

# A Review of Intramucosal and Intramuscular Whole Mount Nerve Staining Technique (Sihler's staining)

<sup>1</sup>연세대학교 치과대학 구강생물학교실 해부 및 발생생물학 연구실, <sup>2</sup>관동대학교 의과대학 해부학교실, <sup>3</sup>부산대학교 치과대학 구강해부학교실

원성윤<sup>1</sup>, 김다혜<sup>1</sup>, 허미선<sup>2</sup>, 이재기<sup>1</sup>, 박종태<sup>1</sup>, 광현호<sup>3</sup>, 허경석<sup>1</sup>, 김희진<sup>1\*</sup>

## 간추림

Sihler 염색방법은 신경분포를 관찰하기 위한 전통적인 방법과는 다르게 슬라이드 제작이 요구되지 않으며, 국소해부 없이 신경 주행 및 분포양상을 관찰할 수 있다. 이 방법은 피부, 점막, 근육 및 기관 등 말이 집신경섬유가 있는 조직부위는 적용 가능하다. 특히 Sihler 염색방법은 뼈대근육의 근육속신경분포 양상을 묘사하기 위한 최고의 방법으로 생각된다. 근육의 말단부위로 갈수록 신경가지의 굵기가 미세하기 때문에 육안으로 관찰하기에는 수기를 통한 연구 수행만으로 제한되며, 조직표본에 의한 추가적인 연구가 수반되어야 한다. Sihler 염색방법을 통해 밝혀진 해부학적 지식은 해부학자들 뿐만 아니라 생리학자 및 임상

가에게 유용한 자료로 사용될 수 있다. 임상가들에게 근육절제와 힘줄이식과 같은 외과적 술식 및 보툴리눔톡신 주사 (BTX-A)와 같은 주사요법을 효과적으로 적용하기 위한 참고자료로 사용될 수 있으며, 전기생리학적 실험 수행 및 새로운 신경수술의 개발을 위해서도 중요하다.

이 종설에서는 기초 및 임상 연구자들을 위한 Sihler 염색방법을 상세히 기술하였으며, 역사, 장단점, 그리고 염색이 적용된 적용 예를 추가적으로 기술하였다.

핵심되는말 : Sihler 염색법, 신경, 전체 표본 염색, 실험방법, 종설

\*교신저자 :

## 역사

Sihler 염색법은 1895년 Charles Sihler 박사에 의해 처음 소개되고 오랫동안 잊혀졌던 염색법이다. Charles Sihler 박사는 뱀 및 개구리의 신경분포를 밝히기 위해 이 염색법을 고안하였으며 (Sihler C 1895, 1900), 반세기 후 Wharton (1937)과 Williams (1943)에 의해 사용되면서 Sihler 염색법으로 명명되었다. Wharton과 Williams는 사람의 장기 (신장, 방광, 난소) 및 양서류 다리 및 발의 신경분포를 조사하였으며 기존 Sihler 박사의 실험방법을 변형하여 사용하였다 (Wharton LR 1937, Williams TW 1943). Freihofer (1966)도 물고기의 신경분포를 관찰하기 위해 Sihler 염색법의 일부를 변형하여 물고기의 신경분포를 관찰하였다. 그리고 Liem과 Van willigen에 의해서 다시 한번 염색법의 일부 방법이 변형되었으며 현재 발표되는 대부분의 연구는 이 실험방법을 따르고 있다 (Liem RS and Douwe van Willigen J 1988). 90년 이후 몇 명의 연구자들에 의해 Sihler 신경 염색법이 재조명 되면서 이 염색법이 적용된 연구가 점점 증가하고 있다. 또한 90년 이전에는 동물의 신경분포를 밝히기 위한 연구가 주를 이루었다면, 90년 이후에는 사람 표본을 대상으로 한 연구가 주를 이루었다.

## 염색방법

Sihler's 염색방법은 7단계로 구성되어 있으며, 표본의 크기 및 두께에 비례하여

염색기간이 소요된다. 염색기간은 3~4개월 요구되는데, 연구자의 경험에 따라서 차이가 있을 것이다.

### 고정 (fixation)

신경분포를 관찰할 표본을 선택하여 10% 포르말린용액에서 3~4주간 고정한다. 10% 포르말린용액이 표본에 의해서 탁하게 변하게 되면 교체해준다.

### 연화 및 탈색소 (maceration and)

고정된 표본을 흐르는 물에 약 1시간동안 씻은 후 3% KOH 용액에 담근다. 3% KOH 용액은 3% KOH 용액 100 ml 당 3% peroxide hydrogen 0.2ml를 희석하여 만들며, 표본이 하얗게 탈색될 때까지 매일 교체해준다. 연화 및 탈색과정은 표본의 상태에 따라서 유지 기간에 차이가 나타날 수 있으며, 2~4주정도 소요된다.

### 탈석회화

#### (decalcification and depigmentation)

충분히 연화 및 탈색된 표본을 탈석회화시키기 위해 제조된 Sihler's I 용액으로 옮기고, 주마다 교체해 준다 (Sihler's I 용액: 1:1:6=glacial acetic acid:glycerin:1% aqueous chloal hydrate). 탈석회화 과정은 방사선 사진상에서 석회성 구조물이 반투과성 상태로 충분히 비취 보일 수 있을 정도까지 유지하며, 표본의 크기에 따라서 2주에서 1달 정도 소요된다.

### 염색 (staining)

탈석회화 된 표본을 염색을 위해 제조된 Sihler's II 용액에 옮긴다 (Sihler's II 용액; 1:1:6 = Ehrlich's hematoxylin: glycerin: 1% aqueous chloral hydrate). Sihler's II 용액에 담긴 표본은 2주 정도 지나게 되면 표본 전체가 자주색에서 진한 자주색으로 염색된다. 이 과정은 표본의 크기 및 밀도에 비례하여 염색 시간이 요구되며, 대략 3~4주 정도 소요된다. 표본 속 신경가지의 염색상태를 확인하기 위해 충분히 투과되는 view box 위에서 관찰하며, 이를 통해 다음 단계의 진행 가부를 결정한다.

### 탈염색 (destaining)

염색된 표본을 탈석회화 단계에서 사용했던 Sihler's I 용액에 넣고 약하게 저어준다. Sihler's I 용액은 진한자주색으로 염색된 표본을 역으로 탈색과정을 유도한다. 염색 과정에서 신경뿐만 아니라 결합 및 근육조직도 진한 자주색으로 염색되나, 신경의 말 이집이 탈색되는 정도 및 시간의 소요에 비해 결합 및 근육조직의 탈색정도 및 소요되는 시간의 양이 크기 때문에 신경 가지의 관찰을 가능케 한다. 이 단계에서 표본 속 신경가지의 주행 및 분포양상이 관찰하기 용이할 때 까지 지속하며, view box 위에서 관찰한다.

### 중화 (neutralization)

탈색화 과정까지 완료된 표본은 산성화 되었기 때문에 0.05% lithium carbonate

용액에 1시간동안 넣어 중화 시킨다. 그리고 표본이 자주색에서 진한 파랑으로 변할 때까지 흐르는 물에 씻으며 이 과정은 1~2 시간 소요된다.

### 투명화 (clearing)

중화된 표본을 충분히 빛이 투과 되는 view box 위에서 일차적으로 검사한 후, 초과 염색된 부분을 수용성 glycerin을 통하여 탈색 과정을 진행한다. 수용성 glycerin의 농도를 점차적으로 증가 시키거나 (40, 60, 80, 100%), 50% glycerin에서 3~5 일 유지하여 초과 염색된 부분의 탈색을 유도한다. 초과 탈색 유도 과정이 마무리 된 염색 표본은 view box 위에서 육안 및 현미경을 통하여 관찰할 수 있으며, 소량의 thymol crystal이 함유된 100% glycerin에서 보관한다.

### Sihler 염색법의 장점과 단점

지금까지 기관, 골격근, 점막, 피부 및 다른 구조들의 신경분포 양상을 관찰하기 위해 다양한 방법들이 사용되어져 왔다. 이러한 방법으로 국소 해부 (Sekiya et al. 1994, Ducic et al. 2006), 조직학절단 표본의 삼차원 재구성 (Ohmichi et al. 1988, Loh et al. 2003, Gulekon et al. 2007), Sihler's 신경 염색법 (Liem RS and Douwe van Willigen J 1988, Wu and Sanders 1992, Liu et al. 1997), 전기생리학적 방법 (furusawa et al. 1991, Kogo et al. 1996, Hammond et al. 1997) 등이 있다. 이러한 각각의

방법들은 장단점을 갖고 있으며, 조사 목적에 따라 다양하게 사용되어져 왔다. 국소해부를 통한 신경분포의 추적은 비교적 정확한 값을 산출할 수 있지만 근육 및 점막 속 종말가지의 분포를 추적하는데 무리가 있으며, 일부 신경가지의 보존을 위해 원치 않는 신경가지의 제거가 필요할 수도 있다 (Homma and Sakai 1991). 또한 국소해부는 수기에 의한 연구방법으로 도구조작의 미숙함 등으로 예기치 않은 손상을 가져올 수 있다. 조직학절단표본을 이용한 신경분포의 관찰은 기관내의 구조들과의 관계를 세밀하게 관찰할 수 있는 장점을 갖고 있으나, 신경의 전반적인 주행 및 분포 양상을 관찰하기는 어렵다. Sihler 염색법은 기관, 근육 및 점막의 신경분포를 관찰을 위해 시행되는 일부 연구 방법의 제한점을 일정 부분 보완할 수 있으며, 일부분은 다른 연구 방법에 의해 Sihler 염색법의 제한점이 보완될 수 있다. Sihler 신경 염색법에 의해 제안될 수 있는 장, 단점을 아래에 자세히 기술하였다.

### 장점 (Strenght)

첫째 Sihler 신경 염색법은 수기를 통한 국소해부가 요구되지 않으며, 순수한 염색과정의 진행을 통해 신경의 전반적인 주행 및 분포 양상을 관찰할 수 있다. 둘째, Sihler 신경 염색법은 육안으로 쉽게 관찰되기 어려운 미세한 신경가지도 염색되며, 인접한 신경과의 교통 양상도 관찰할 수 있다. 셋째, Sihler 신경 염색법은 표본 전체를 염색하므로, 조직시편의 제작과정이 필요 없으며, 혈관 및 근육과의 위치관계를 손쉽게

게 관찰할 수 있다.

### 단점 (Limitation)

첫째, Sihler 신경 염색법을 적용한 표본내에서 운동신경과 감각신경을 나누어 구분 할 수 없다. Hematoxylin은 축삭을 덮고 있는 말이집섬유를 선택적으로 염색하기 때문에 운동신경과 감각신경이 개별적으로 구별되기 어려우며, 기원을 밝히기 위해서는 주 신경을 추적해야 한다. 둘째, Sihler 신경 염색법은 여타의 다른 염색법에 비해 오랜 시간 실험과정이 요구되며, 연구자의 경험에 따라 결과의 많은 차이를 보일 수 있다. 셋째, Sihler 신경 염색법은 표본 전체를 염색하는 방법으로 표본의 두께 및 크기에 따라서 염색되는 정도의 차이를 느낄 수 있다. 이는 염색과정중 탈염색 및 투명화 단계에서 표본의 두께 및 크기 요소에 의해 불완전하게 진행될 수 있으며, 반복 훈련이 요구된다.

### Sihler 신경염색법의 적용 사례

Sihler 신경염색법 사람 및 동물의 장기, 골격근 및 다른 구조의 신경분포를 관찰하기 위해 여러 연구자에 의해 많은 부분이 적용되었다. 본 연구실에서도 기초 및 임상적으로 연구 가치가 있는 다양한 부분에 Sihler 염색법을 적용한 바 있으며, 아래에 본 연구실에서 Sihler 신경 염색법을 적용한 사례의 일부를 기술하였다.

### 깨물근의 근육속신경분포

이 연구는 깨물근의 근육속 신경분포 양



Fig 1. Masseter muscle specimens in the modified Sihler's staining procedure. Masseter muscle arises from the zygomatic arch and inserts into the mandible at the corner of the jaw. It is innervated by the mandibular branch of the trigeminal nerve. (Intramuscular nerve distribution of the masseter muscle for botulinum toxin injection. J Craniofac Surg (in Press), 2010, Reproduced with permission).

상을 분석하여 정확하고 안전한 주사점을 찾아 깨물근비대 (masseter hypertrophy) 치료 시 BTX-A의 효과를 최대화 하는데 그 목적을 두었다 (Fig 1). 연구재료는 성인시신 10쪽을 사용하였으며, 외과적 술식으로 인한 손상이나 병적 표식이 있는 경우 연구에서 제외되었다. 깨물근은 얇은 부분과 깊은 부분으로 나뉘고, 앞모서리에서 하나로 합쳐지기 때문에, 분리하지 않고 조심스럽게 같이 떼어 내어 준비된 통에 넣어 고정하였다. 4달간의 염색과정을 마친 염색된 표본은 충분히 빛이 투과되는

view box 위에 올려놓은 상태에서 현미경을 이용하여 관찰하였으며, 깨물근을 통과하는 주 깨물근신경을 추적하면서 종이에 스케치하였다. 스케치한 결과를 바탕으로 깨물근의 신경분포 양상을 분석하고, 결과를 바탕으로 치밀한 부위를 확인하였다.

#### 입안점막의 신경분포

이 연구는 입안점막에 분포하는 턱끝신경, 볼신경, 눈확아래신경의 분포 양상을 관찰함으로써 입안 부위에서 실시하는 턱끝성형술 (genioplasty), 작은침샘 (minor

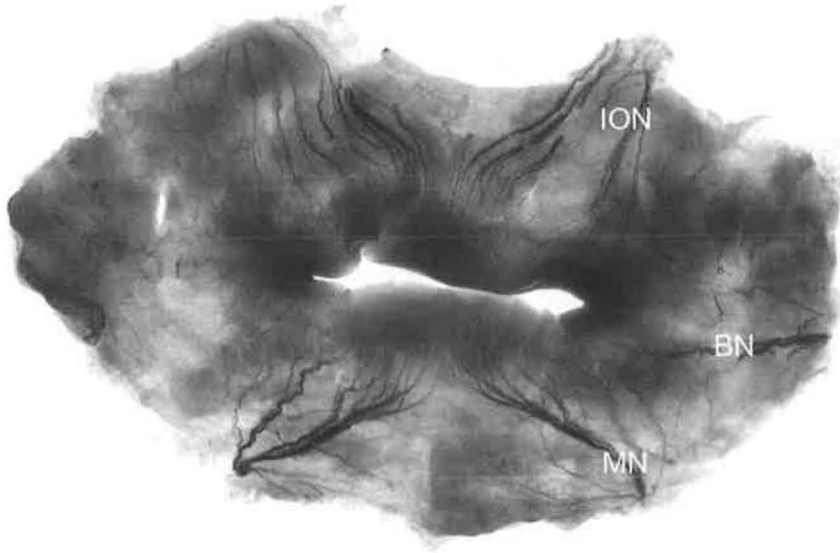


Fig 2. Oral mucosa specimens in the modified Sihler's staining procedure. The oral mucosa is continuous with the skin at the labial margins and with the pharyngeal mucosa at the oropharyngeal isthmus. The nerve supplying the oral mucosa divided into three portion, such as upper jaw (intraorbital nerve, ION), cheek (buccal nerve, BN) and lower jaw (mental nerve, MN).

salivary gland) 제거, 아래턱뼈 앞부위 뼈자름술 (mandibular anterior segmented osteotomy) 등과 같은 다양한 외과술식 시 참고할 수 있는 해부학적 기초 자료를 제공하고자 시행하였다 (Fig 2). 연구재료는 신선한 성인 시신의 입안점막 8쪽을 사용하였으며, 손상된 표본은 사용하지 않았다. 시신의 얼굴에서 입안점막에 분포하는 감각신경이 다치지 않도록 얼굴 피부를 벗긴 후, 표정근육의 일부를 제거하였다. 입술의 홍순부분 (vermilion border)을 포함한 입안점막을 위턱 및 아래턱뼈에서 떼어 내어 표본을 준비된 통에 핀으로 고정하였다. 이후 점막속 신경분포 양상을 확인하기 위해 변형된 Sihler 신경염색법

을 4달간 시행한 후 빛이 충분히 투과되는 view box 위에서 관찰하였다.

### 아래팔 앞칸의 근육속 신경분포

이 연구는 아래팔 앞칸 근육의 근육속 신경분포를 조사하여, 피부의 표지점을 기준으로 효율적인 보툴리눔독신 (BTX-A) 주사점을 찾는 데 있으며, 이를 통하여 임상적으로 이용할 수 있는 자료를 확립하는데 있다 (Fig 3). 연구재료는 한국인 성인시신 17쪽, 프랑스 성인시신 6쪽을 사용하였으며, 표본의 외과적 손상이나 병적 표식이 있을 경우 연구에서 제외하였다.

염색 후 효과적인 분석 및 계측을 위해 아래팔 부위의 위쪽경계와 아래쪽 경계를



Fig 3. Specimen of flexor digitorum profundus in the modified Sihler's staining procedure. The flexor digitorum profundus is a muscle in the forearm that flexes the finger. It has a dual nerve supply from the ulnar (UN) and median nerves (MN), and its branches are usually connected. (Extra- and Intramuscular Nerve Distribution Patterns of the Muscles of the Ventral Compartment of the Forearm. AJPMR (in Press), 2010, Reproduced with permission).

표시할 수 있는 피부 표지점을 설정하였다. 위쪽경계는 위팔뼈의 위관절융기를 잇는 선으로 설정하였으며, 아래경계는 노뼈와 자뼈의 붓돌기를 연결하는 선으로 설정하였다. 이 영역을 10개의 영역으로 나누고, 두 개의 선을 수직으로 연결하는 1개의 세로선을 그어 20개의 영역으로 나누었다. 염색 후 표본의 전체 길이를 10등분하여 염색 전 표본의 상태와 대조하여 결과를 분석하였다. 이 연구에서는 아래팔 앞칸 근육 원엄침근, 노쪽손목굽힘근, 긴손바닥근, 자쪽손목굽힘근, 얇은손가락굽힘근 그리고 깊은손가락굽힘근을 대상으로 Sihler 신경

염색법을 적용하였다.

### 종아리 뒤칸의 근육속 신경분포

이 연구는 장딴지근육과 가자미근의 근육속 신경분포를 조사하여 효율적인 보툴리눔톡신 (BTX-A) 주사점 및 근육절제술과 같은 임상시술을 위한 해부학적 지식을 제공하고자 시행하였다 (Fig 4). 연구재료는 염색부위의 병적 표식 및 외과적 손상이 없는 성인시신에서 다리 18쪽을 사용하였다. 효과적인 분석 및 계측을 위해 장딴지부위의 위쪽경계와 아래쪽 경계를 표



Fig 4. Specimen of gastrocnemius muscle in the modified Sihler's staining procedure. The two heads of gastrocnemius, together with soleus, form a tripartite muscular mass sharing the calcaneal tendon and are sometimes termed are triceps surae. Gastrocnemius muscle is a plantar flexor of ankle and a flexor of the knee. (Extra- and intramuscular nerves distributions of the triceps surae muscle as a basis for muscle resection and botulinum toxin injection, Surg Radiol Anat, 2009;31:615-621, Reproduced with permission).

시할 수 있는 피부 표지점을 설정하였다. 위쪽경계는 무릎주름이고 아래쪽경계는 안쪽복사와 가쪽복사를 연결하는 선으로 설정하였으며, 두 지시선 사이를 균일한 10개의 영역으로 나누었다. 염색 후 표본의 전체 길이를 10등분하여 염색전 표본의 상태와 대조하여 결과를 분석하였다. 이 연구에서는 장딴지근과 가자미근을 대상으로 Sihler 신경 염색법을 적용하였다.

### 참고문헌

Sihler C (1895) Ueber Muskelspindeln und intramuskuläre Nervenendigungen bei

schlangen und fronschen. Arch. Mikrosk. Anat. Entwickl. 46: 709-723

Sihler C (1900) Die Muskelspindeln, Kerne und Lage der motorischen Nervenendigungen. Arch Mikrosk. Anat. Entwicklung. 56:334-354

Wharton LR (1937) A technique for studying the innervation of organs. Anat Rec. 67:469-475

Williams TW (1943) A technique for the gross differential staining of peripheral nerves in cleared vertebrate tissue. Anat Rec. 86:189-194

Freihofer WC (1966) The Sihler technique of staining nerves for systematic study especially of fishes. Copeia. 3:470-475



- Liem RS, Douwe van Willigen J (1988) In toto staining and preservation of peripheral nervous tissue. *Stain Technol.* 63:113-120
- Ohmichi T, Fukushima N, Rutka J, Hawke M (1988) Computer-generated three-dimensional reconstruction of the singular nerve. *J Otolaryngol.* 17:343-345
- Wu BL, Sanders I (1992) Technique for demonstrating the nerve supply of whole larynges. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 118:822-827
- Furusawa K, Yamaoka M, Kogo M, Matsuya T (1991) The innervation of the levator veli palatini muscle by the glossopharyngeal nerve. *Brain Res Bull.* 26:599-604
- Homma T, Sakai T (1991) Ramification pattern of intermetacarpal branches of the deep branch (ramus profundus) of the ulnar nerve in the human hand. *Acta Anat.* 141:139-144
- Sekiya S, Kumaki K, Yamada TK, Horiguchi M (1994) Nerve supply to the accessory soleus muscle. *Acta Anat.* 149: 121127.
- Kogo M, Hamaguchi M, Matsuya T (1996) Observation of velopharyngeal closure patterns following isolated stimulation of levator veli palatini and pharyngeal constrictor muscles. *Cleft Palate Craniofac J.* 33: 273276
- Hammond CS, Davenport PW, Hutchison A, Otto RA (1997) Motor innervation of the cricopharyngeus muscle by the recurrent laryngeal nerve. *J Appl Physiol.* 83:89-94
- Liu J, Kumar VP, Shen Y, Lau HK, Pereira BP, Pho RW (1997) Modified Sihler's technique for studying the distribution of intramuscular nerve branches in mammalian skeletal muscle. *Anat Rec.* 247: 137-144
- Gulekon N, Peker T, Liman F, Anil A, Turgut HB (2002) Demonstration of the nerve distribution of the extraocular muscles in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Curr Eye Res.* 25:179-188
- Loh EY, Agur AM, McKee NH (2003) Intramuscular innervation of the human soleus muscle: a 3D model. *Clin Anat.* 16:378-382
- Ducic I, Dellon AL, Graw KS (2006) The clinical importance of variations in the surgical anatomy of the superficial peroneal nerve in the mid-third of the lateral leg. *Ann Plast Surg.* 56:635-638