

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.004

## 电刺激大壁虎中脑诱发相反方向脊柱侧弯的研究

王文波<sup>1#</sup>, 范佳<sup>1,2#</sup>, 蔡雷<sup>1,2</sup>, 戴振东<sup>1\*</sup>

(1. 南京航空航天大学仿生结构与材料防护研究所, 南京 210016; 2. 南京航空航天大学机电学院, 南京 210016)

**摘要:**深入探索大壁虎 *Gekko gecko* 中脑运动调控功能, 通过对头部固定的大壁虎 (n=10) 中脑脑区采用不锈钢微电极施加电刺激, 发现对中脑不同深度脑区的电刺激能诱发出脊柱侧弯、四肢动等运动反应。在实验过程中, 一些刺激针道在中脑围脑室灰质诱发出脊柱同侧弯曲反应, 而在中脑腹侧被盖诱发出脊柱对侧弯曲反应。通过对刺激脑区的组织学检验, 确定了大壁虎中脑内控制相反方向脊柱侧弯运动核团分布的大致区域。

**关键词:** 大壁虎; 中脑; 脊柱同侧弯曲; 脊柱对侧弯曲

**中图分类号:** Q424; Q811.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0498-04

## Study on Eliciting Inversus Spinal Bending Movements of *Gekko gecko* by Electrical Mesencephalon Stimulation

WANG Wen-bo<sup>1#</sup>, FAN Jia<sup>1,2#</sup>, CAI Lei<sup>1,2</sup>, DAI Zhen-dong<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Bio-inspired Structure and Surface Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China; 2. College of Mechanical and Electrical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

**Abstract:** To thoroughly study the locomotion control function of *Gekko gecko*'s midbrain, 10 fixed head of *G. gecko* were used in electrical mesencephalon stimulation experiments. During the experiments, the animal's mesencephalic areas were electrically stimulated via micro stainless steel electrodes and its responses during stimulation were observed. The results implied that locomotion responses such as spinal bending, limbs' movements could be elicited in different depths of mesencephalon. As the change of stimulus depth at the same tract, locomotion response elicited may change. Some stimulation tracts elicited ipsilateral spinal bending in periaqueductal gray area while elicited contralateral spinal bending at ventral tegmentum. The approximate distribution areas of two kinds of nucleus that modulate inversus spinal bending movements were confirmed by histological analysis of stimulated mesencephalic region.

**Key words:** *Gekko gecko*; mesencephalon; ipsilateral spinal bending; contralateral spinal bending

利用生物控制技术研制生物机器人始于 20 世纪 90 年代, 是电子信息技术、微制造技术和生物学高度发展与相互融合的产物, 是目前科技发展最活跃的领域之一 (郭策等, 2005)。日本东京大学研制的生物蟑螂机器人 (Holzer & Shimoyama, 1997) 和美国纽约州立大学研制的老鼠机器人 (Talwar *et al.*, 2002) 是该领域发展的典型代表。

壁虎在各种表面 (地面、墙壁和天花板) 上有着超凡自如的运动能力, 可以实现全空间无障碍运动。产自我国广西、云南等地和东南亚的大壁虎 *Gekko gecko* 体态大、行动迅速、负重能力强, 适合作为研制动物机器人的目标对象 (郭策等, 2005)。研制动物

机器人的关键在于掌握动物脑区参与的运动调控机制。针对大壁虎脑区参与的运动调控机制, 南京航空航天大学仿生结构及材料防护研究所 (以下简称南航仿生所) 做了大量的工作, 并取得了一定的进展 (王文波等, 2008)。

20 世纪 80 年代后, 随着脑科学及神经生理学的发展, 针对哺乳动物进行的运动诱导开始大量涌现 (Armstrong, 1986; Mori, 1987; Sinnamon, 1993; Whelan, 1996), 研究表明电刺激或化学刺激猫中脑均能诱发运动行为, “中脑运动区”的概念被提出 (Larry, 1998)。大壁虎属爬行纲动物, 目前针对爬行纲动物的运动诱导研究数量相对较少。Robert

收稿日期: 2010-11-29 接受日期: 2011-01-06 基金项目: 国家自然科学基金重大国际合作项目 (No. 60910007); 国家自然科学基金 (No. 30700068)  
作者简介: 王文波 (1971 ~), 男, 博士, 研究方向: 动物机器人, E-mail: wwb523@163.com; 范佳 (1985 ~), 男, 硕士研究生, 研究方向: 动物机器人, E-mail: macj\_f@163.com

#同等贡献作者 \*通讯作者 Corresponding author, E-mail: zddai@nuaa.edu.cn

(1982)对西方剑蜥端脑纹状体及中脑所在的脑干进行电刺激,其中对端脑的电刺激诱导出鸣叫及攻击行为,对脑干的电刺激诱导出转圈、翻滚及蜷曲等基本运动行为。Distel(1978)通过对绿鬣蜥端脑、间脑、中脑及延髓进行电刺激,发现中脑顶盖及被盖在电极刺激下能诱导出多种不同的行为,如抬头、行进、飞逃等,反应类型及强度也会随着刺激位点的深浅变化有所不同。以上研究均对同属爬行纲动物大壁虎的运动诱导及大壁虎动物机器人的研制具有参考价值。

南航仿生所采用不锈钢微电极对浅麻醉且头部固定状态及清醒状态下的大壁虎中脑分别进行电刺激,均发现中脑后延被盖区域具有较好的诱导脊柱转向的功能(王文波等,2008)。但是,目前进行的针对大壁虎的运动诱导只是初步验证了通过电刺激可以实现大壁虎的转向运动及四肢运动,大体确定了诱导这些运动的中脑相关脑区。急性实验发现,电刺激大壁虎中脑不同深度会出现脊柱同侧弯曲和脊柱对侧弯曲两种不同模式。为进一步研究大壁虎中脑脊柱侧弯运动亚区分布上的差异性,本文以浅麻醉状态下的大壁虎为研究对象,运用金属微电极对大壁虎中脑脑区进行电刺激实验,对实验过程出现的诱发不同方向(同侧/对侧)脊柱侧弯位点采用普鲁士蓝法标记,并在随后的脑组织切片染色中进行组织学检验。本文通过对大壁虎中脑运动区控制两类脊柱侧弯的亚区的研究,为研制可靠、持久、精确的大壁虎动物机器人的运动调控提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

10 只成年大壁虎被用于本实验研究。大壁虎平均体重  $51.8 \text{ g} \pm 8 \text{ g}$ , S-V 体长(snout-to-vent length, 从吻部鼻尖到泄殖腔孔)  $146 \text{ mm} \pm 7 \text{ mm}$ , 购于广西。购回后的动物在壁虎饲养室习服两周后用于实验。饲养室提供足量食物及水供大壁虎自由摄取,室温及光照与动物生长的自然环境相似。

### 1.2 实验用试剂

0.4% 戊巴比妥钠溶液、0.8% 生理盐水、1% 中性红溶液、含 2% 亚铁氰化钾的 10% 福尔马林溶液。

### 1.3 实验仪器

手术及微电极植入环节在已研制的大壁虎专用脑立体定位仪上进行。不锈钢微电极( $\varphi = 130 \mu\text{m}$ , 聚氨酯绝缘涂层), LZJ-4D 手术显微镜, 手持式颅钻

(STRONG90, 韩国), YC-2-S 双极型程控刺激器, 冰冻切片机(Leica-CM1950, 德国), 超景深三维显微镜(KEYENCE-VHX-600, 日本)。

### 1.4 手术及微电极植入

**1.4.1 麻醉与固定** 大壁虎腹腔注射 0.4% 戊巴比妥钠  $0.75 \text{ mL}/100 \text{ g}$  (体重) 进行麻醉, 待完全麻醉后(呼吸频率 8 次/min, 全身肌肉松弛, 对痛刺激无明显反应), 剪开头部皮肤, 暴露额骨和顶骨, 利用双氧水去除颅骨表面残余结缔组织, 暴露鼻点和凶点。按大壁虎立体定位方法将其固定在立体定位仪上(王文波等, 2007)。

**1.4.2 开颅手术** 大体确定中脑脑区位置后, 采用手持式颅钻对麻醉状态下的大壁虎行开颅术, 取下部分颅骨骨块, 在手术显微镜下剪去硬脑膜, 暴露中脑脑区, 之后掀去蛛网膜。

### 1.5 脑内电刺激与行为观测

**1.5.1 大壁虎浅麻醉状态下的急性普查实验** 开颅手术后等待一段时间, 大壁虎进入浅麻醉状态。在中脑脑区的急性电刺激位点(分布如图 1 所示, 相邻刺激位点的间隔为  $500 \mu\text{m}$ ), 刺激电极尖端通过三维定位仪上的进给机构推送入中脑后, 以刺激器输出的矩形负脉冲(频率 80 Hz、刺激强度  $10 \sim 40 \mu\text{A}$ ) 为刺激信号, 对电极所在的中脑位点实施  $1 \sim 3 \text{ s}$  的电刺激, 观察大壁虎在刺激期间的动作反应。若无反应则向下进给电极  $50 \mu\text{m}$  以相同参数继续刺激, 若大壁虎出现明显运动反应则逐渐降低刺激强度直至诱发该行为反应的刺激阈值。对电刺激下诱发同侧、对侧两种脊柱侧弯动作的刺激位点进行蓝点标记, 供后续的组织学定位检验。

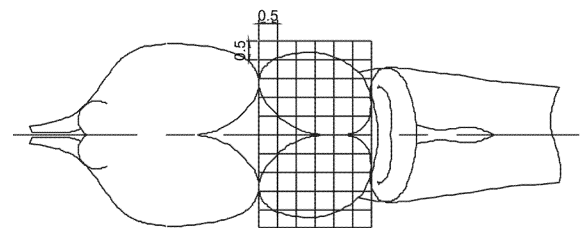


图 1 大壁虎中脑刺激位点分布  
Fig. 1 Distribution of stimulation sites in mesencephalon of *Gekko gekko*

### 1.5.2 动作分析及电刺激诱发动作行为的考察范围

脊柱侧弯指脊柱向躯体的某一侧弯曲, 是大壁虎的一种基本动作模式, 在其行进或转向等行为活动中均能发现脊柱侧弯, 该动作常伴随脊柱一侧前后肢的内收、脊柱另一侧前后肢的外伸行为同时出现。脊柱同侧或对侧弯曲是相对刺激微电极所处位

置而言,同侧弯曲指脊柱凸向刺激电极同侧,对侧弯曲则相反。

本文着重讨论急性普查实验中出现的在同一刺激针道不同深度诱发相反脊柱侧弯动作的刺激位点,在电刺激下出现的四肢动、鸣叫、呼吸强度增加、脊柱上弓、瞳孔变化、吐舌……等行为均予以记录,但在本文不作详细讨论。同时,诱发两种相反脊柱侧弯运动的刺激针道按照电刺激下随着电极深度的降低,先诱发脊柱同侧弯曲后诱发脊柱对侧弯曲,或先诱发脊柱对侧弯曲后诱发脊柱同侧弯曲分为两种类型。

1.6 组织学定位检查

对电刺激实验中诱发相反脊柱侧弯动作的位点通以阳极直流电 60  $\mu$ A,持续 20 s,以进行普鲁士蓝法组织学标记。实验结束后对大壁虎进行主动脉灌注,取脑固定,将脑浸泡于 10% 福尔马林溶液中至少 3 d,之后采用 LEICA CM1950 冰冻切片机对大壁虎脑进行冠状切片,切片厚 30  $\mu$ m。切片采用常规中性红染色,光镜下鉴定标记位点位置。

2 结果

急性实验共使用 10 只大壁虎,在中脑区域共计电刺激探查了 153 个针道,除少数(14 个)无任何反应外,大部分在电刺激下均诱发了动作反应。其中 30 个针道在电刺激下于不同探查深度诱导了大壁虎脊柱同侧、对侧两种相反方向的弯曲动作。另外,有 69 个刺激针道单一地诱发了脊柱对侧弯曲运动,

17 个刺激针道单一地诱发了脊柱同侧弯曲运动。

2.1 同一刺激针道于较浅脑区诱发脊柱同侧弯曲,于较深脑区诱发脊柱对侧弯曲

电刺激实验在较多刺激针道诱发了这种类型的运动行为。对于这种反应序列,随着电极在中脑区域深度的下降,大壁虎一般首先发起脊柱上弓、呼吸强度增加等运动,随后脊柱同侧弯曲会伴随着以上反应出现,脊柱同侧弯曲出现到消失的深度区域一般为围脑室灰质区及其附近;当电极到达背侧被盖后,大壁虎开始出现脊柱对侧弯曲的运动反应,脊柱对侧弯曲一般会持续出现至腹侧被盖下缘消失。少数针道(4 个)在电刺激下除先后诱发大壁虎脊柱同侧、对侧弯曲外,其他行为反应如脊柱上弓、呼吸强度增加等没有出现。在脑立体定位仪上(王文波等,2007),此类行为位点分布的大致区域(相对凶点,即立体定位仪上的定位基准点)是 X 方向(左右)0.4 ~ 1.4 mm、Y 方向(前后)5.4 ~ 7.3 mm,该类反应位点出现的高频区域在 X 方向 0.4 ~ 1.3 mm、Y 方向 6.0 ~ 7.0 mm 限定的狭小区域。

2.2 同一刺激针道于较浅脑区诱发脊柱对侧弯曲,于较深脑区诱发脊柱同侧弯曲

电刺激实验中共计在 3 个针道诱发了这种类型的运动行为,数量微少。这 3 个针道在大壁虎中脑外表面刺激起始点相对凶点的平面坐标(X, Y)分别是(0.9, -6.5), (1.8, -6.5), (-0.7, -6.8),其在不同深度脑区刺激诱发的动作模式如表所示(单位:mm)。

表 部分诱发相反方向脊柱侧弯针道的电刺激结果  
Table Electrical stimulation results of some tracts that elicited inversus spinal bending

| 平面坐标<br>(X, Y) | 不同深度脑区刺激诱发的动作(mm) |                 |             |               |               |                  |           |
|----------------|-------------------|-----------------|-------------|---------------|---------------|------------------|-----------|
|                | 0~0.5             | 0.6~1.0         | 1.1~1.5     | 1.6~2.0       | 2.1~2.5       | 2.6~3.0          | 3.0~3.5   |
| (0.9, -6.5)    | 脊柱对侧弯曲            | 脊柱对侧弯曲;四肢动;脊柱上弓 | 脊柱对侧弯曲;脊柱上弓 | 脊柱同侧弯曲        | 无反应           | 无反应              | 无反应       |
| (1.8, -6.5)    | 无反应               | 无反应             | 无反应         | 脊柱对侧弯曲;四肢动;摆尾 | 脊柱对侧弯曲;四肢动;摆尾 | 脊柱对侧弯曲;四肢动;脊柱同侧弯 | 脊柱同侧弯曲;鸣叫 |
| (-0.7, -6.8)   | 脊柱对侧弯曲            | 脊柱对侧弯曲          | 脊柱对侧弯曲;四肢动  | 脊柱对侧弯曲;呼吸强度增加 | 脊柱对侧弯曲;脊柱同侧弯曲 | 脊柱同侧弯曲           | 无反应       |

2.3 组织学检验

为确定相反方向脊柱侧弯运动亚区在大壁虎中脑脑区的具体位置,运用普鲁士蓝法对诱发相反方向脊柱侧弯刺激针道中的脊柱同侧、对侧弯位点进行标记,标记位置均位于各自反应较强烈的区域。

组织学检验表明,对于大多数标记位点,脊柱同侧弯曲动作的核心区域位于围脑室灰质区内,脊柱对侧弯曲行为的核心区域位于腹侧被盖下端。图 2(封 2)为诱发相反脊柱侧弯动作的标记位点,冠状切片左上方标记位点诱发大壁虎脊柱同侧弯曲,左下方

及右下方标记位点诱发大壁虎脊柱对侧弯曲。

### 3 讨论

#### 3.1 大壁虎中脑脊柱对侧弯亚区较同侧弯亚区分布范围更广

通过对 10 只大壁虎进行的中脑急性电刺激实验,在探查的 153 个针道中,有 30 个刺激针道可在不同深度脑区诱发大壁虎两种相反方向的脊柱侧弯动作。在这 30 个刺激针道,诱发脊柱同侧弯位点多数分布于围脑室灰质区内部及边缘,诱发脊柱对侧弯位点在背侧、腹侧被盖等更大的区域内分布。另外,17 个刺激针道单一地诱发了脊柱同侧弯曲动作,且均分布在中脑中后部矢状缝左右旁开 1.3 mm 以内的狭长脑区内,69 个刺激针道单一地诱发了脊柱对侧弯曲动作,该类单一诱发脊柱对侧弯曲刺激针道在中脑中后部矢状缝左右旁开 2.1 mm 的脑区范围内均有分布,可见大壁虎中脑脊柱对侧弯亚区不论在中脑脑区分布的深度范围还是广度范围上均较同侧弯亚区分布更广泛。

#### 3.2 脊柱侧弯运动分区的初步划分

根据实验记录,结合组织切片中脊柱不同方向(同侧、对侧)侧弯标记位点的位置,初步对大壁虎中脑脊柱侧弯运动亚区进行划分(封 2,图 3)。

#### 3.3 组织学

对实验后的大壁虎中脑进行组织切片、染色,通过在显微镜下观察,发现大壁虎中脑脊柱同侧弯曲运动核团与脊柱对侧弯曲运动核团在细胞构筑上存在差异:脊柱同侧弯曲运动核团的细胞较密集,神经元胞体粒度更大,且形状多类似圆形;脊柱对侧弯曲运动核团内则更多见细长形胞体(封 2,图 2)。电刺激普查过程中,所刺激中脑区域可能包括红核(red

nucleus)、中脑深核(nucleus profundus mesencephali)及黑质网状部(substantia nigra, pars. reticularis)等。南航仿生所目前正在进行大壁虎中脑内神经核团细胞构筑方面的相关研究。

### 4 参考文献

- 郭策,戴振东,孙久荣. 2005. 生物机器人的研究现状及其未来发展[J]. 机器人, 27(2): 182 ~ 192.
- 王文波,戴振东,孙久荣,等. 2007. 大壁虎脑立体定位的方法与装置[J]. 科学通报, 52(21): 2524 ~ 2528.
- 王文波,戴振东,孙久荣,等. 2008. 电刺激大壁虎诱导运动转向的研究[J]. 自然科学进展, 18(9): 979 ~ 986.
- Armstrong DM. 1986. Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat[J]. Prog Neurobiol, 26: 273 ~ 361.
- Distel H. 1978. Behavior and electrical brain stimulation in the Green Iguana, *Iguana iguana* L. II. Stimulation Effects[J]. Exp Brain Res, 31: 353 ~ 367.
- Holzer R, Shimoyama I. 1997. Locomotion control of a bio-robotic system via electric stimulation[A]. Proceedings of the IEEE International Conference[C]. France: 1514 ~ 1519.
- Larry M Jordan. 1998. Initiation of Locomotion in Mammals[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 860: 83 ~ 93.
- Mori S. 1987. Integration of posture and locomotion in acute decerebrate cats and in awake, freely moving cats[J]. Neurobiol, 28: 161 ~ 195.
- Robert. 1982. Species typical display behavior following stimulation of the reptilian striatum[J]. Physiology & Behavior, 29: 615 ~ 620.
- Sinnamon HM. 1993. Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of locomotion in the anesthetized rat[J]. Neurobiol, 41: 323 ~ 344.
- Talwar SK, Xu SH, Hawley ES, et al. 2002. Direct brain stimulation enables training of complex behaviors in freely roaming animals[A]. Proceedings of the Second Joint EMBS/BMES Conference[C]: 2706 ~ 2707.
- Whelan PJ. 1996. Control of locomotion in the decerebrate cat[J]. Neurobiol, 49(5): 481 ~ 515.