

大壁虎脑立体定位的方法与装置

王文波 郭策 孙久荣* 戴振东*

(南京航空航天大学仿生结构与材料防护研究所, 南京 210016; 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

* 联系人, E-mail: sjr@pku.edu.cn, zddai@nuaa.edu.cn

摘要 壁虎具有卓越的三维空间无障碍运动能力, 其脚掌的黏附机制成为国内外生物物理研究的热点, 其运动规律成为非结构环境下机器人和生物机器人研究的良好模型。为揭示大壁虎(*Gekko gecko*)脑内运动功能的时空编码规律, 首先对大壁虎的运动进行干预, 提出了一种大壁虎脑立体定位方法, 并根据大壁虎颅骨结构研制了相应的脑立体定位装置。该装置与通用脑立体定位仪相匹配, 定位准确、操作简单, 适用于不同大小的成年大壁虎的脑部实验。通过大壁虎脑图谱的初步制作、脑内核团的损毁以及脑内特异性运动核团的空间定位等诸多实验验证, 该装置能够满足大壁虎脑功能的研究需要。

关键词 壁虎 大壁虎 脑立体定位仪 定位方法

壁虎具有超凡的三维空间无障碍(TDOF, three dimensional obstacle-free)运动能力, 成为TDOF机器人研究开发的仿生楷模。国内外对大壁虎脚掌的黏附机制^[1,2]、运动系统的对比解剖^[3]、刚毛的组织生物化学^[4]等方面均有了很好的研究, 研究成果用于指导仿生壁虎刚毛及仿生壁虎脚掌的研究^[5], 所研制的仿生刚毛还存在黏附能力远低于壁虎的天然刚毛, 且会发生自身粘连等问题。仿生机器人在运动平稳性、灵活性、健壮性、环境适应性及能源利用效率等方面远远落后于动物^[6], 电源容量成为限制机器人工作时间的瓶颈, 且难于在短时间内获得大幅度改善^[7]。大壁虎如果能像大鼠^[8]那样实现运动的人工干预, 将是TDOF机器人的一场革命! 为了达到上述目标, 必须研究大壁虎脑区运动相关核团的空间分布规律, 并揭示其神经电信号的时空编码规律, 而建立大壁虎的脑立体定位方法并研制相关定位夹持装置是开展上述研究的前提和基础。

1908年, Horsley和Clarke首先将立体定位技术用于中枢神经系统的研究。此后, 立体定位技术便被广泛地运用于脑的损毁、刺激和脑电记录的精确定位中, 成为研究脑结构和功能必不可少的工具^[9]。常用的实验动物, 如大鼠、小鼠、猫等高等哺乳动物以及鸟类均有完全的外耳道, 可以用(耳棒)来定位^[10]。而大壁虎外耳道只具雏形^[11], 无法作为定位的基准。Distel^[12]在固定绿鬣蜥时, 将一个有机玻璃板置于上下

颌骨之间, 并使楔形圆边抵住嘴角, 通过一个压杆压住额鼻骨的边缘使其固定在有机玻璃板上。并选顶眼中心作为参考基准点, 水平零平面为平行于定位仪水平面且低于通过顶眼中心6 mm的水平面。Greenberg^[13]研究安乐蜥时, 在Distel方法的基础上, 通过在安乐蜥两侧耳内涂抹牙科水泥, 然后插入耳棒进行辅助固定。姜世英长期从事大壁虎脑功能的研究, 所采用的固定方法与Del Corral等人^[14]研究蜥蜴所采用的固定方法类似。将大壁虎固定于解剖板上, 采用三个经改造的鳄鱼夹分别夹持大壁虎的吻部与两侧耳孔附近的皮肤, 但因皮肤松动, 难以保证可靠夹紧和准确定位, 且夹持装置独立于脑立体定位仪。

上述工作提供了有益的借鉴, 但却不适于大壁虎脑部的可靠固定和准确定位。为此本文提出了一种新的大壁虎脑立体定位方法, 研制了可与通用立体定位仪匹配的大壁虎脑立体定位装置。

1 大壁虎脑立体定位方法

1.1 实验动物及其解剖

实验用大壁虎(*Gekko gecko*)属爬行纲(Reptilia), 有鳞目(Squamata), 蜥蜴亚目(Lacertilia), 壁虎科(Gekkonidae)。经批准由广西南宁购回并经实验室饲养两个月以上成年大壁虎, 雌雄不限, 其吻部到泄殖孔的体长(snout-to-vent length, SV 体长)(156 ± 8 mm,

2007-06-29 收稿, 2007-09-18 接受

国家自然科学基金重点项目(批准号: 60535020)、面上项目(批准号: 30400086, 30570238)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2007AA-04Z201)资助

体重(67.5 ± 12.2) g ($n=30$).

陈振昆和丁光^[15]对大壁虎骨骼系统的研究表明,大壁虎的颅骨表面具有明显的解剖学标志.如图 1(a)和(b)所示,大壁虎额骨与顶骨间具有明显的冠状骨缝——冠状缝;一对顶骨之间也有比较明显的分界线——矢状缝;两块鼻骨以及鼻骨与额骨之间亦存在明显的分界线.冠状缝与矢状缝的交点即为囟点(图 1 中 B 点);另外,我们将鼻骨与额骨相接点定义为鼻点(图 1 中 A 点).在地面的自然栖息状态下,成年大壁虎头部下颌与地面相贴时囟点比鼻点要高,统计值为(4.8 ± 0.3) mm ($n=30$).

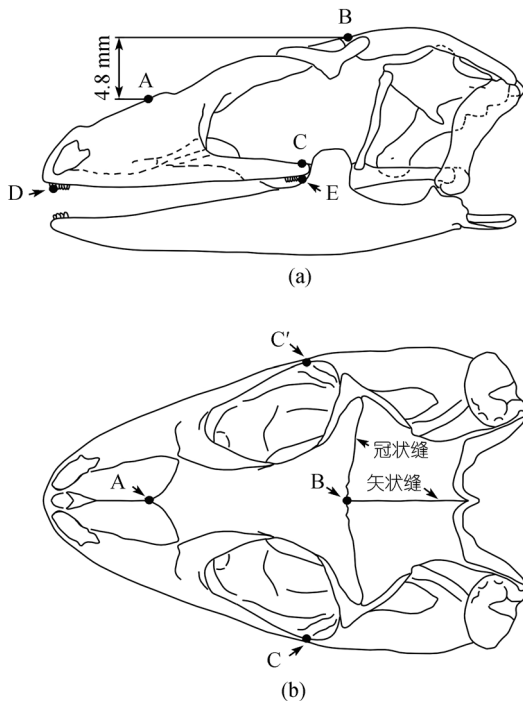


图 1 大壁虎头部定位与夹持点示意图

(a) 侧面观; (b) 背面观. A, 鼻点; B, 囟点; C, 两侧眼眶下缘最低点; D, 上颌齿顶夹持点; E, 两侧眼眶下缘最低点处的上颌齿顶

结构解剖表明,构成大壁虎颅骨的各骨块大多没有完全愈合,不具备哺乳动物和鸟类那样致密牢固的颅腔^[16](与鸟类和哺乳动物不同的是脑与颅腔间隙较大^[12]),脑组织腹面基本为软骨、结缔组织和肌肉组织所支撑.因此,大壁虎颅骨刚性较低,脑组织易发生弹性移位.大壁虎头骨前方两侧有一对上颌骨,其上长有锥状、细密的侧生型单尖齿^[17];一对颞骨位于上颌骨后部上缘,与上颌骨后部一起构成眼眶下缘.

1.2 大壁虎脑立体定位方法

() 定位夹持点的确定. 选择位于头部两侧眼眶下缘最低点(图 1(b)中 C 和 C'点)和上颌吻部齿顶(图 1(a)中 D 点)作为立体定位的夹持点,三点定位确定颅骨位置.大壁虎头部颞骨后部的两侧眼眶下缘最低点的骨结构具有唯一性,能够定位并夹持,这两处一旦定位,则保证了大壁虎颅骨两侧水平和对中;再通过上颌吻部齿顶的夹持,调节头部的俯仰角度,可使大壁虎头部水平基准面与脑立体定位仪的水平基准面相平行.

() 定位基准面的确定. 以囟点为定位基准点(原点),鼻点为辅助基准点.以立体定位仪水平面为基准,确定通过囟点,高于鼻点 4.8 mm 并平行于头部两侧眼眶下缘最低点连线的平面为水平基准面;通过囟点和鼻点且垂直于水平基准面的平面为矢状基准面;通过囟点且与水平基准面和矢状平面相垂直的平面为冠状基准面.

2 脑立体定位夹持装置的设计研制

2.1 脑立体定位夹持装置

从经济实用性出发,选择瑞沃德 MP8001 通用脑立体定位仪为平台,用铝合金和 45#钢制作夹持装置(图 2(a)).根据上述大壁虎脑立体定位方法,设计了夹持大壁虎头部两侧眼眶下缘最低点的眼杆夹持器(图 2(b), (d))和壁虎吻部齿顶夹持的适配器(图 2(c), (e)).两眼杆定位上表面与脑立体定位仪的水平基准面相平行,以保证头部水平定位;在上颌下夹头前端设计有小圆柱形凸台,用于卡住大壁虎吻部上颌骨牙齿内侧.由于大壁虎上颌的细密的单尖齿,以及大壁虎吻部鼻骨的自然斜面,使得上颌在上下夹头的夹持力下自然夹紧,可靠且不造成损伤.

2.2 大壁虎在脑立体定位仪上的固定

同常用实验动物的脑立体定位方法类似,麻醉后的大壁虎在立体定位仪上固定时必须按照所确定的脑立体定位方法进行校准,调节动物头部位置,使其三个基准面与立体定位仪相应的基准面平行.以确保大壁虎头部按照既定的标准位置固定在脑立体定位仪上.具体固定步骤是:将左右眼杆夹持器分别夹持大壁虎左右眼眶夹持点,利用立体定位仪上的定位校针和眼杆上的游标刻度调整左右眼杆相对位置,使通过囟点和鼻点的矢状基准面平行于脑立体定位仪的相应基准面(图 3(a));用壁虎适配器夹持大

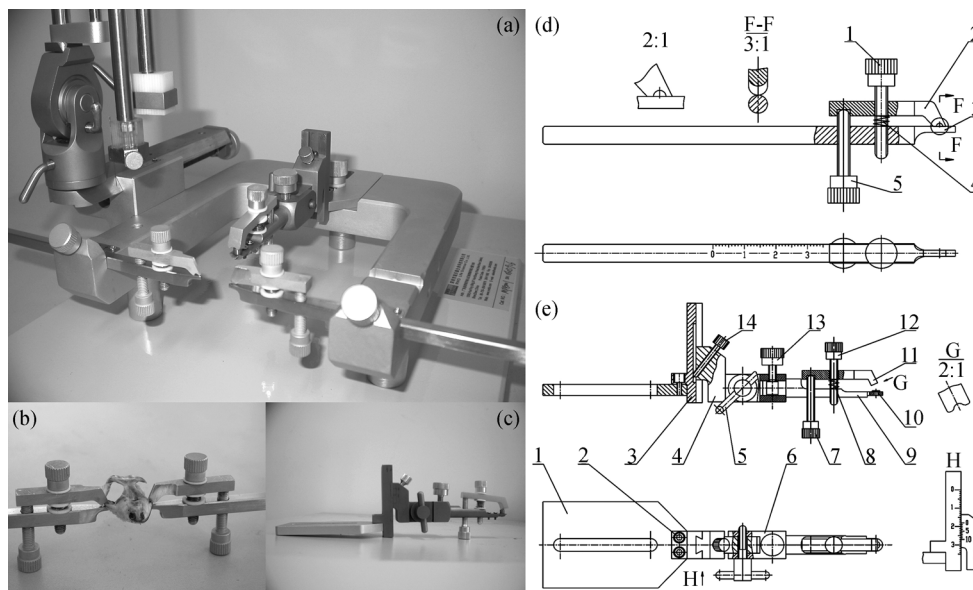


图2 大壁虎脑立体定位夹持装置

(a) 装配上眼杆夹持器和壁虎适配器的瑞沃德 MP8001 型通用脑立体定位仪; (b) 两侧眼杆夹持器; (c) 壁虎适配器; (d) 眼杆夹持器装配图: 1,5-锁紧螺钉, 2-上夹头, 3-眼杆, 4-复位弹簧; (e) 壁虎适配器装配图: 1-连接版, 2-螺钉, 3-固定支架, 4-滑动支架, 5-锁紧手柄, 6-连接头, 7,12,13,14-锁紧螺钉, 8-复位弹簧, 9-下夹头, 10-圆柱压头, 11-上夹头

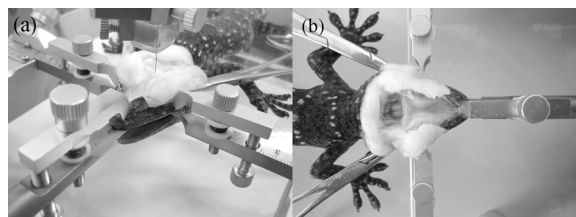


图3 定位仪上的校准(a)与开颅手术(b)

壁虎吻部, 上下方向调节, 确定囟点与鼻点的相对高度保持 (4.8 ± 0.3) mm, 使大壁虎立体定位的水平基准面平行于定位仪的水平面。这样, 经过精细校准并将大壁虎头部固定, 即可开颅开展脑内核团刺激与记录等实验(图 3(b))。

3 结果

利用研制的大壁虎脑立体定位仪进行了大壁虎脑图谱的初步制作(如图 4(A,B)脑图谱局部, 石蜡切片, HE染色, 切片厚 $10 \mu\text{m}$), 观测了大壁虎大脑皮层的躯体感觉运动区, 进行了大脑DVR(脑图谱坐标, AP(前后): $0.95 \sim 3.77$; L/R(左右): $0.57 \sim 2.29$; H(上下): $1.75 \sim 2.95$)腹侧的损毁标记(图 4(A₁)), 准确率为 90% ($n=10$), 以及中脑特异性运动核团X(研究结果待发表)的刺激和标记(图 4(B₁))。结果表明, 脑立体定位装置操作简单, 与通用脑立体定位仪相容, 适于不同大小

的成年大壁虎的脑部实验, 定位比较准确、重复性、稳定性较好, 填补了壁虎类爬行动物没有专用脑立体定位仪的空白 [18]。

4 讨论

4.1 定位基准的确定原则

爬行动物脑组织的增增长远落后于其颅骨的增长。这使得受脑膜和软骨支持的脑组织和颅骨之间的结合逐渐松弛 [13]。因此, 保持大壁虎固定在立体定位仪上自然的静息体位就显得尤为重要。因为非自然夹持体位将牵拉脊髓, 进而牵动与其相连的脑组织。考虑到这一点, 根据统计结果, 我们规定水平基准面通过囟点且高于鼻点 4.8 mm。通过校准使大壁虎囟点高于鼻点 (4.8 ± 0.3) mm, 以保证大壁虎头部定位夹持状态尽可能接近其静息状态, 使其脑组织在立体定位仪上的空间位置和其静息状态时相一致。

4.2 定位精度的影响因素

脑立体定位的精度受到下列因素影响: (1) 立体定位仪的系统误差; (2) 校准定位误差: 包括头部对中误差, 囟点坐标的读数误差; (3) 颅骨和脑组织的弹性变形与移位。

大壁虎脑立体定位夹持装置的设计是以商品化的标准脑立体定位仪为平台进行的, 产生前两项误

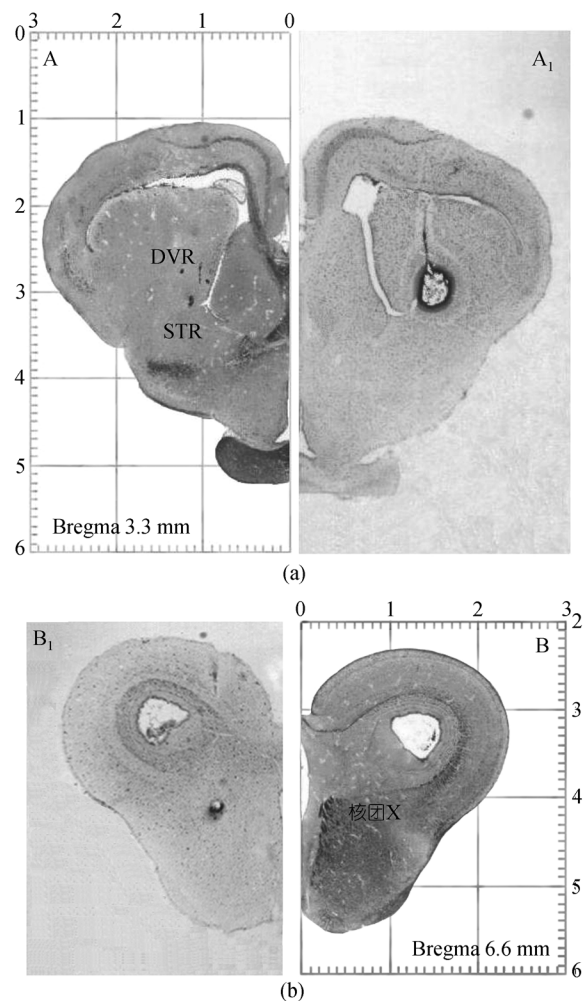


图 4 蓝点标记组织切片
(a) 大脑; (b) 中脑. A₁, 大脑腹侧 DVR 损毁标记; B₁, 中脑为蓝点标记组织切片; A, B 分别为对应的脑图谱; 图中 A₁, B₁ 比例尺与相应脑图谱标尺相同(mm); A₁, B₁ 均为冰冻切片, 厚 30 μm, 中性红染色

差的相关因素与标准脑立体定位仪的相同. 同常用实验动物的立体定位一样, 由于采用颅骨表面的解剖学标志作为定位点/线, 操作人员不同, 必然产生头部对中误差和脑点坐标的读数误差. 为减少定位误差, 一次实验中所有的定位校准应由熟悉定位仪使用的操作人员一人完成. 比较而言, 我们更关注第三个因素. 因为大壁虎颅骨解剖上的特点(如前述颅骨刚性不足和脑组织的弹性移位)决定了大壁虎脑立体定位误差比哺乳动物和鸟类的大, 这要求校准定位操作应自然适度, 以减小弹性变形对定位精度的影响.

4.3 重复定位精度

由于特殊需要, 有时在一次实验中会将大壁虎

进行重复定位. 为检验我们研制的定位夹持装置的重定位精度, 我们将所设计的眼杆夹持器和壁虎适配器装配在瑞沃德 MP8001 型通用脑立体定位仪上, 利用定位仪上的三维标尺读取测试点的三维坐标: x , 左右(两耳杆连线)方向, 平行于大壁虎脑立体定位的水平基准面和冠状基准面的交线; y , 前后(动物的吻部到尾部)方向, 平行于水平基准面和矢状基准面交线; z , 深度(由动物的背侧指向腹侧)方向, 垂直于水平基准面. 通过实验确定如下重复定位步骤: (1) 大壁虎第一次定位好后, 在颅骨表面的左右对称面上用针灸针作一标记点(点直径小于 0.2 mm), 并记下该点在脑立体定位仪上的三维坐标; (2) 取下大壁虎重复定位时, 仅打开三个夹持部位上夹头将大壁虎取下, 而保持下夹头位置不变; (3) 重复定位时, 微调大壁虎头部方位, 保持标记点 x 坐标不变. 按照这三个步骤, 我们选取三只个体差异较大的大壁虎进行重复定位精度的检验($n=8$), 得到表 1 所示大壁虎脑立体定位的重复定位精度.

表 1 重复定位精度检验($n=8$)			
大壁虎	脑点坐标/mm		
	x	y	z
No. 1 (65.6 g, SV 长: 154 mm)	15.8	52.2±0.13	45.63±0.09
No. 2 (47.38 g, SV 长: 148 mm)	17.0	58.6±0.12	46.92±0.07
No. 3 (77.53 g, SV 长: 168 mm)	15.6	53.4±0.13	51.5±0.12

大壁虎脑解剖和组织学研究可得到脑内核团典型尺寸的大小. 如背侧室嵴(DVR)的典型尺寸为头尾径约 2.82 mm, 左右径约 1.72 mm, 垂直径约为 1.2 mm, 距皮层表面深度约 0.65 mm^[19]. 其皮质加厚区的背侧部典型值为背腹径约为 0.68 mm, 内外径约为 0.44 mm^[20], 可见按照上述重复定位步骤, 本装置的重定位精度小于脑内核团的主要尺寸, 可以满足实验的定位要求(同其他所有用脑定位仪作脑内刺激或记录神经元电活动的实验一样, 通常最后要作组织学切片定位, 以确定电极所在位置). 但一般实验时, 大壁虎在脑立体定位仪上定位后, 不将其取下. 如果不能避免, 则应按上述重复定位步骤进行定位.

4.4 脑图谱制作与组织切片定位

() 作为立体定位技术的重要组成部分, 脑图谱已经成为现代神经科学研究必不可少的工具. 现代脑图谱的制作中, 为确保脑图谱中脑切片立体定向的正确方位, 必须借助立体定位仪在动物脑内垂直于水平面和冠状面制作参考针道^[9,21]. 大壁虎脑立

体定位的方法与装置的建立无疑使得制作一套可用于指导大壁虎脑功能实验的定位准确的大壁虎脑图谱成为可能。将损毁及蓝点标记的脑组织切片结果与利用研制的脑立体定位仪初步制作的大壁虎脑图谱(图4)相对照,我们不难发现实际脑切片与脑图谱之间存在一定差异(图4)。主要由两方面因素造成这种差异:首先,大壁虎个体差异及其脑组织的变形与移位造成颅外基准与颅内组织的空间位置发生变化,切片大小也不完全相同;其次,切片时脑组织的固定方位以及切片方法和厚度的不同也必然产生上述差异。

() 颅外和颅内空间坐标的关联是脑内核团空间定位以及脑图谱制作的一个关键问题。我们利用上述的定位夹持装置,进行了中脑特异性运动核团蓝点标记实验(图4)。以脑点为基准,利用不锈钢微电极,通过普鲁士蓝反应——蓝点实验,在脑内标记蓝点。通过冰冻组织切片,以蓝点的坐标为中介进行脑功能区的定位。采用此方法我们初步确定了中脑运动核团的空间分布,为人工制导大壁虎运动提供了有价值的信息。

致谢 衷心感谢姜世英教授和课题组吉爱红副教授、岳林教授对大壁虎脑立体定位装置提出的修改建议,以及马光磊同学在重复定位精度校验中所作的工作。

参 考 文 献

- 1 Autumn K, Liang Y A, Flsieh S T, et al. Adhesive force of a single gecko foot-flair. *Nature*, 2000, 405: 681—685[DOI]
- 2 戴振东, 孙久荣. 壁虎的运动及仿生研究进展. *自然科学进展*, 2006, 16(5): 519—523
- 3 Zaaf A, Van D R. Limb proportions in climbing and ground-dwelling geckos (Lepidosauria, Gekkonidae): A phylogenetically informed analysis. *Zoomorphology*, 2000, 121: 45—53[DOI]
- 4 Rizzo N W, Gardner K H, Walls D J, et al. Characterization of the structure and composition of gecko adhesive setae. *J R Soc Interf*, 2006, 3: 441—451[DOI]
- 5 Geim A K, Dubonos S V, Grigorieva I V, et al. Microfabricated adhesive mimicking gecko foot-hair. *Nature Mater*, 2003, 2(7): 461—463[DOI]
- 6 Dickinson M H, Farley C T, Full R J, et al. How animals move: An integrative view. *Science*, 2000, 288(7): 100—106[DOI]
- 7 戴振东, 张昊, 张明, 等. 非连续约束变结构机器人运动机构的仿生: 概念及模型. *科学通报*, 2007, 52(1): 1—4
- 8 Talwar S K, Xu S H, Hawley E S, et al. Rat navigation guided by remote control. *Nature*, 2002, 417(2): 37—38[DOI]
- 9 Karten H J, Hodos W. *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (Columba livia)*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1967
- 10 李永材, 马际春. *动物生理及比较生理实验*. 北京: 高等教育出版社, 1989. 275—279
- 11 刘晓燕. 鳄鱼、大壁虎内耳的解剖学研究. *解剖学研究*, 1999, 21(1): 4—7
- 12 Distel H. Behavior and electrical brain stimulation in the green iguana, *Iguana iguana* L. Schematic brain atlas and stimulation device. *Brain Behav Evol*, 1976, 13: 421—450
- 13 Greenberg N. A forebrain atlas and stereotaxic technique for the lizard, *Anolis carolinensis*. *J Morphol*, 1982, 174: 217—236[DOI]
- 14 Del Corral J M, Miralles A, Nicolau M C, et al. Stereotaxic atlas for the lizard *Gallitia Galloti*. *Prog Neurobiol*, 1990, 34(3): 185—196[DOI]
- 15 陈振昆, 丁光. 大壁虎(*Gekko gekko*)骨骼系统的解剖. *云南农业大学学报*, 1990, 5(1): 1—6
- 16 杨安峰, 程红. *脊椎动物比较解剖学*. 北京: 北京大学出版社, 1999. 109—128
- 17 李永项, 薛祥熙, 李晓晨, 等. 部分蜥蜴类牙齿特征补充. *动物学报*, 2003, 49(4): 547—550
- 18 王文波, 戴振东, 郭策, 等. 壁虎脑立体定位方法及装置. 中国专利, CN1887238, 2007-01-03
- 19 Smeets W J. A forebrain atlas of the lizard *Gekko gekko*. *J Comp Neurol*, 1986, 254: 1—19[DOI]
- 20 伍冠一. 蛤蚧皮质加厚区的细胞构筑与纤维联系研究. 硕士学位论文. 广西: 广西师范大学, 2003. 24—27
- 21 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2004. 7—12