

Effect of 630 nm Light Emitting Diode (LED) Irradiation on Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Seung-Joo Jekal^{1,†}, Pil Seung Kwon¹ and Jin Kyung Kim²

¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Jeonbuk 570-750, Korea

²Vestibulocochlear Research Center & Department of Microbiology, College of Medicine, Wonkwang University, School of Medicine, Iksan, Jeonbuk 570-749, Korea

The purpose of this study was to clarify the effect of light emitting diode (LED) irradiation on healing of impaired wound and alteration of mast cells in experimental diabetic rats. Twenty-four male Sprague-Dawley rats were divided into four groups: excision (Ex), excision-LED irradiation (Ex-LED), diabetes + excision (DM) and diabetes + excision + LED irradiation (DM-LED). Diabetes was induced in rats by streptozotocin (STZ) injection (70 mg/kg, single dose) and 6 mm punch excision wounds were created on the back after shaving hair. The LED-irradiated rats were treated to a daily dose of 5 J/cm² LED (630 nm) light for 11 days after surgery, and were killed at day 1, 3, 7 and 11. The lesion and adjacent skin tissues were excised, fixed with 10% buffered formalin and embedded with paraffin. For evaluation of wound healing, hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome staining were performed. Mast cells (MCs) were stained with toluidine blue (pH 0.5) and quantified using a computerized image analysis system. The proliferation activity of keratinocyte in skin tissues was analyzed on sections immunostained with proliferative cell nuclear antigen (PCNA). The results showed that wound healing rate, collagen density and neo-epidermis length, number of PCNA-positive cells, fibroblasts and mast cells were significantly higher in the LED-irradiated rats than in the DM and Ex rats throughout the periods of experiment. Exceptionally, the number of MCs was significantly lower at day 11 compared with day 7 after surgery in the all groups. These findings suggest that the LED irradiation may promote the tissue repair process by accelerating keratinocyte and fibroblast proliferation and collagen production in normal rats as well as in diabetic rats, and MCs may play an important role at an early stage of skin wound healing in normal and diabetic rats.

Key Words: Light emitting diode (LED) irradiation, Diabetic wound healing, Mast cells, Rat skin

서 론

당뇨병은 전 세계적으로 매우 급속히 유병률이 증가하고 있는 만성 질환으로 그 합병증 중 하나가 상처치유가 지연된다는 점이다. 당뇨병에서의 상처치유 지연의 정확한 병인에 대해서는 아직 완전하게 규명되어 있지 않으나, 당뇨병 환자 및 당뇨병 유발 동물모형에 대한 연구에 따르면 상처치유 지연의 원인은 염증반응, 혈관신생, 섬유증식의 억제 및 콜라겐 침착과 세포외기질의 분해 결합에 의한 것으로 보고된 바 있다 (Goodson and Hung,

1977; Fahey et al., 1991).

상처치유와 조직수복은 응고, 염증, 육아조직 형성, 상피화, 콜라겐 합성, 조직 재형성의 활성화 등과 같은 일련의 사건이 포함된 복잡한 과정으로 림프구, 단핵구, 상피세포 및 섬유모세포, 비만세포와 같은 여러 세포들의 상호작용에 의해 이루어진다 (Blakytyny and Jude, 2006; Brem and Tomic-Canic, 2007). 상처치유 과정은 염증기, 육아조직 형성기 및 재형성기의 주요 세 시기가 겹치면서 진행되며, 육아조직 형성기에는 상처부위에 섬유모세포의 이주와 증식이 증가한다. 시험관내 실험에서 비만세포는 상처치유 과정에서 상처부위에 섬유모세포의 이주와 증식에 영향을 미치며 (Trautmann et al., 2000), 이 효과는 부분적으로 비만세포로부터 방출된 히스타민이 섬유모세포의 H₂-수용체에 작용하거나 (Leibovich and Martin, 2005), 비만세포로부터 유래한 interleukin-4에 의한 중재

*접수일: 2010년 11월 19일 / 수정일: 2010년 12월 14일

채택일: 2010년 12월 20일

†교신저자: 제갈승주, (우) 570-750 전북 익산시 신용동 344-2, 원광보건대학 임상병리과

Tel: 063-840-1215, e-mail: sjjei@wkhc.ac.kr

로 이루어진다 (Nienartowicz et al., 2006). 또한 최근에는 상처치유 과정에서 피부 비만세포가 염증반응을 조절하고, 신생혈관 형성과 재형성기에도 참여하며 (Iba et al., 2004; Nienartowicz et al., 2006), 생쥐의 화상치유 실험에서는 비만세포와 비만세포에서 유래한 chymase가 상처의 가장자리에서 육아조직의 형성과 콜라겐 합성에 중요한 역할을 한다 (Nishikor et al., 1998)는 사실이 밝혀지면서 상처치유 과정에서의 비만세포의 기능에 관한 연구가 증가하고 있다.

광 치료는 오래 전부터 다양한 질병 치료에 이용되고 있는 의료기술로 피부병 치료에 많이 활용되고 있다. 최근 피부질환 치료를 위한 광원 중 light emitting diode (LED) 광원을 이용한 치료법이 임상에서 활용도가 점점 증가하는 추세이다 (Barolet, 2008). LED 광원은 고효율 레이저가 국소적인 면적에 집중적으로 치료하는 것과 달리 적절한 광출력으로 넓은 면적의 상처부위를 효과적으로 치료할 수 있는 장점을 가지고 있다 (Dall Agnol et al., 2009). LED 광원은 파장에 따라 세포나 조직 내에서 서로 다른 생화학 반응을 일으키는데, 피부의 경우 파장에 따른 투과 깊이는 400 nm 파장의 빛은 1 mm 이하, 514 nm 파장의 빛은 0.5~2 mm, 630 nm 파장의 빛은 1~6 mm이며, 700~900 nm 파장의 빛은 더 깊이 침투할 수 있다 (Simpson et al., 1998).

LED에 의한 광 치료 원리는 광원의 광자가 세포나 조직 내 발색단이나 cytochrome c oxidase와 같은 광수용체에 흡수되어 세포나 조직 내의 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이나 adenosine 5'-triphosphate (ATP) 합성을 증가시켜 세포의 대사활동을 촉진시키는 것으로 알려져 있다 (Kalka et al., 2000; Hamblin and Demidova, 2006). 상처치유와 관련한 LED 광원의 효과는 630 nm 파장의 빛을 사람 잇몸의 섬유모세포에 조사했을 때 prostaglandin E2 합성을 억제하여 염증을 감소시켰으며 (Lim et al., 2007), Lee (2007) 등은 가시광과 근적외선 영역의 파장에 해당하는 다양한 LED 광원은 피부의 콜라겐 합성을 증가시키고 matrix metalloproteinase (MMP)의 증가를 억제시킬 수 있음을 보고하였다. 이처럼 여러 연구자들이 LED가 정상조직 수복과정 또는 상처치유에 유익한 효과가 있음을 보고하고 있으나 당뇨병에서의 상처치유 지연에 대한 치료 및 개선 효과에 관한 연구가 거의 없는 실정이다.

본 연구는 당뇨병에서의 630 nm LED 조사에 의한 상처치유 효과를 규명하기 위해 streptozotocin (STZ)으로

유도한 당뇨 흰쥐에서 지연된 상처치유에 대한 LED의 조직학적 효과와 비만세포의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 피부병변이 없는 체중 180~190 g의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐 (Korea Animal Tech, Pyungtaek, Korea) 24마리를 사용하였다. 사육실의 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 50~60%로 조절하였고, 매일 광주기는 10시간 및 암주기는 14시간이 되도록 하였으며, 고형사료 (Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 물을 24시간 완전 자유 급식으로 공급하였다. 24마리의 흰쥐를 단순절제군, 단순절제-LED군, 당뇨절제군 및 당뇨절제-LED군에 각각 6마리씩 무작위로 배정하여 실험에 사용하였다.

당뇨유발

당뇨를 유발시키기 위해 신선한 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 녹인 스트렙토조토신 (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) 70 mg/kg을 1회 복강 내 주사하였다. 혈당치는 Accu-Check Advantage glucometer (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA)를 사용하여 STZ 투여 후 3일부터 측정하여 확인하였다. 당뇨병 유발 쥐는 실험기간 동안 계속 고혈당 상태에서 실험을 수행하였다. 모든 흰쥐는 STZ 투여 후 3일 이후에 당뇨병이 유발되었고, 혈당치가 300 mg/dl 이하의 흰쥐는 연구에서 배제하였다.

상처유발

흰쥐를 Zoletil 50 (VIRBAC Laboratories, Carros, France) 12.5 mg/kg과 Rompun (Bayer Korea, Seoul, Korea) 5 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취시킨 후 허리부위와 등부위 피부의 털을 전기이발기 (HA 944, Hwasung, Korea)를 사용하여 제거하고 면도날을 사용하여 깨끗이 면도한 다음 70% 알코올로 피부를 소독하고 요추에서 외측으로 1.5 cm 떨어진 허리에 6 mm 펀치 (Biopsy Punch, Ziefel, Germany)를 사용하여 전층절제 (full-thickness excision) 상처를 만들었다. 절제 후 2차 치유를 유도하기 위해 봉합하지 않았다.

LED 조사

광원은 LED를 자체 제작하여 사용하였다. 사용된 LED는 5φ의 원통모양으로 2000 mcd의 광도를 가지며, 가로

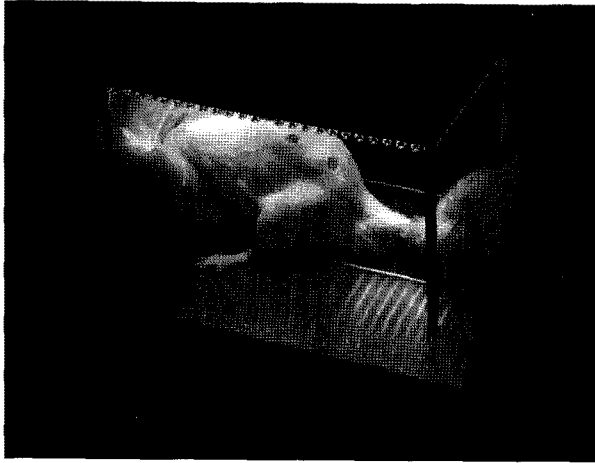


Fig. 1. LED irradiation device used in this experiment. The wavelength of LED was 630 nm. 384 of LED elements are installed within 120×180 mm in size.

120 mm×세로 180 mm로 총 384 (16×24)개의 LED가 장착되었다. LED의 회로 연결은 직렬과 병렬을 병합하여 사용하였고, 직류 전원을 사용하였다. LED의 수명 연장과 손상을 방지하기 위하여 안정적으로 저항을 150 Ω으로 하였다. LED 판넬의 광량은 전원 공급장치 (Hanil, Seoul, Korea)의 전류를 조절하여 8.3 mW/cm²가 되도록 하여 실험에 사용하였다. LED 조사군은 이 에너지의 빛을 하루에 마리당 매일 10분간 총 5 J/cm²의 에너지를 조사하였다 (Fig. 1).

상처치유를 평가

절제 직후부터 최종 처치 직후까지 매일 0.05 mm 단위로 길이를 측정할 수 있는 캘리퍼 (Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)를 사용하여 육안으로 관찰되는 상처의 길이를 측정하였다. 매 처치 후 상처 길이를 절제 직후의 상처 길이로 나누어 백분율로 환산하여 상처치유율로 구하였다.

조직병리학적 및 면역조직학적 검사

모든 실험군은 11일째 처치가 끝난 직후 에테르 마취하에 도살하였다. 각 군의 상처부위 피부를 중심으로 약 1.5×1.5 cm의 크기로 적출하고 조직의 수축을 막기 위해 카드보드에 붙인 다음 즉시 10% 중성완충포르말린 용액에 넣어 고정하였다. 고정한 조직은 자동침투기 (Citadel 1,000, Shandon, Life Science International Ltd., Rumcorn, England)에 옮겨 알코올에 탈수, 자일렌에 투명 후 파라핀으로 포매하였다. 포매조직은 회전식 박절기 (HM 340E, Microm Co., Walldorf, Germany)를 사용하여 절

개면 중앙부위에서 수직방향으로 4 μm의 두께로 박절하여 조직병리학적 관찰을 위해 hematoxylin-eosin (HE) 염색을 하였다.

신생표피 길이와 섬유모세포 수 계측

HE 염색표본으로부터 신생표피의 길이와 섬유모세포의 수를 계측하기 위해 편지로 절제한 부위의 피부조직을 광학현미경 (Olympus BH2, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) 200배에서 디지털카메라 (DP-72, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)로 영상을 포착하여 TIF 파일로 저장한 후 절제부위의 좌우 표피로부터 신생된 상피의 길이와 진피 육아조직 내에 출현한 섬유모세포의 수를 영상분석 프로그램을 사용하여 분석하였다.

콜라겐 밀도 비율 계측

상처치유 과정에서 진피 육아조직 내 콜라겐 생성물을 보기 위해 Masson trichrome 염색을 하였다. 그 과정은 파라핀 절편을 탈파라핀한 후 Bouin 용액에서 60℃에서 1시간 2차 고정된 다음 Weigert iron hematoxylin 용액을 사용하여 핵을 염색하고 bieberich scarlet-acid fuchsin과 aniline blue 용액을 사용하여 콜라겐과 배경염색을 한 후 탈수, 투명 및 봉입하였다. 절제한 부위의 피부조직을 광학현미경 40배에서 디지털카메라로 영상을 포착하여 TIF 파일로 저장한 후 절 진피 육아조직 내에 청색으로 염색된 콜라겐 침착부위를 영상분석 프로그램을 사용하여 분석하였다.

비만세포 수 계측

비만세포의 검출을 위해 toluidine blue 염색을 하였다. Toluidine blue 염색은 Enerback (1966)의 방법을 약간 수정하여 0.5% toluidine blue (0.5 N HCl에 용해한 후 농염산으로 pH 0.5으로 조정) (Sigma, St. Louis, MO, USA)에 옮겨 1시간 30분간 염색한 다음 증류수에 5분간 세척한 후 nuclear fast red 용액에 대조염색하여 수돗물에 행군 후 탈수, 투명 및 봉입하였다. 절제한 부위의 피부조직을 광학현미경 200배에서 디지털카메라로 영상을 포착하여 TIF 파일로 저장한 후 절 진피 육아조직 내에 청자색으로 염색된 비만세포 수를 영상분석 프로그램을 사용하여 분석하였다.

각질세포 증식능 관찰을 위한 PCNA 면역염색

각질세포의 증식능을 보기 위해 4 μm 두께의 파라

Table 1. Changes of body weight during experimental period in rats (n=6 in each group)

Days post-surgery	Body weight (g)			
	Ex	Ex-LED	DM	DM-LED
1	192±2.74	192±5.70	191±7.42	188±10.95
3	198±5.70	198±5.70	181±8.94*	191±12.45
7	212±4.47	211±7.42	166±7.87***	182±12.83 [#]
11	226±4.18	224±5.48	155±8.66***	176±10.84 ^{##}

Rats were treated with single dose of STZ (70 mg/kg, I.p. injection) to induce hyperglycemia that was lasted until the end period of the experiment. Data are expressed as means ± standard deviations. The body weight in the DM groups was significantly lower than that of the Ex groups at the day 3, 7 and 11 groups (* $P<0.05$, *** $P<0.001$), whereas the body weight in the DM-LED groups was significantly higher than that of the DM groups at the day 7 and 11 groups ([#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$).

Ex; excision group, Ex-LED; excision-light emitting diode group, DM; diabetes+excision group, DM-LED; diabetes+excision+light emitting diode group.

핀 절편을 제작하여 Polysine™ slide (Thermo Scientific, Runcorn, USA)에 붙이고 58°C의 슬라이드 건조기에서 충분히 건조시킨 후 자일렌에 탈파라핀, 하강계열 알코올에 함수한 다음 proliferative cell nuclear antigen (PCNA) 면역조직화학염색을 moist chamber 내에서 수기로 시행하였다. 그 과정을 간단히 요약하면 절편을 탈파라핀, 함수, 수세한 후 조직 내인성 과산화효소의 활성을 차단하기 위해 3% hydrogen peroxide로 45°C에서 5분간 작용시킨 다음, tris buffer saline (Thermo, Scientific, Runcorn, USA)으로 세척한 다음 비특이적 반응을 차단하기 위해 protein block (Dako, A/S; Grostrup, Denmark)에 옮겨 45°C에서 20분간 작용시켰다. 이어 일차 항체로 mouse anti-PCNA (Dako, A/S; Grostrup, Denmark)를 1:400으로 희석하여 실온에서 30분간 작용시킨 다음 Tris buffer saline으로 적당히 세척하고 Dako Envision Detection kit를 사용하여 실온에서 30분간 작용시켰다. 그 후 DAB로 실온에서 5분간 발색시킨 후 Mayer hematoxylin으로 대조염색하고 탈수, 투명을 거쳐 permount로 봉입하였다.

PCNA 면역염색표본으로부터 절제 수복부위로부터 신생된 상피층에서 각각 200배율에서 디지털카메라 (Olympus DP-72, Olympus Co., Japan)로 영상을 포착하여 TIF 파일로 저장한 후 영상분석 프로그램을 사용하여 분석하였다.

영상분석

모든 저장된 영상은 영상분석을 위해 컴퓨터 영상분석 프로그램 (Image-Pro® Plus ver 4.5, Media Cybernetics Inc., Georgia, USA)을 사용하여 시행하였다. 신생표피 길이 측정은 저장된 영상 내의 피부조직의 절제 경계부위로부터 신생된 좌우 표피 길이를 측정하여 합산하여 총 길이

로 하였으며, 콜라겐 밀도는 저장된 영상에서 청색으로 염색된 육아조직 내의 콜라겐의 면적을 계측하여 영상의 총 면적으로 나누어 단위면적 당 콜라겐이 차지하는 비율(%)을 산출하였다. 비만세포와 섬유모세포는 피부 육아조직 1 mm² 당 평균 수를 산출하였고, PCNA-양성세포는 현미경 200배에서 좌우 신생된 표피에 출현하는 양성 세포의 평균 수를 산출하였다. 비만세포의 경우 파립 및 탈과립세포를 모두 포함시켰다.

통계분석

각 군간 체중, 상처치유율, 신생표피 길이, 콜라겐 침착 밀도, 섬유모세포, 비만세포 그리고 PCNA-양성세포 수의 차이를 비교하기 위해 One-way ANOVA test를 하였으며, 유의한 차이가 있을 경우 Turkey's multiple range test로 사후 검정하였다. 통계학적 유의수준은 $P<0.05$ 로 하였으며 통계분석에는 SPSS ver 10.0 프로그램을 사용하였다.

결 과

체중의 변화

각 군 흰쥐의 체중을 매일 측정하여 통계분석한 결과 피부절제 후 1일째는 네 군간 통계학적으로 유의한 차이가 없다가 2일과 3일에 네 군 사이에 유의한 차이를 보이기 시작하여 ($P<0.05$) 11일까지 계속 매우 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.001$; Table 1). 이를 다시 사후 검정한 결과 당뇨절제군이 단순절제군과 단순절제-LED군에 비해 체중이 유의하게 감소하였다 ($P<0.05$). 단순절제군과 단순절제-LED군 사이에는 피부절제 후 11일 동안 두 군 모두 체중이 증가하는 경향을 나타내었으나 통계학

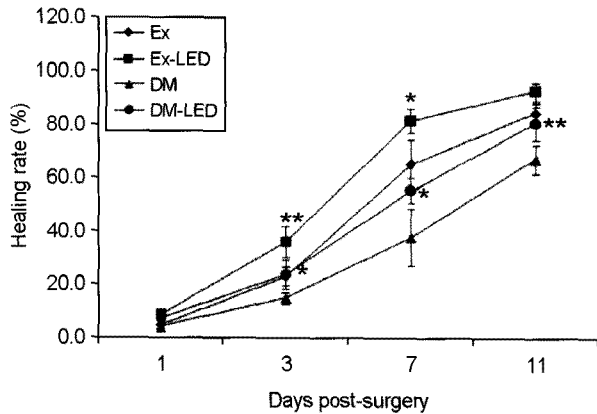


Fig. 2. Changes of wound healing rate after surgery. Data are expressed as means \pm standard deviations. The healing rate of the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

적으로 유의한 차이가 없었다. 당뇨절제군과 당뇨절제-LED군에서는 피부절제 후 1일부터 11일까지 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 체중이 증가하는 경향을 나타내었으나 3일까지는 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나 7일 이후부터 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군의 체중이 유의하게 증가하였다 ($P<0.05$, $P<0.01$). 11일째 4군의 체중을 측정된 결과 단순절제군 226 ± 4.18 g, 단순절제-LED군 224 ± 5.47 g, 당뇨절제군 155 ± 8.66 g, 당뇨절제-LED군 176 ± 10.84 g으로 단순절제군에 비해 당뇨절제군에서 체중이 약 70 g 정도가 감소하였다.

상처치유율의 변화

각 군의 상처치유율은 피부절제 후 1일부터 11일까지 네 군 사이에 통계학적으로 매우 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.001$). 이를 다시 사후검정한 결과 피부절제 후 1일째부터 단순절제군에 비해 단순절제-LED군에서 그리고 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 유의하게 치유율이 증가하였으며 ($P<0.01$), 3일째부터는 단순절제군에 비해 당뇨절제군에서 매우 유의하게 감소하였다 ($P<0.05$). 이 군들 사이의 차이는 피부절제 후 11일까지 계속 같은 경향을 나타내었으나, 11일째는 단순절제군과 단순절제-LED군 사이에서만 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (Fig. 2).

신생표피의 길이 및 각질세포 증식능 변화

손상된 표피는 당뇨절제군을 제외한 나머지 세 군에서 피부절제 후 11일에 완전하지는 않았으나 거의 대부분 상피가 재생되어 뚜렷한 중층을 형성하였다 (Fig. 3A).

신생표피 길이는 피부절제 후 1일째에 단순절제군과 단순절제-LED군이 당뇨절제군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였으나 ($P<0.05$), 당뇨절제-LED군에서는 유의한 차이가 없었다. 피부절제 후 3일째와 7일째에는 네 군 모두에서 신생표피의 길이가 증가하면서 단순절제군에 비해 단순절제-LED에서, 그리고 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 각각 유의한 증가를 나타내었다 ($P<0.01$, $P<0.05$). 11일째는 네 군 모두에서 7일째에 비해 감소하는 경향을 나타내었으며, 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서는 유의한 증가를 나타내지 않았다 (Fig. 3B). 또한 표피세포 증식능을 나타내는 PCNA-양성세포도 절제 후 3일째와 7일째에는 단순절제군에 비해 단순절제-LED에서 ($P<0.01$, $P<0.05$), 그리고 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 수적 증가와 염색강도가 높은 것으로 나타났다 ($P<0.05$, $P<0.05$; Fig. 4). 그리고 11일째는 7일째에 비해 당뇨군을 제외한 모든 군에서 유의하게 감소하였다 ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.05$).

섬유모세포 수와 콜라겐 밀도의 변화

4군 모두에서 피부절제 1일 이후 절제 가장자리 부위에 적은 수의 호중구, 단핵세포 및 섬유모세포가 출현하였고, 육아조직의 형성과 함께 호중구와 단핵세포의 수는 3일째까지 증가하다가 7일째부터 감소하는 경향을 보였으며, 섬유모세포 수는 11일째까지 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. HE 염색표본에서 섬유모세포는 기다란 핵을 가진 방추형의 세포로 다른 염증세포들과 분명히 구별되는 특징적인 형태로 관찰되었다. 섬유모세포 수는 피부절제 후 1일째부터 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 통계학적으로 유의하게 증가하였으며 ($P<0.05$), 단순절제에 비해 단순절제-LED군에서는 유의한 증가를 보이지 않았다. 3일째와 7일째는 단순절제-LED군에서만 단순절제군에 비해 유의한 증가를 나타내었고 ($P<0.01$), 당뇨절제-LED군은 당뇨절제군에 비해 3일째는 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나 7일째는 유의하게 증가하였다. 11일째에는 단순절제군에 비해 단순절제-LED군에서, 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 각각 유의한 증가를 나타내었다 ($P<0.01$, $P<0.05$; Fig. 5). Masson trichrome 염색 결과 콜라겐은 피부절제 후 1일째는 거의 출현하지 않다가 3일째부터 육아조직의 심층부로부터 표면과 평행하게 배열된 청색을 띤 미성숙 콜라겐이 출현하기 시작하여 11일째까지 계속 증가하면서 표층부로 이동하면서 성숙한 콜라겐으로 변해가는 것

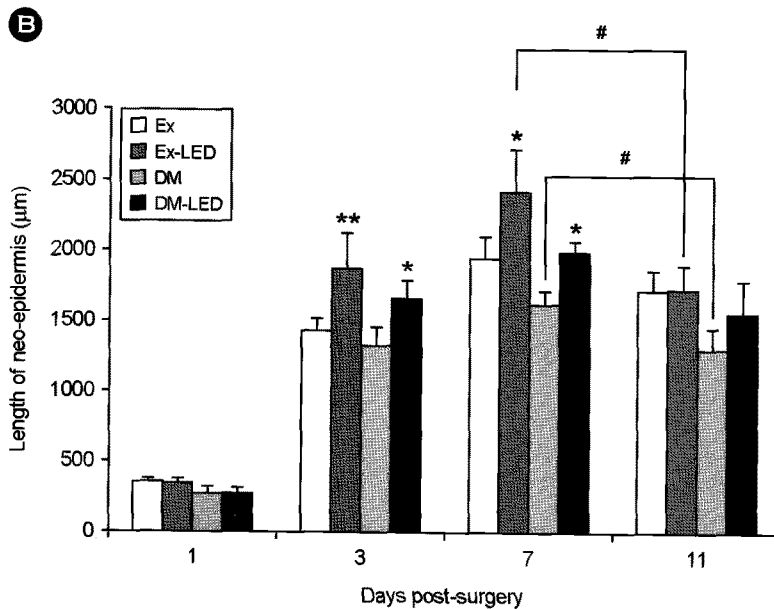
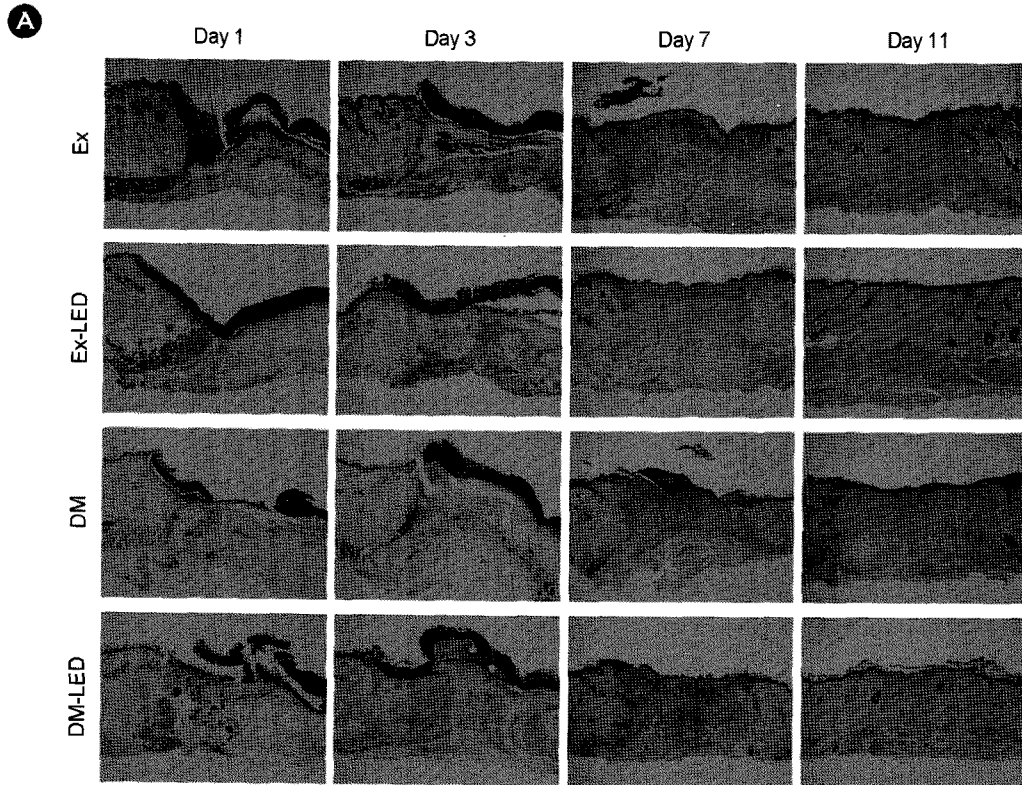


Fig. 3. Hematoxylin and eosin staining of wound healing process of skin tissues after surgery (A) and changes of the length of neo-epidermal tissues (B). Data are expressed as means \pm standard deviations. The length of neo-epidermis in the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups at the day 3 and 7 groups ($P < 0.05$, $**P < 0.01$), whereas the length of neo-epidermis in the day 11 groups was significantly lower than that of the day 7 groups ($\#P < 0.05$). Original magnification, $\times 40$.

을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6A). 콜라겐 밀도는 피부절제 후 3일째 단순절제군에 비해 단순절제-LED군에서, 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 각각 유의하게 증가하였고 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 7일째와 11일째에서도 단순절제군에 비해 단순절제-LED군에서, 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 각각 유의하게 증가하였다 ($P < 0.01$,

$P < 0.001$; Fig. 6B).

비만세포의 분포 및 밀도 변화

비만세포는 모든 군에서 육아조직의 표층부보다 심층부에 주로 출현하였고 그 대부분은 난원형으로 혈관 가까이 분포하였으며 과립형과 탈과립형의 두 형태로 관

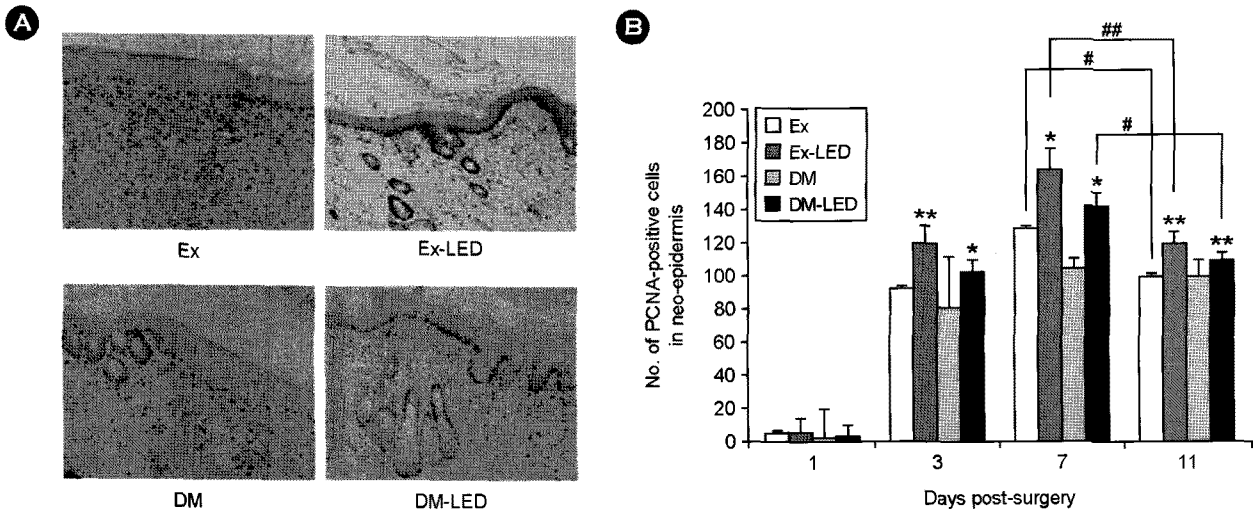


Fig. 4. Immunohistochemical staining of PCNA-positive cells in the neo-epidermal tissues at day 7 after surgery in respective groups (A) and changes of the numbers of PCNA-positive cells in neo-epidermal tissues (B). Data are expressed as means \pm standard deviations. The number of PCNA-positive cells in the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups at the day 3, 7 and 11 groups ($P < 0.05$, $**P < 0.01$), whereas the number of PCNA-positive cells in the day 11 groups was significantly lower than that of the day 7 groups ($*P < 0.05$, $##P < 0.01$). The staining intensity of PCNA-positive cells in the LED-irradiated groups appeared stronger than that of the non-LED groups. Original magnification, $\times 200$.

찰되었다 (Fig. 7A). 비만세포 수는 피부절제 후 1일부터 7일까지 네 군 모두에서 증가하다가 11일째 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 피부절제 후 1일부터 7일째까지 단순절제군에 비해 단순절제-LED군에서 각각 유의한 증가를 보였고 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 당뇨절제군에 비해 당뇨절제-LED군에서 각각 유의한 증가를 보였으며 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$), 11일째에서도 네 군 모두 7일째 보다 감소하였으나 단순절제군이나 당뇨절제군에 비해 단순절제-LED군과 당뇨절제-LED군에서 각각 유의한 증가를 나타내었다 ($P < 0.05$, $P < 0.05$; Fig. 7B).

고 찰

본 실험은 LED 조사가 정상 쥐와 당뇨 쥐의 상처치유에 미치는 영향을 보기 위한 것으로 실험에는 비교적 피부에 깊이 투과되는 적색의 630 nm LED를 사용하였고 쥐의 당뇨 유도제로는 잘 알려진 STZ를 사용하였다. STZ 투여 쥐는 투여 후 3일째부터 12마리 모두에서 체중이 뚜렷이 감소하였으며 음식과 물 섭취량이 단순절제군에 비해 크게 증가하여 당뇨병이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 STZ가 선택적으로 췌장의 β -세포를 파괴하여 인슐린 합성과 분비를 억제하여 고용량 STZ 일회 투여 후 2~3일 내에 1형 당뇨병을 유발하기 때문에 당뇨병 실험모델로서 적합하다는 이전의 결과들과 동

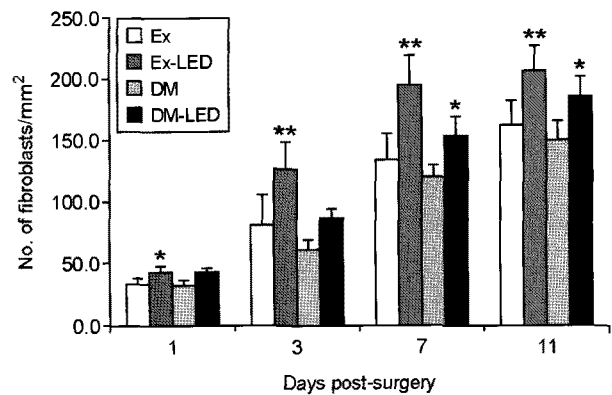


Fig. 5. Changes of the numbers of fibroblasts per mm^2 . Data are expressed as means \pm standard deviations. The number of fibroblasts in the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

일함을 입증할 수 있었다 (Tsuboi et al., 1992; Connelly et al., 2007).

피부 상처치유에 대한 광선 치료의 효용성은 이미 잘 알려져 있으나 과거 이 분야에 관한 몇몇 연구에도 불구하고 대부분 연구의 실험 결과는 여전히 상반된 의견을 보이고 심지어 촉진 효과가 없다는 결과들도 있다 (Allendorf et al., 1997; Petersen et al., 1999; Schlager 2000; Walker, 2000). 우리의 실험 결과 630 nm 적색 LED 조사가 단순절제군 및 당뇨절제군에서 절제 후 1일부터 상처치유율이 증가되기 시작하여 11일까지 계속 증가되었으

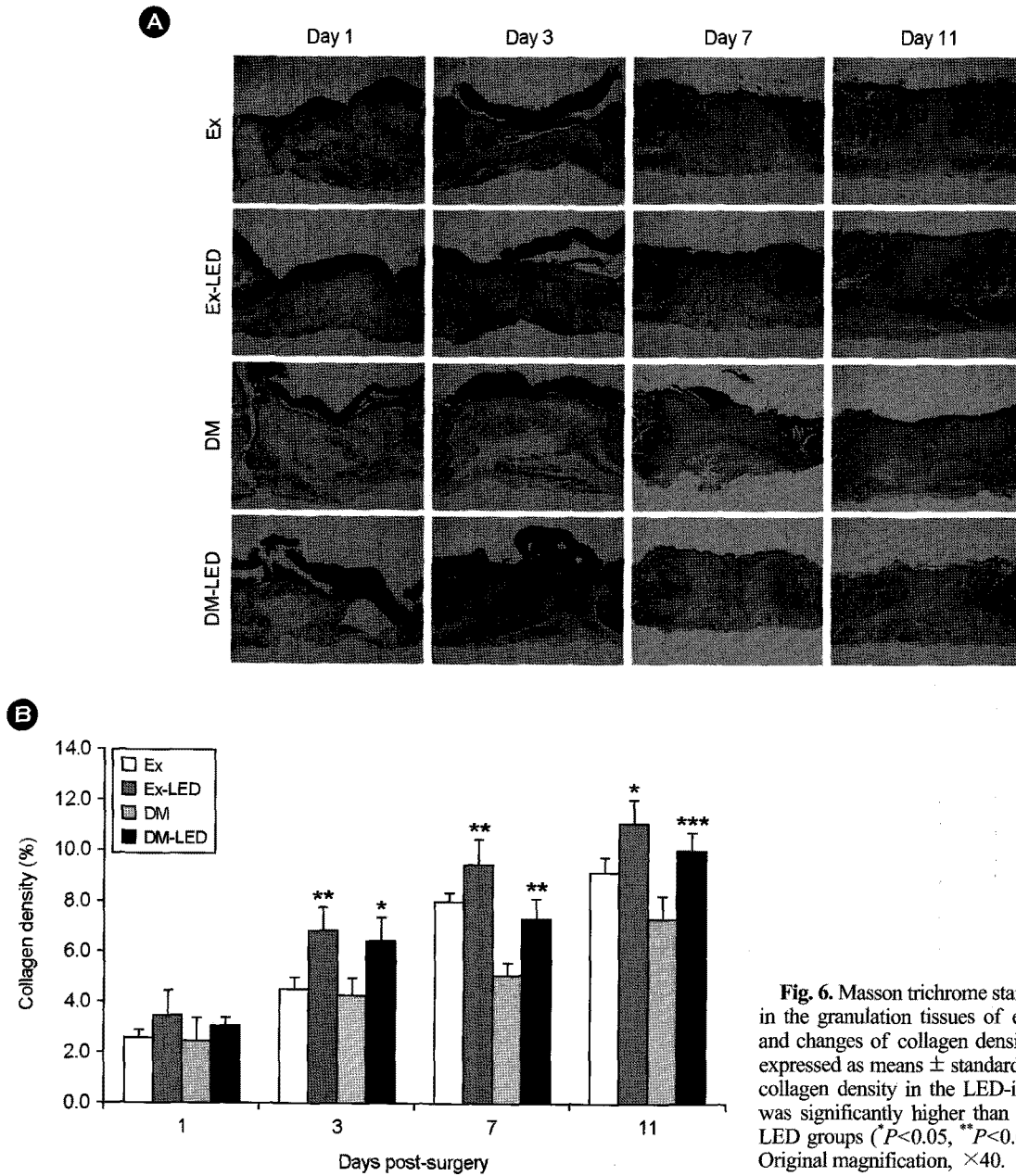


Fig. 6. Masson trichrome staining of collagen in the granulation tissues of excised skin (A) and changes of collagen density (B). Data are expressed as means \pm standard deviations. The collagen density in the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups ($P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). Original magnification, $\times 40$.

며 특히 당뇨절제-LED군에서는 당뇨절제군에 비해 체중 증가도 동반되어 당뇨절제군에서는 LED 조사가 상처치유 및 체중감소를 지연시키는 효과도 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 상처치유율이 단순절제군의 시간경과에 따른 자연적인 치유율 이상으로 증가하지 않아 당뇨절제군에서의 LED의 효과는 단순절제군에 대한 LED 효과만큼은 높지 않은 것으로 나타났다.

이러한 결과는 비집중성 광인 LED 또는 집중성 광인 레이저를 조사하였을 때 모두 당뇨 쥐에서 절제 후 168 시간 동안 상처직경이 감소하며, 비당뇨군에 비해 당뇨

군에서 좀 더 뚜렷한 상처직경 감소를 보인다는 결과와 일치하였다 (Pessoa et al., 2004; Rabelo et al., 2006). 레이저는 집중성 광 조사에 의해 생기는 단색성을 이용하므로 좀 더 발색단에 특이적으로 흡수되지만, LED는 비집중성의 넓은 띠 광원으로 여러 발색단을 동시에 흥분시킬 수 있기 때문에 다양한 생화학적 반응을 유도한다는 특성 (Dall Agnol et al., 2009)을 고려한다면 그 효과는 레이저보다 우수할 것으로 생각된다.

상처치유 과정은 염증기, 증식기, 재형성기의 3단계로 구성되어 있으며, 염증기에는 적혈구와 대식세포가 상처

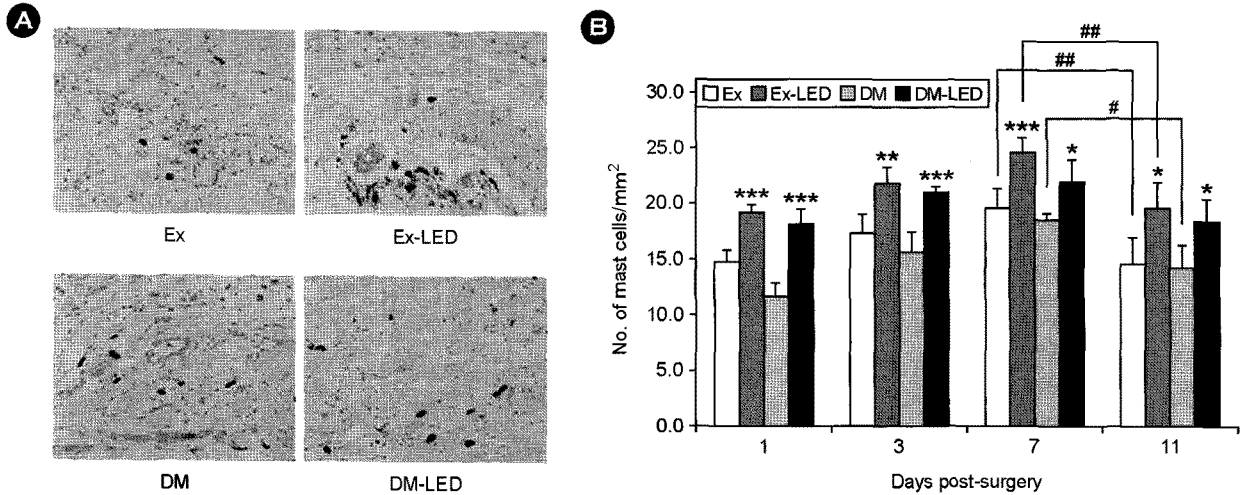


Fig. 7. Toluidine blue staining of mast cells in the granulation tissues of excised skin at day 7 after surgery in respective groups (A) and changes of the numbers of mast cells per mm² (B). Data are expressed as means \pm standard deviations. The number of mast cells in the LED-irradiated groups was significantly higher than that of the non-LED groups (* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001), whereas the number of mast cells in the day 11 groups was significantly lower than that of the day 7 groups (# P <0.05, ## P <0.01). Original magnification, \times 200.

부위에 이주하여 섬유모세포를 활성화시키고, 섬유모세포는 증식기에 증가하여 재형성기에 세포외기질과 콜라겐을 생성한다 (Posten et al., 2005). 우리의 연구에서도 섬유모세포와 콜라겐이 절제 후 3일부터 네 군 모두에서 크게 증가하기 시작하여 11일까지 계속 증가하였는데 섬유모세포의 경우 절제 후 1일째부터 단순절제군과 당뇨절제군에 비해 단순절제-LED군과 당뇨절제-LED군에서 유의한 증가를 나타낸 반면, 콜라겐의 경우 절제 후 1일째에는 단순절제군과 당뇨절제군에 비해 단순절제-LED군과 당뇨절제-LED군에서 유의한 증가를 보이지 않다가 절제 후 3일째부터 급격히 증가하기 시작하여 11일까지 유의한 증가를 나타내어 LED 조사가 섬유모세포를 활성화함으로써 그 후 콜라겐 증가를 유도한 것으로 생각된다. 1976년 Miller도 육아조직의 주요 구성성분이 1형과 3형 콜라겐으로 1형이 80~90%, 2형이 10~20%를 차지하는데 3형은 손상 후 2일째부터 상처부위에 생성되고 1형은 3일째부터 생성되며 그 후 3형은 시간이 지남에 따라 감소하는 대신 1형은 증가한다고 보고하였다 (Miller, 1976). 이 결과는 우리의 콜라겐 염색 관찰에서도 초기에는 비교적 얇고 옅은 색을 띤 콜라겐 출현이 많다가 시간경과와 함께 굵고 짙은 색을 띤 콜라겐이 많이 나타나는 것과 일치하였다.

일부 보고에 의하면 단순히 온도를 높이는 것만으로 섬유모세포를 증가시키거나 상처치유를 촉진한다고 주장하는가 하면 (Khan et al., 2004; Xia et al., 2004), 다른 보고에서는 빛 조사에 의한 열이 생체반응에 영향을 미친

다고 주장하기도 한다 (Souil et al., 2001). 우리의 실험에서는 LED를 5 J/cm²로 10분간 조사하였는데 온도를 측정하지 않아 확실히 알 수 없었으나 Tada (2009) 등의 보고에 의하면 LED를 4 J/cm²의 조건으로 160초 조사하였을 때 0.3~0.5°C의 극히 작은 온도 변화를 보임을 고려할 때 우리의 결과는 빛 조사의 비열 효과 (non-heat effect)에 의한 것으로 추정된다. 빛에 의한 이 비열 효과 기전에 관한 연구는 매우 극소수에 불과하고 아직 완전히 규명되지 않았다.

Passarella (1984) 등은 HeNe 레이저 조사가 쥐 간세포의 미토콘드리아로부터 ATP 합성을 증진시키는 것을 관찰하여 미토콘드리아가 빛의 작용을 받는 한 부분으로 간주하였다. Karu (1999)는 빛 자극에 대한 미토콘드리아의 일시적인 반응에는 산화환원반응, 전자전달계 및 superoxide 생성이 포함되며, 이 반응이 근자외선에서 적외선 흡수 스펙트럼 사이에서 발생하기 때문에 반응부위는 cytochrome c oxidase (COX)일 것으로 가정하였다. Wong-Riley (2005) 등도 COX 억제제인 tetrodotoxin과 potassium cyanide를 사용하여 실험한 결과 근자외선 빛의 LED의 효과는 COX를 경유하는 것임을 입증하였다. 또한 LED 빛은 실험관 내에서 세포 증식을 자극할 수 있고, 쥐의 피부 상처에서 삼출액 내의 백혈구의 기능적 작용을 증진하며, 염증기에서 증식기로의 이행을 자극하고, 상처의 삼출액 내 백혈구의 superoxide dismutase의 활성과 nitric oxide (NO)의 형성을 자극하여 산화스트레스를 감소시킨다는 보고도 있다 (Klebanov et al., 2006).

조직 손상 후 각질세포는 표피를 재형성하기 위해 독립적으로 상처 가장자리로 이주하며, 이주를 마친 각질세포는 증식하여 표피를 재구성하는데, 각질세포의 증식과 이주는 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF) 그리고 epidermal growth factor (EGF)를 포함하는 몇 가지의 성장인자에 의해 조절에 의해 이루어진다고 알려져 있다 (Singer and Clark, 1999; Stallmeier et al., 1999).

본 연구에서도 절제된 표피 가장자리로부터 신생 각질세포의 증식과 이동은 단순절제군이나 당뇨절제군 모두 절제 후 3일 후부터 뚜렷한 증가를 나타내었으며, 절제 후 7일째 가장 높게 증가하였다가 11일째는 오히려 감소하였는데 이는 육아조직 형성과 함께 조직수축이 동반되어 나타난 결과로 추정된다.

표피의 재생능을 보기 위한 실험에서도 LED 조사군이 단순절제군이나 당뇨절제군에 비해 절제 후 3일 후부터 7일까지 뚜렷하게 각질세포의 이동과 증식을 촉진시켜 신생표피의 길이를 증가시키는 것으로 나타났으며, 이는 세포 증식능을 알 수 있는 PCNA 염색 상에서 PCNA-양성세포의 증가와 염색강도의 뚜렷한 증가를 통하여 확인할 수 있었다. 이 결과는 Jekal (2008) 등이 고전압맥동 전류에 의한 전기자극이 STZ 유도 당뇨 흰쥐에서 신생표피 증식과 두께가 뚜렷이 증가하였다는 결과와 일치하며, 이 같은 LED 조사에 의한 신생표피 증식과 이동의 증가는 LED 빛의 자극이 각질세포의 증식을 촉진시키는 성장인자의 조절에도 관여하는 것으로 생각된다.

마지막으로 본 실험에서 비만세포의 수는 절제 후 1일부터 7일까지 단순절제군과 당뇨절제군에서 모두 증가하였다가 11일째 감소하였다. 또한 비만세포 수는 절제 후 1일째와 3일째는 단순절제군에 비해 당뇨절제군에서 뚜렷한 감소를 보였으나, 7일째와 11일째는 두 군 사이에 유의한 차이가 없어 당뇨절제군의 경우 특히 조직 손상 초기에 단순절제군에 비해 비만세포의 동원과 증식이 늦어짐을 확인할 수 있었다. 비만세포에 대한 LED 효과 실험에서는 단순절제-LED 군과 당뇨절제-LED군이 단순절제군이나 당뇨절제군에 비해 실험기간 동안 뚜렷한 증가를 보여 비만세포의 이동 및 증식에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이 결과는 저출력 레이저 치료가 2등급 화상조직에서 치유 과정에서 염증기와 증식기에 비만세포 수를 증가시켰다가 재형성기에 감소시킨다는 결과와 일치하였다 (Vasheghani et al., 2008). 이는 본 실험에서 단순절제군이나 당뇨절제군에 비해 단순절제-LED군

과 당뇨절제-LED군에서 상처치유가 비교적 빠르게 진행되는 것은 LED 빛 조사에 의해 상처치유 초기에 비만세포가 증가되고 증가된 비만세포로부터 방출된 히스타민과 같은 매개물질들에 의해 섬유모세포, 내피세포의 증식 및 각질세포의 분열이 촉진된 결과로 볼 수 있다 (Katayama et al., 1992; Maurer et al., 1997).

우리의 실험 결과를 종합해 볼 때 본 연구를 통하여 LED 조사가 STZ 유도 당뇨 쥐에서 상처치유 지연을 개선할 수 있음을 보여주었다. 이 결과는 LED 빛이 피부 표층과 심층부에 작용하여 비만세포의 이주와 증식을 증가시키고, 상처부위에서 비만세포의 탈과립을 자극하여 섬유모세포 및 표피세포의 증가를 유도하여 상처치유 향상에 기여할 것으로 사료된다. 그리고 본 실험에서 확인할 수는 없었으나 실험을 연장할 경우 비만세포 수의 감소는 섬유모세포의 감소를 유도하여 콜라겐 감소를 가져올 것으로 예상되므로 추후 좀 더 실험기간을 연장하여 비만세포의 변화를 조사할 필요가 있다. 또한 LED 빛은 피부 상처치유의 초기에 비만세포로부터의 성장인자나 사이토카인과 같은 매개물질의 방출에 중요한 역할을 할 것으로 추정됨으로 앞으로 당뇨 환자의 피부 상처치유에 있어 LED 조사가 상처치유에 미치는 영향을 정확히 규명하기 위해서는 이 실험모형에서 성장인자나 사이토카인과 같은 분자발현에 어떻게 영향을 미치며, 상처치유 과정에서 출현하는 세포들 사이의 상호작용 기전 대한 조사가 더 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 원광보건대학 교내연구비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

- Allendorf JD, Bessler M, Huang J, Kayton ML, Laird D, Nowygrod R, Treat MR. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. *Lasers Surg Med.* 1997. 20: 340-345.
- Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet Med.* 2006. 23: 594-608.
- Barolet D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008. 27: 227-238.

- Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest*. 2007. 117: 1219-1222.
- Connelly K, Kelly D, Gilbert R. Clinically relevant models of diabetic cardiac complications. *Circ Res*. 2007. 101: 78-80.
- Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2009. 24: 909-916.
- Enerback L. Mast cells in rat gastrointestinal tract: Effect of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1966. 66: 289-302.
- Fahey TJ 3rd, Sadaty A, Jones WG 2nd, Barber A, Smoller B, Shries GT. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J Surg Res*. 1991. 50: 308-313.
- Goodson WH 3rd, Hung TK. Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J Surg Res*. 1977. 22: 221-227.
- Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms for Low-Light Therapy. *Proc SPIE*. 2006. 6140: 1-12.
- Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol*. 2004. 4: 1873-1880.
- Jekal SJ, Lee KS, Chung OB, Lee JH. Effects of Electrical Stimulation on Wound Healing and Skin Mast Cells in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Korean J Clin Lab Sci*. 2008. 40: 118-128.
- Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 2000. 42: 389-413.
- Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999. 49: 1-17.
- Katayama I, Yokozeki H, Nishioka K. Mast-cell-derived mediators induce epidermal cell proliferation: clue for lichenified skin lesion formation in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992. 98: 410-414.
- Khan AA, Banwell PE, Bakker MC, Gillespie PG, McGrouther DA, Roberts AH. Topical radiant heating in wound healing: an experimental study in a donor site wound model. *Int Wound J*. 2004. 1: 233-240.
- Klebanov GI, Shuraeva NI, Chichuk TV, Osipov AN, Vladimirov IA. Comparison of the effects of laser and light-emitting diodes on lipid peroxidation in rat wound exudate. *Biofizika*. 2006. 51: 332-339.
- Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Lee DR, Shin MS, Lee JS, You CE, Park MY. A Prospective, Randomized, Placebo-controlled, Double-blinded, and Split-face Clinical Study on LED Phototherapy for Skin Rejuvenation: Clinical, Profilmetric, Histologic, Ultrastructural, and Biochemical Evaluations and Comparison of Three Different Treatment Settings. *J Photochem Photobiol B*. 2007. 27: 51-67.
- Leibovich J, Martin P. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005. 15: 599-607.
- Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H, Park J, Kim O, Choi H. The Anti-inflammatory Mechanism of 635nm light-emitting diode irradiation compared with existing COX Inhibitors. *Lasers Surg Med*. 2007. 39: 614-621.
- Maurer M, Opitz M, Hens BM, Paus R. The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-alpha inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci*. 1997. 16: 79-84.
- Miller EJ. Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens. *Mol Cell Biochem*. 1976. 13: 165-192.
- Nienartowicz A, Sobaniec-Lotowski ME, Jarocka-Cytra E, Lemancewicz D. Mast cells in neoangiogenesis. *Med Sci Monit*. 2006. 12: 53-56.
- Nishikori Y, Kakizoo E, Kobayashi Y, Shimoura K, Okunishi H, Dekio S. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: Relevance of chymase. *Arch Dermatol Res*. 1998. 290: 553-560.
- Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM, Cingolani A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett*. 1984. 175: 95-99.
- Pessoa ES, Melhado RM, Theodoro LH, Garcia VG. A histologic assessment of the influence of low-intensity laser therapy on wound healing in steroid-treated animals. *Photomed Laser Surg*. 2004. 22: 199-204.
- Petersen SL, Botes C, Olivier A, Guthrie AJ. The effect of low level laser therapy (LLLT) on wound healing in horses. *Equine Vet J*. 1999. 31: 228-231.
- Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg*. 2005. 31: 334-340.
- Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006. 24: 474-479.
- Schlager A, Kronberger P, Petschke F, Ulmer H. Low-power laser

- light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. *Lasers Surg Med.* 2000. 27: 39-42.
- Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys Med Biol.* 1998. 43: 2465-2478.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999. 341: 738-746.
- Souil E, Capon A, Mordon S, Dinh-Xuan AT, Polla BS, Bachelet M. Treatment with 815-nm diode laser induces long-lasting expression of 72-kDa heat shock protein in normal rat skin. *Br J Dermatol.* 2001. 144: 260-266.
- Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 1999. 113: 1090-1093.
- Tada K, Ikeda K, Tomita K. Effect of polarized light emitting diode irradiation on wound healing. *J Trauma.* 2009. 67: 1073-1079.
- Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Brocker EG. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 is corrected with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol.* 2000. 190: 100-106.
- Tsuboi R, Shi CM, Rifkin DB, Ogawa H. A wound healing model using healing-impaired diabetic mice. *J Dermatol.* 1992. 19: 673-675.
- Vasheghani MM, Bayat M, Rezaei F, Bayat A, Karimipour M. Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. *Photomed Laser Surg.* 2008. 26: 1-5.
- Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med.* 2000. 26: 41-47.
- Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M, Whelan HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005. 280: 4761-4771.
- Xia Z, Sato A, Hughes MA, Cherry GW. Stimulation of fibroblast growth in vitro by intermittent radiant warming. *Wound Repair Regen. Int Wound J.* 2004. 1: 233-240.