度较慢, 当内流的钙离子大于 EGTA 的螯合上限, 便会记录到胞内钙水平的升高。然而, 由于不同神经元在孵育时摄取 EGTA-AM 的量可能存在差异, 并不能精确保每个神经元的起始胞内钙水平完全相同, 因此还需更精确的控制实验以探究是不同大小和时程的钙内流, 还是神经元本身不同的胞内钙水平导致了不同神经元对超声调控响应动态的差异。

近年有研究发现, 机械敏感离子通道 (如 TRPA1, Piezo1, TREK 等) 和电压门控离子通道 (如 Nav1.5) 等可能是超声调控神经元兴奋性的作用靶点^[26, 30, 31]。我们的研究发现超声对神经元兴奋性的调控作用是钙依赖性的, 然而, 目前关于电压门控钙离子通道 (VGCCs) 是否参与该过程仍不十分明确。海马神经元中主要表达 P/Q 型 (Cav2.1)、N 型 (Cav2.2) 和 L 型 (Cav1.2/ Cav1.3) 钙离子通道^[32]。其中 P/Q 型与 N 型钙离子通道主要表达于突触末梢, 通过兴奋-分泌偶联机制在递质囊泡的胞吐与胞吞过程中发挥作用^[33, 34], L 型钙离子通道则主要表达于突触后致密区以及神经元胞体。因此, 后续我们将探究不同 VGCCs 在钙依赖的超声介导神经元激活过程中发挥的作用, 进一步明确响应超声刺激的离子通道种类与机制。

总之, 本研究展示了 SAW 超声技术在精准神经调控中的应用潜力, 为神经科学研究和临床干预提供了新见解。通过阐明超声神经调控的细胞机制, 本研究为开发更有效的超声疗法奠定了理论基础。利用 SAW 超声实现高时空精度选择性调控神经元活动, 为治疗癫痫、慢性疼痛、神经退行性疾病和情绪障碍等神经精神疾病带来了新希望。

参考文献

- [1] KNOTKOVA H, HAMANI C, SIVANESAN E, et al. Neuromodulation for chronic pain [J]. *Lancet*, 2021, 397(10289): 2111-24.
- [2] DIENER H C, CHARLES A, GOADSBY P J, et al. New therapeutic approaches for the prevention and treatment of migraine [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(10): 1010-22.
- [3] BENUSSI A, CANTONI V, GRASSI M, et al. Increasing Brain Gamma Activity Improves Episodic Memory and Restores Cholinergic Dysfunction in Alzheimer's Disease [J]. *Ann Neurol*, 2022, 92(2): 322-34.
- [4] BEISTEINER R, MATT E, FAN C, et al. Transcranial Pulse Stimulation with Ultrasound in Alzheimer's Disease-A New Navigated Focal Brain Therapy [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(3): 1902583.
- [5] DENG Z, WANG J, XIAO Y, et al. Ultrasound-mediated augmented exosome release from astrocytes alleviates amyloid-beta-induced neurotoxicity [J]. *Theranostics*, 2021, 11(9): 4351-62.
- [6] PIZZOLATO C, GUNDUZ M A, PALIPANA D, et al. Non-invasive approaches to functional recovery after spinal cord injury: Therapeutic targets and multimodal device interventions [J]. *Exp Neurol*, 2021, 339: 113612.
- [7] CONSTANS C, AHNINE H, SANTIN M, et al. Non-invasive ultrasonic modulation of visual evoked response by GABA delivery through the blood brain barrier [J]. *J Control Release*, 2020, 318: 223-31.
- [8] DARMANI G, BERGMANN T O, BUTTS PAULY K, et al. Non-invasive transcranial ultrasound stimulation for neuromodulation [J]. *Clin Neurophysiol*, 2022, 135: 51-73.
- [9] WATTIEZ N, CONSTANS C, DEFFIEUX T, et al. Transcranial ultrasonic stimulation modulates single-neuron discharge in macaques performing an antisaccade task [J]. *Brain Stimul*, 2017, 10(6): 1024-31.
- [10] LIN Z R, ZHOU W, HUANG X W, et al. On-Chip Ultrasound Modulation of Pyramidal Neuronal Activity in Hippocampal Slices [J]. *Adv Biosyst*, 2018, 2(8).
- [11] FAN W Y, CHEN Y M, WANG Y F, et al. L-Type Calcium Channel Modulates Low-Intensity Pulsed Ultrasound-Induced Excitation in Cultured Hippocampal Neurons [J]. *Neurosci Bull*, 2024, 40(7): 921-36.
- [12] 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]. *J Neurosci*, 2018, 38(12): 3081-91.
- [13] DEFFIEUX T, YOUNAN Y, WATTIEZ N, et al. Low-intensity focused ultrasound modulates monkey visuomotor behavior [J]. *Curr Biol*, 2013, 23(23): 2430-3.
- [14] LIN Z, MENG L, ZOU J, et al. Non-invasive ultrasonic neuromodulation of neuronal excitability for treatment of epilepsy [J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5514-26.
- [15] YANG P S, KIM H, LEE W, et al. Transcranial Focused Ultrasound to the

- Thalamus Is Associated with Reduced Extracellular GABA Levels in Rats [J]. *Neuropsychobiology*, 2012, 65(3): 153-60.
- [16] DUQUE M, LEE-KUBLI C A, TUFAIL Y, et al. Sonogenetic control of mammalian cells using exogenous Transient Receptor Potential A1 channels [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 600.
 - [17] YOO S, MITTELSTEIN D R, HURT R C, et al. Focused ultrasound excites cortical neurons via mechanosensitive calcium accumulation and ion channel amplification [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 493.
 - [18] LIN Z, HUANG X, ZHOU W, et al. Ultrasound Stimulation Modulates Voltage-Gated Potassium Currents Associated With Action Potential Shape in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 544.
 - [19] ZHOU W, WANG J, WANG K, et al. Ultrasound neuro-modulation chip: activation of sensory neurons in *Caenorhabditis elegans* by surface acoustic waves [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(10): 1725-31.
 - [20] PENG D, TONG W, COLLINS D J, et al. Mechanisms and Applications of Neuromodulation Using Surface Acoustic Waves-A Mini-Review [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 629056.
 - [21] GUO F, LI P, FRENCH J B, et al. Controlling cell-cell interactions using surface acoustic waves [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(1): 43-8.
 - [22] DEBANNE D, INGLEBERT Y, RUSSIER M. Plasticity of intrinsic neuronal excitability [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2019, 54: 73-82.
 - [23] TYLER W J, TUFAIL Y, FINSTERWALD M, et al. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3511.
 - [24] TUFAIL Y, MATYUSHOV A, BALDWIN N, et al. Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits [J]. *Neuron*, 2010, 66(5): 681-94.
 - [25] CLENNELL B, STEWARD T G J, ELLEY M, et al. Transient ultrasound stimulation has lasting effects on neuronal excitability [J]. *Brain Stimul*, 2021, 14(2): 217-25.
 - [26] KUBANEK J, SHI J, MARSH J, et al. Ultrasound modulates ion channel currents [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24170.
 - [27] CUI K, ZHANG S, SUN J, et al. Inhibitory effect of ultrasonic stimulation on the voltage-dependent potassium currents in rat hippocampal CA1 neurons [J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 3.
 - [28] SCHNEGGENBURGER R, NEHER E. Presynaptic calcium and control of vesicle fusion [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15(3): 266-74.
 - [29] WU X S, MCNEIL B D, XU J, et al. Ca(2+) and calmodulin initiate all forms of endocytosis during depolarization at a nerve terminal [J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(8): 1003-10.
 - [30] PRIETO M L, FIROUZI K, KHURI-YAKUB B T, et al. Activation of Piezo1 but Not Na(V)1.2 Channels by Ultrasound at 43 MHz [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2018, 44(6): 1217-32.
 - [31] NIU X, YU K, HE B. Transcranial focused ultrasound induces sustained synaptic plasticity in rat hippocampus [J]. *Brain Stimul*, 2022, 15(2): 352-9.

- [32] SIMMS B A, ZAMPONI G W. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction [J]. *Neuron*, 2014, 82(1): 24-45.
- [33] XU J, KANG N, JIANG L, et al. Activity-dependent long-term potentiation of intrinsic excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(7): 1750-60.
- [34] XU J, HE L, WU L G. Role of Ca(2+) channels in short-term synaptic plasticity [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17(3): 352-9.

致 谢

“尽信书不如无书”，这是父亲给予我最宝贵的教诲之一。这句几乎从我记事起就一直静静躺在我的记忆长河中的话，在时间的擦拭下越发闪耀出它的光芒。感谢父母将我幼时的顽皮化为探索的好奇，鼓励和引导我去观察，去思考，去挑战，去质疑，用自己的眼睛和大脑去验证那些既有的规则。高中那晚回家的路上，父母在听闻我有意向选择生物专业后眼中露出激动的神采，幻想着自己的女儿将来会成为屠呦呦一样的人。从这里开始，我看见一条通向科学森林的大道，前方从密林深处闪烁出诱人的微光，身后是家人给予的一片棉花般的暖阳。

“不待扬鞭自奋蹄”，这是大学入学时外公对我的赠语。走出温室，来到旷野，何处去奋蹄？没有人告诉我答案，我只能四处冲撞。感谢自己踏出的每一条路，感谢自己撞上的每一堵墙，感谢一路上遇到的每一处景，感谢一处景中遇见的每一个人。“昨夜西风凋碧树，独上高楼，望尽天涯路”，我脚下的每一颗尘土自会告诉我该望向何处。

“无他，唯手熟尔”，这是我的导师薛磊教授对学生们最多的教导之一。于我而言，他亦师亦父亦友，是我成长路上的贵人。感谢他在我刚转入生物科学专业后将我引入科研的大门，那些亲手教我们使用数据处理软件的日子、那些共同奋战生科赛的日子、那些探讨课题的日子……都将成为我生命中的“黄金时光”。他对于笔下每一个文字的严谨态度，对于每一个学生的真诚回应与关怀，教会我“衣带渐宽终不悔，为伊消得人憔悴”。课题的推进一帆风顺是假，但每一步学习到的知识和技能是真。感谢范文勇师兄对实验操作和数据处理的倾情指导；感谢汤雯絮师姐一直以来的指导和帮助，她是我学习的榜样和前进的标杆；感谢王宇琦师兄、胡佳玮师兄、胡佳琦师姐、黄盈莹师姐、高一鸣师兄、徐玥师姐、章浩扬师兄、郑乐昕师兄、李晓菲师姐对我在 Xue Lab 学习和生活的帮助，凡是过往，皆为序章。

最后，感谢室友陪我一起度过前行的每一个关卡，感谢她陪我在旷野上一同飞驰，站在地上的脚踝因为你们而有了真实感。我相信跬步的积累，我相信时间的力量，我相信山外还有青山，我相信未来还有未来。我将永远期待，“众里寻她千百度，蓦然回首，那人却在、灯火阑珊处。”