

壁虎脚底刚毛的生物组织结构及其体外培养

弓娟琴 沈丹蓓 曾学思 郭策¹ 戴振东^{1*}(中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042; ¹南京航空航天大学仿生结构与材料防护研究所, 南京 210016)

摘要 用苏木素-伊红染色, 在显微镜下观察壁虎脚趾皮肤的组织学结构。对壁虎脚趾刚毛侧皮肤进行真皮、表皮分离, 参照皮肤上皮细胞的培养方法对壁虎表皮进行试验性体外原代培养, 并观察培养细胞的形态及其变化过程。本研究旨在探讨体外培养壁虎脚底刚毛细胞的可行性, 为研制基于人工培养的刚毛阵列作为仿壁虎机器人粘附脚垫提供依据。组织学观察发现, 壁虎脚底表皮细胞主要由多层索形细胞和单层圆形细胞组成, 在表层细胞的远端可见整齐排列的刚毛。用胰蛋白酶分离后可将表皮细胞分为两大类, 分别为胰蛋白酶敏感细胞和胰蛋白酶不敏感细胞, 对胰蛋白酶不敏感的三种细胞胞体较大, 其中表面有突起的细胞可能是成熟的刚毛细胞, 而胞壁光滑有折光的卵圆形细胞很可能是即将脱落或凋亡的刚毛细胞; 对胰蛋白酶敏感的圆形贴壁细胞有可能是尚未成熟或正在发育中的刚毛细胞。体外培养结果发现, 壁虎脚的表皮细胞包含多种细胞成分, 除与人类表皮细胞相似的角质形成细胞样细胞和色素样细胞外, 还发现了有别于人类表皮细胞的三类细胞, 我们暂且称为未确定细胞 1、2、3。未确定细胞 1 与人类的神经细胞极为相似, 推测这种细胞很可能是感应或调节壁虎脚底刚毛细胞运动的神经细胞; 未确定细胞 2 和 3 可能均为壁虎脚底的刚毛细胞, 形态不同可能与刚毛细胞所处的不同生长发育阶段有关, 未确定细胞 2 可能是处于生长期的刚毛细胞, 而未确定细胞 3 则可能是成熟的刚毛细胞。

关键词 大壁虎; 刚毛; 组织学结构; 细胞培养

壁虎为什么能“飞檐走壁”, 这个令人着迷的问题近年来再次引起学术界和工业界的广泛关注。近期研究发现这种能力与壁虎脚底存在的大量刚毛及其优异的粘附力有关。Autumn 等^[1,2]测定了壁虎单个刚毛的粘附力, 发现 50 万根刚毛组成的刚毛阵列能够提供远大于壁虎体重的粘附力, 确立范德华力是保证壁虎能够在墙面和天花板上粘附的物理机制。德国马普金属所 Huber 等^[3]的实验表明壁虎粘附力中也有毛细力的贡献。戴振东^[4]、郭策^[5]等研究表明刚毛结构的改变和刚毛是否离体对其粘附性能有显著影响。上述研究奠定了仿壁虎机器人粘附刚毛阵列的设计原则——有较大长细比、一定柔度和表面能、刚毛间不发生相互粘连、末端能够形成较大的接触面积。在该原则指导下, Sitti 等^[6]、Qu^[7,8]、Zhao 等^[9]用各种方法研制了仿壁虎脚底毛及阵列, 然而到目前为止这些仿生的刚毛阵列还没有投入实际使用的报道。在此背景下我们想到能否通过培养天然壁虎脚底刚毛的方法制造可用于仿壁虎机器人的粘附性刚毛阵列。Alibardi 等^[10]研究了壁虎刚毛的组织学和生物化学结构, 认为壁虎脚底刚毛可能是一个细胞样的结构, 即刚毛细胞, 而刚毛是刚毛细

胞的突起。本文从研究壁虎脚底皮肤的生物组织结构入手, 探讨分离和体外培养壁虎脚底刚毛细胞的方法及其可行性, 为后期用生物学方法制造仿生粘附刚毛阵列打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

来源于广西大新县宝圩蛤蚧养殖场的大壁虎(*G. gecko*)。

1.2 主要仪器和试剂

石蜡切片机(1900, 德国 Leica 公司), 显微镜(LX-71, 日本 Olympus 公司); Defined keratinocyte-SFM 培养基(Gibco 公司), 10% 新生牛血清(晶美生物工程有限公司), 乙二胺四乙酸(EDTA)钠盐(晶美生物工程有限公司), 胰蛋白酶(Gibco 公司)。

1.3 方法

1.3.1 取材 壁虎麻醉后, 用水刷洗壁虎脚趾后用

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2009-06-29

国家自然科学基金重点项目及面上项目资助(No.60535020, No.30770285)和国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2007AA04Z201)资助

* 通讯作者。Tel: 025-84892581, E-mail: zddai@nuaa.edu.cn

聚维酮碘溶液消毒皮肤,并用大量的生理盐水冲洗干净。无菌条件下剪下壁虎的脚趾。其中一脚趾于10%福尔马林固定送病理科做组织学检查。

1.3.2 组织学 壁虎脚趾经福尔马林固定、酒精脱水、石蜡包埋后,被切成5~7 μm厚的切片,采用苏木素-伊红染色,光学显微镜下观察壁虎脚趾的组织学结构。

1.3.3 细胞培养 将壁虎脚趾放入75%乙醇中浸泡2~3 min,用含10倍于常规量双抗的PBS浸泡两遍,每遍2~3 min。擦干水分,将壁虎脚趾的掌面剪下,切成0.2 cm×0.3 cm的小块,放入0.02% EDTA、0.25%胰蛋白酶中,4℃下消化过夜。次日取出,滤干水分,放入小平皿中,加入少量培养液,分离真皮,用培养液反复冲打皮肤碎块,吸取细胞悬液,用无菌纱布过滤一遍后放入培养瓶,37℃、5% CO₂下培养。

2 结果

2.1 组织学

2.1.1 壁虎脚的宏观结构 见图1。肉眼观察可

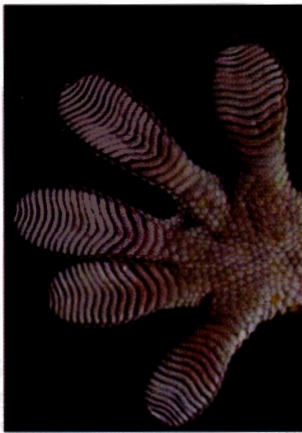


Fig.1 Structure of gecko foot and lamellar (1×)

见壁虎有5个脚趾,每个脚趾上分布13~18条横向类似于人字型平行排列的皮瓣,外形类似于毛刷样结构,质地柔韧。末端有脚爪。

2.1.2 壁虎脚底皮瓣的组织学结构 见图2A。沿脚趾和刚毛(垂直于图1)方向切片。显微镜下(放大200倍)可见壁虎脚底由表皮和真皮两部分组成,表皮层有4~5层细胞,主要由两种细胞组成,靠近真皮侧为3~4层呈叠加排列的索形细胞,表皮侧则为单层排列的圆形或椭圆形细胞,其远端可见整齐排列的刚毛。真皮层由结缔组织构成,其中可见血管和肌肉组织。

2.1.3 刚毛及刚毛细胞的微结构 见图2B和图2C。高倍显微镜(放大1 000倍)下观察壁虎脚底表皮侧细胞为单层整齐排列的圆形细胞,其远端可见整齐排列的刚毛。在刚毛的纵向切面中,可见细胞核位于刚毛的基部,刚毛则是表皮细胞的突起;横向切面可见刚毛呈束状点阵分布,4~5根为一束,刚毛内充满内容物,未见管、孔结构组织。

2.2 细胞培养

2.2.1 分离结果 用胰蛋白酶分离的新鲜细胞可分为两类,一类为对胰蛋白酶敏感的细胞,镜下呈现为大小不等的圆而亮的贴壁细胞(图3A)。另一类为对胰蛋白酶不敏感的细胞,镜下可见三种细胞,这三种细胞体积均较大,第一种为卵圆形细胞,胞壁光滑有折光,胞体折光较弱,无细胞突起,有少量细胞贴壁(图3B);第二种为角化了的表皮细胞,细胞不贴壁(图3B);第三种为疑似刚毛细胞,胞体大小与卵圆形细胞相似,在细胞的一端有两到三个长而直的突起,可见一个细胞的突起与另一细胞的突起相对而置,交叉连接,还可见几个排列整齐的细胞相对连接,细胞不贴壁(图3C)。

2.2.2 培养结果 (1)角质形成细胞样细胞:细胞

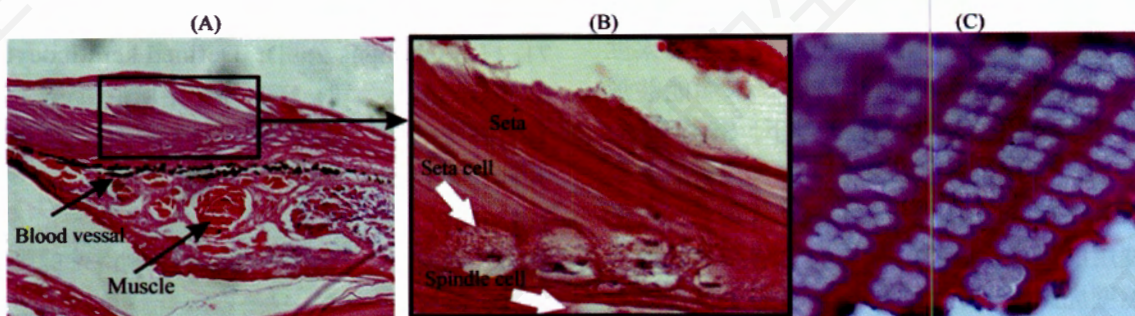


Fig.2 Histological structure of gecko foot, lamellar and setae

A: histological structure of setae array and seta cell (200×); B: microstructure of seta and seta cell (1 000×); C: cross-section of seta array near lamellar (1 000×).

体积较大, 呈多边形、扁平状, 细胞生长较快, 一周左右细胞团块间相互融合成片, 并开始呈复层生长, 半个月后细胞衰老脱落(图 4A)。(2)色素样细胞: 细胞呈

星形、多角形, 培养一周左右出现, 生长缓慢, 一个半月后衰老脱落(图 4B)。(3)未确定细胞 1: 细胞体积很小, 胞体两端有长长的突起, 成簇生长, 培养半个

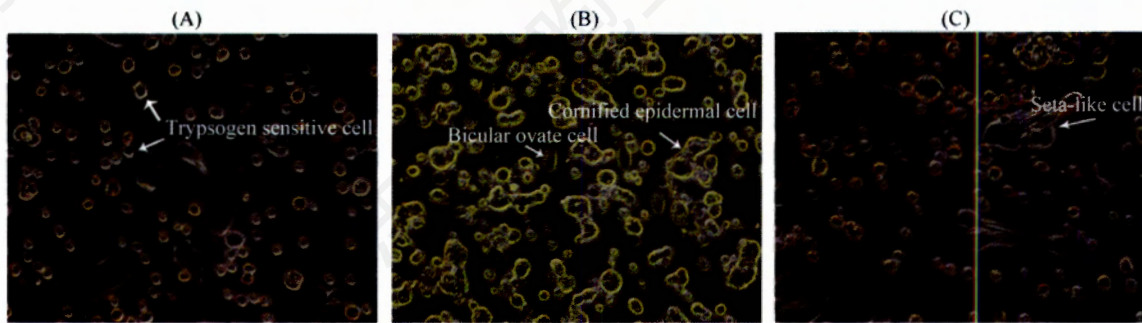


Fig.3 Fresh epidermal cell of gecko foot after separation by trypsin

A: trypsin sensitive cell; B: bicular-ovate cell and cornified epidermal cell; C: seta-like cell.

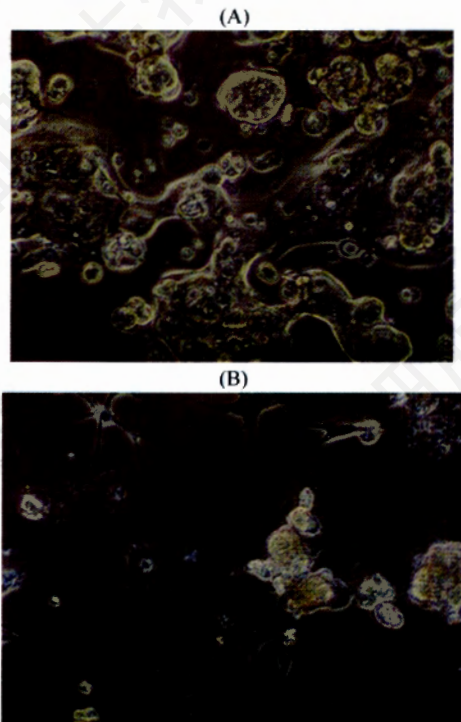


Fig.4 Cultured cell from epidermis of gecko foot

A: malpighian cell; B: pigment-like cell.

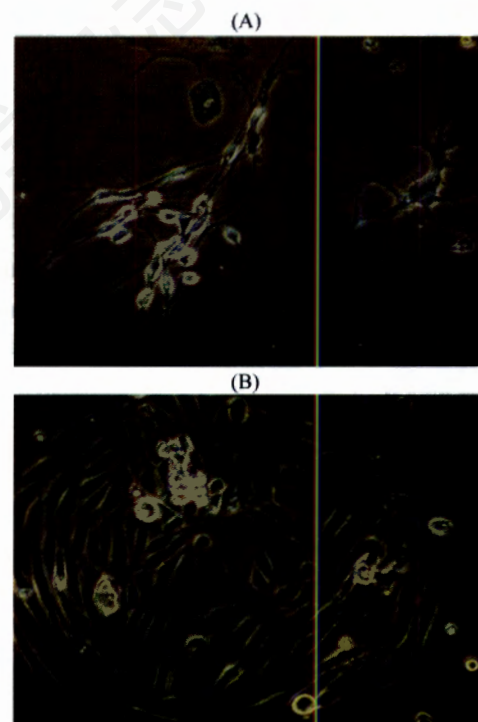


Fig.5 Morphology of two un-defined cells

A: un-defined cell 1; B: un-defined cell 2.

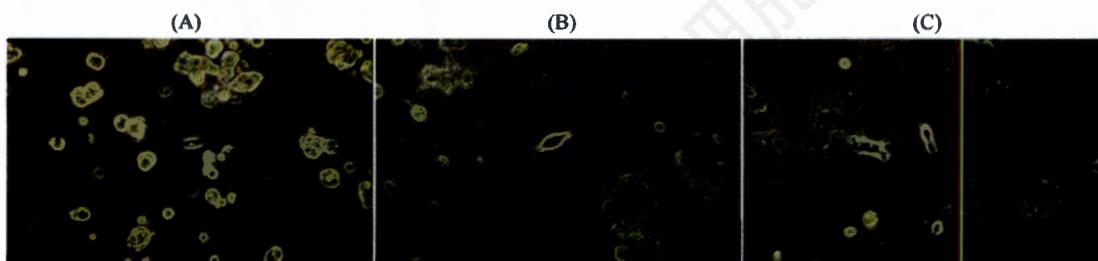


Fig.6 Evolution of morphology of un-defined cell 3 with time

A: initial orbicular-ovate cell; B: the cell cultivated one month; C: shedding or apoptosis cell.

月左右出现,一个月后衰老脱落(图 5A)。(4)未确定细胞 2: 细胞抱团生长,培养 2~3 天即可出现,起初为 3~4 个细胞抱成团,随着培养时间延长,细胞的增殖,细胞团块大约一个月左右细胞团块散开,细胞呈半月形、卵圆形。几天后细胞胞体很快回缩变小发亮,有的呈棒状、有的呈梭形,最后呈胰蛋白酶消化后的形态而脱落(图 5B)。(5)未确定细胞 3: 开始是对胰蛋白酶不敏感的卵圆形细胞,细胞少量贴壁生长但几乎不增殖(图 6A),大约一个月左右在细胞一端伸出一个直的突起(图 6B)。几天后便脱落(图 6C)。

3 讨论

人类一直惊叹动物的运动能力并积极向动物学习^[11,12],对壁虎超级运动能力产生兴趣可追溯到五千年前,科学的研究也有数十年的历史^[13]。进入 21 世纪以来,人们致力于壁虎粘附行为研究的目的是希望研制像壁虎一样能“飞檐走壁”的机器人。Sitti 等^[6]较早用微纳米加工方法制备仿生刚毛阵列,但粘附力较低,并且存在相互粘连和倒伏等问题。郭策等^[5]比较研究了大壁虎与无蹼壁虎脚底的刚毛结构与其粘附性能,实验证实壁虎脚底毛形态的规范性与其粘附性能正相关,改变脚底刚毛的形态可显著降低其粘附性能。无蹼壁虎具有更强的粘附性能,特别是其法向粘附性能更优于大壁虎。基于壁虎粘附的机制^[1],人们明确仿壁虎刚毛阵列仿生设计的关键因素:有一定长度的刚毛阵列,直径越小、刚毛密度越高,就可获得越大的粘附力。2007 年以来基于碳纳米管的仿壁虎脚底刚毛阵列的研究和研制取得显著进展^[7-9]。天然壁虎脚底刚毛阵列无疑是最能满足仿壁虎机器人要求的粘附阵列,壁虎脚底刚毛的结构可作为仿生刚毛阵列在机器人脚上布置的参考,为此我们做了探索性的工作。

我们首先从研究壁虎脚底刚毛的结构入手,组织学观察发现壁虎脚底结构与人类皮肤相似,由表皮和真皮两部分组成。细胞形态有两种,靠近真皮侧为叠加排列的索形细胞,表皮侧则为单层排列的圆形或椭圆形细胞,在其远端可见整齐排列的刚毛。在刚毛的纵向切面中,可见细胞核位于刚毛的基底部,刚毛则是表皮细胞的突起,其内充满内容物,以此推测壁虎刚毛可能是一个细胞样的结构,即刚毛细胞,而刚毛是刚毛细胞的突起。国外对壁虎脚底的组织学研究已发现,脚底外层的刚毛会伴随表皮细胞的脱落而消失,随之内层的刚毛形成细胞又会生长出新的刚

毛替代已脱落的外层刚毛,因此我们推测壁虎脚底刚毛细胞具有较强的生长能力。这些研究提示我们是否可通过细胞培养的方法培养出刚毛而获得天然的壁虎脚底刚毛阵列,查阅国内外文献尚未见成功培养壁虎脚底刚毛细胞的报道,而对壁虎脚底刚毛细胞的组分研究已证实^[10,14],壁虎脚底细胞内具有大量低分子量(14~20 kDa)的 β -角蛋白、少量 α -角蛋白和其它蛋白质。由此我们判断,壁虎脚底刚毛细胞可能是一种表皮细胞,故参照培养皮肤上皮细胞的培养方法对其进行了试验性培养。

通过对壁虎脚底皮肤真皮和表皮的分离,我们发现壁虎脚底表皮细胞基本上分为两大类,分别为胰蛋白酶敏感细胞和胰蛋白酶不敏感细胞,其中对胰蛋白酶不敏感、胞体较大、表面有突起的细胞可能就是成熟的刚毛细胞,而胞壁光滑有折光的卵圆形细胞很可能是即将脱落或凋亡的刚毛细胞;对胰蛋白酶敏感的大小不等的圆而亮的贴壁细胞有可能是尚未成熟或正在发育中的刚毛细胞。壁虎脚底表皮细胞形态学的确定为我们体外培养诱导刚毛细胞产生及其鉴定打下了形态学基础。

体外培养结果发现,壁虎脚的表皮细胞包含多种细胞成分,除与人类表皮细胞相似的角质形成细胞样细胞和色素样细胞外,还发现了有别于人类表皮细胞的三类细胞,由于我们不知如何命名,暂且称为未确定细胞 1、2、3。这三种细胞的共同特点是在胞体的一端或两端均有长短不一的细胞突起,但细胞突起的时间出现在培养的不同阶段。通过对三种未确定细胞的形态学观察分析,我们发现未确定细胞 1 的细胞体积较小,胞体两端有长长的突起,与人类的神经细胞极为相似,因此推测这种细胞很可能是壁虎脚底的感应细胞。事实上南航仿生所对壁虎脚底刚毛的力感受行为的电生理学测试已证明,壁虎对作用在刚毛上的法向力和切向力及其方向有精细的感知^[15]。对这类细胞的来源、形态学研究及其功能的确定,为后期研究具有接触力反馈控制的仿生机器人提供了证据。

未确定细胞 2 由索状细胞组成,初为细胞抱团生长,随着培养时间延长和细胞的增殖,细胞团块逐渐增大、散开,随后细胞变为圆形、卵圆形,最后胞体回缩变小发亮,呈棒状或梭形。未确定细胞 3 是对胰蛋白酶不敏感的卵圆形细胞,少量贴壁但几乎不增殖,最后在细胞一端伸出一个直的突起,几天后便脱落。实验观察发现在这两种细胞的生长过程中,有一

时期(约一个月左右)二者的细胞形态极为形似, 均为发亮有突起的细胞, 因此推测二者极有可能均为壁虎脚底的刚毛细胞, 前期形态不同可能与刚毛细胞处于不同的生长发育阶段有关。结合我们对壁虎脚底细胞的组织学观察认为, 未确定细胞 2 可能就是壁虎靠近真皮侧的索形细胞, 在逐渐的发育过程中变为表皮侧的圆形或椭圆形细胞。因此可以得出这样的结论, 未确定细胞 2 就是处于生长发育期的刚毛细胞, 未确定细胞 3 则是成熟的刚毛细胞。细胞表面的突起有两种可能, 一是培养的刚毛细胞生长出的新的刚毛; 另一种可能的解释就是刚毛细胞的最终凋亡形态。

目前许多工作还处于探索阶段, 以上研究结果只揭示了壁虎脚底刚毛的组织学结构、壁虎表皮细胞的形态学及其培养过程中的形态变化, 并培养出疑似的刚毛细胞。目前我们正在对培养细胞进行免疫组化研究, 以确定疑似刚毛细胞的生物化学特性, 并探索适宜刚毛细胞生长的最佳培养条件。

参考文献(References)

- [1] Autumn K, Liang YA, Hsieh ST, *et al.* Adhesive force of a single gecko foot-hair, *Nature*, 2000, 405(6787): 681-685
- [2] Autumn K, Sitti M, Liang YA, *et al.* Evidence for van der Waals adhesion in gecko setae, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12252-12256
- [3] Huber G, Mantz H, Spolenak H, *et al.* Evidence for capillarity contributions to gecko adhesion from single spatula nanomechanical measurements, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45): 16293-16296
- [4] 戴振东, 于敏, 吉爱红, 等。动物驱动足的摩擦学特性及其仿生设计, *中国机械工程*, 2005, 16(16): 1454-1457
- [5] Guo C, Wang WB, Yu M, *et al.* Comparative studies on the structure and adhesion of setae in *G.gecko* and *G.swinhonis*, *Sci China C Life Sci*, 2007, 50(6): 831-838
- [6] Sitti M, Fearing RS. Synthetic gecko foot-hair micro/nano-structures as dry adhesives, *J Adhes Sci Technol*, 2003, 18(7): 1055-1074
- [7] Qu LT, Dai LM. Gecko-foot-mimetic aligned single-walled carbon nanotube dry adhesives with unique electrical and thermal properties, *Adv Mater*, 2007, 19(22): 3844-3849
- [8] Qu L, Dai L, Stone M, *et al.* Carbon nanotube arrays with strong shear binding-on and easy normal Lifting-off, *Science*, 2008, 322(5899): 238-242
- [9] Zhao Y, Tong T, Delzeit L, *et al.* Interfacial energy and strength of multiwalled-carbon- nanotube-based dry adhesive, *Vac Sci Technol B*, 2007, 24(1): 331-335
- [10] Alibardi L. Ultrastructural autoradiographic and immunocytochemical analysis of setae formation and keratinization in the digital pads of the gecko *Hemidactylus turcicus* (Gekkonidae, Reptilia), *Tissue Cell*, 2003, 35(4): 288-296
- [11] Dickinson MH, Farley CT, Full RJ, *et al.* How animals move: an integrative view, *Science*, 2000, 288(7): 100-106
- [12] Collins S, Ruina A, Tedrake R, *et al.* Efficient bipedal robots based on passive-dynamic walkers, *Science*, 2005, 307(18): 1082-1085
- [13] Russell AP. A contribution to the functional morphology of the foot of the tokay, *Gekko gekko* (Reptilia, Gekkonidae), *J Zool Lond*, 1975, 176: 437-476
- [14] Rizzo NW, Gardner KH, Walls DJ, *et al.* Characterization of the structure and composition of gecko adhesive setae, *J R Soc Interface*, 2006, 3(8): 441-451
- [15] 郭策, 戴振东, 吉爱红, 等。壁虎脚趾运动调控的研究, *中国生物医学工程学报*, 2006, 25(1): 110-113

Histological Structure and Culture of Seta *in Vitro* of Gecko Foot

Juan-Qin Gong, Dan-Pei Sheng, Xue-Si Zeng, Ce Guo¹, Zhen-Dong Dai^{1*}

(Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042, China; ¹Institute of Bio-inspired Structure and Surface Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

Abstract Histological structures of gecko toe, dyed by hematoxylin-eosin, were observed by an optical microscopy. The hypodermis and epidermis were separated from seta side of the gecko toe, primary culture of the epidermis was carried out *in vitro* according to the procedure of human epithelium culture and the morphology of cells and their changes were observed under microscopy. The research aims to culture the seta cell *in vitro* and to explore a new method for manufacturing artificial seta on adhesive pads for gecko-like robot. The histological results showed that epidermal cell of the gecko toe were composed of multilayer drum-like cell and single layer round cell, the seta were arrayed out from the distal end of the round cell. After separation by trypsinogen, the epidermal cell could be classified into two cells. Three cells were not sensitive to the trypsinogen. One of them with protuberant on the surface was possible the matured seta cell, and the other with refringent orbicular-ovate was much possible the seta cell of shedding or apoptosis. The culture results showed that there were five cells in the

epidermal layer of gecko foot; one cell was similar to the human malpighian cell and another similar to pigment cell. Other three cells could not be found in human epidermis, we called them as un-defined cell 1, 2 and 3. The un-defined cell 1 looked like human nerve cell, it was supposed to be sensory cell which detected the interaction force between toes and ground. The un-defined cell 2 and 3 were possible seta cells of gecko foot, and the differences in morphology may be corresponding to the cell developmental stage. The un-defined cell 2 was possible setae cell under growth period. The un-defined cell 3 was possible matured seta cell.

Key words *G. gecko*; seta; histological structure; cell culture

Received: May 11, 2009 Accepted: June 29, 2009

The work were supported by the National Natural Science Foundation of China (No.60535020 and No.30770285) and the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2007AA04Z201)

*Corresponding author. Tel: 86-25-84892581, E-mail: zddai@nuaa.edu.cn