

## 췌장 베타세포에서 스트렙토조토신으로 유도한 인슐린 의존형 당뇨병 실험 모델

이인순 · 이인자\* · 김경태  
포항공과대학교 생명과학과, \*효성가톨릭대학교 약학대학  
(Received January 20, 1997)

### Prediabetic *In vitro* Model in Pancreatic Beta Cells Induced by Streptozotocin

Ihn-soon Lee, In-ja Rhee\* and Kyong-tai Kim

Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea  
\*College of Pharmacy, Catholic University of Taegu-Hyoseung, Kungsan 713-702, Korea

**Abstract**—To establish prediabetes in vitro model concerning the etiology of IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) in cellular level we have designed prediabetes in vitro models in pancreatic beta cells. HIT-T15, RINm5F and isolated rat islets were chosen as pancreatic beta cells, and streptozotocin (STZ) used as diabetogenic agent. Degree of beta cell destruction to establish prediabetic in vitro model was determined by cell proliferation and insulin release using thymidine uptake and radio immuno assay. When HIT-T15 and RINm5F cells were treated with STZ, the degree of cell deterioration was dependent upon the origin and passage number of beta cells, and in the case of isolated islets STZ showed the more sensitivity than above two beta cell lines. The concentration and exposure time of STZ treatment to establish prediabetes in vitro model in beta cell lines and isolated rat islets were 2~10 mM, 30 min. and 1~5 mM, 30 min., respectively.

**Keywords** □ type 1 diabetes (IDDM), streptozotocin, RINm5F, HIT-T15.

인슐린 의존형 당뇨병은 유전적 감수성과 각종 환경 인자에 의해 췌장베타세포의 자가 면역적 파괴가 일어나 인슐린 결핍을 초래하는 내분비 질환이다.<sup>1)</sup>

이 질환이 발병하면 고혈당, 다음(polydipsia), 다식(polyphagia), 다뇨(polyuria), 체중감소 등의 임상증상이 나타나며 혈중 인슐린이 절대적으로 부족하여 경구용 항 당뇨병제(oral antidiabetic drug)로는 치료가 불가하여 인슐린 요법이 필수적이다.<sup>2)</sup> 인슐린 의존형 당뇨병에 관한 연구를 사람(human subjects)을 대상으로 하는 것은 윤리적인 문제 등 실제 수행에 많은 한계를 가지므로<sup>3)</sup> 동물모델이나 안전하게 연구할 수 있는 실험 모델이 필요하다.

지금까지 보고된 실험 모델은 외과수술(surgical pancreatectomy), 화학물질(chemical agents), 바이러스(viral infections)에 의한 동물 실험 모델, BB (Bio Breed) rat 와 같은 자발적으로 일어나는 당뇨 모델(spontaneous diabetes) 등이 있다.<sup>2)</sup> 이들 동물 모델들은 사람의 제1형 당뇨병과 임상증상이 거의 유사하여 병인론(etiology), 치료양식(therapeutic modalities), 합병증(complications) 등의 연구에 유용한 도구가 되고 있다.<sup>4,5)</sup>

인슐린 의존형 당뇨병은 비교적 오랜 기간의 당뇨 전 단계(prediabetic stage)를 거치며, 일단 발병하면 인슐린 주사의 번거러움, 합병증의 위험 등으로 환자는 물론 가족들에게 큰 부담을 주게 된다. 따라서, 전 당뇨병(prediabetes) 시기에 베타세포의 완전한 파괴를 막아 인슐린 의존형 당뇨병을 예방하는 것이 가장 바람직한

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 053-850-3619 (팩스) 053-850-3602

치료 방법이므로, 세포수준에서 전 당뇨병의 실험 모델(prediabetic in vitro model)의 확립이 필요하다고 사료되어 당뇨병 유발 약물 STZ으로 베타 세포주(RINm5F, HIT-T15)와 분리한 소도세포에서 전 당뇨병 실험모델을 만들려고 시도하였다. 지금까지 STZ을 이용한 당뇨에 관한 연구는 동물(baboon<sup>13)</sup>, rat<sup>23-25)</sup>, mouse<sup>26-28)</sup>과 소도세포<sup>29-32)</sup>에서 많이 행해졌으며, 세포주를 이용한 연구는 STZ 처리 베타세포주가 apoptosis에 의하여 세포사멸(cell death)을 초래한다는 보고<sup>34)</sup>는 있으나, 베타세포주의 세포활성과 인슐린 분비 정도를 측정하여 제1형 전 당뇨 모델을 확립한 연구는 없었다.

이에 본 연구자들은 세포수준에서 인슐린 의존형 당뇨병의 전 당뇨 모델(prediabetic model)을 확립하여 동물모델에 비해 재현성과 경제성이 뛰어나 제1형 당뇨병을 예방할 수 있는 후보약물들의 검색과 분자생물학적인 기전 연구로의 접근이 용이한 실험모델을 만들었다.

**실험방법**

**시약**

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640 medium (Sigma, USA), Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, USA), Streptozotocin (Sigma, USA), [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham, USA), Insulin RIA Kit (Eiken, Japan), Rat Standard Insulin (Novo, Japan), Trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA), Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL, USA), Scintillation cocktail (Aqualuma Plus, Lumac, Netherland), Collagenase (Type IV, Worthington, USA), Ficoll (Sigma, USA), Glucose (Sigma, USA) 등이며 그외의 시약은 특급 및 일급시약을 사용하였다.

**세포배양 조건**

세포주는 ATCC (American Tissue Culture Collection)에서 구입한 RINm5F cell과 HIT-T15 cell을 실험에 사용하였다.

흰쥐와 햄스터에서 각각 유래한 췌장 베타세포주 RINm5F<sup>6)</sup>과 HIT-T15<sup>7)</sup> cell은 10% FBS, penicillin-streptomycin(100 unit-100 µg/ml), 5.5 mM

glucose가 함유된 RPMI 1640배지(complete medium, CM)에서 3~4일 간격으로 계대 배양하면서 유지시켰다. HIT-T15 cell은 passage number 63을 분양받아 배양하였으며 RINm5F cell은 passage number가 기재되지 않은 세포주를 배양받아 처음 배양 후 20 passage까지를 early passage, 30번 이상 계대 배양 후의 passage를 late passage로 명명하였다.

실험을 위해서는 매 실험 1~2일전 배양된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척하고 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 세포를 분리시켜 complete medium으로 5×10<sup>4</sup>cell/ml 농도가 되도록 조정하여 각각의 세포를 안정화시켜서 실험에 이용하였다.

**췌장 소도세포 분리<sup>8)</sup>**

체중 150~200 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 실험 동물로 사용하여 실험 전날 밤부터 절식시킨 후, 체중 Kg당 60 mg의 pentobarbital을 복강내로 주사하여 마취시키고 75% alcohol로 복부를 소독한 후 개복하였다.

총담관(common bile duct)이 십이지장으로 연결되는 부위를 결찰하고 근위부 총담관(proximal common bile duct)에 25게이지 바늘을 삽입하고 4°C로 냉각시킨 collagenase(1 mg/ml in HBSS, Type IV) 용액을 주입하여 췌장을 팽창시켰다.

팽창시킨 췌장을 떼어 내어 37°C 항온조에서 20분간 방치한 후, 미리 냉각시킨 HBSS(Hanks' balanced salts solution) 용액 20 ml를 넣고 굵은 피펫으로 수차례 기계적인 조작을 가한 다음 얼음 수조에서 용액을 상하 혼합하였다.

이 혼합액을 약 3분간 방치한 후 상층액을 다른 시험관에 옮기고, 가라 앉은 pellet에 냉각된 HBSS 용액 20 ml을 다시 넣어 같은 조작을 2회 시행하고 상층액을 한 시험관에 모았다. 이 상층액의 윗층에 뜬 지방, lymph조직 등을 제거하고 200×g에서 5분간 원심분리하여 췌장조직들을 회수한 다음 2회 세척하였다.

이렇게 침전된 췌장조직에 27%, 23%, 20%, 11%의 Ficoll 용액을 넣어 불연속 구배를 만들고 실온에서 800×g으로 제동(brake)없이 15분간 원심분리하여, Ficoll용액 20%와 11%의 농도 사이에 선택적으로 모인 소도세포를 수거하여 complete medium으로 2회 세척하였다.

이렇게 분리한 췌장 소도세포는 complete medium 10 ml에 분주한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하룻밤 배양하였다.

### 세포증식<sup>9)</sup>

베타세포의 세포증식 정도는 thymidine uptake법으로 관찰하였다.

세포 배양을 마치기 24시간 전 배지에 2  $\mu$ ci의 methyl-<sup>3</sup>H-thymidine을 넣고 배양한 후, 배양액의 상층액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음, 0.5 N-NaOH 500  $\mu$ l/well를 넣어 세포를 용해시켰다.

Shaker (Amersham, Germany, model No : 2MD 202)를 이용하여 세포 용해물을 골고루 섞은 다음, 용해액 200  $\mu$ l를 취하여 Scintillation cocktail (Aqualuma Plus) 10 ml를 넣고  $\beta$ -counter (Beckman, USA)로 <sup>3</sup>H의 편입(incorporation)정도를 측정하였다.

### 인슐린 분비<sup>10)</sup>

인슐린 분비정도는 방사면역법(RIA : radioimmunoassay)으로 측정하였다. 48시간 배양한 베타세포의 상층액을 PBS로 적절하게 희석하여 분석시료로 200  $\mu$ l/tube씩 취하였다.

standard로는 쥐 인슐린을 사용하였으며, 각 농도별 standard solution을 200  $\mu$ l/tube씩 취하여 standard curve 작성에 사용하였다. Antibody로는 guinea pig antiporcine insulin antiserum을 사용하여 시료 및 표준 인슐린 용액에 각각 200  $\mu$ l씩 넣었다. 여기에 <sup>125</sup>I-insulin 용액을 각 시험관에 200  $\mu$ l씩 넣었으며 총 <sup>125</sup>I-insulin 량을 알기 위해서 한개의 시험관에는 <sup>125</sup>I-insulin 만 200  $\mu$ l 넣었다(총 <sup>125</sup>I-insulin). 각 시험관을 잘 흔들어서 마개를 하고 실온에서 하룻밤(18~24 hr. 동안) 방치한 후 총 <sup>125</sup>I-insulin 측정용 시험관을 제외한 나머지 시험관의 상층액을 버리고 반응하지 않은 <sup>125</sup>I-insulin을 깨끗이 제거한 다음 <sup>125</sup>I-insulin-antibody 중의 radioactivity를  $\gamma$ -counter로 측정하였다.

### 통계처리

통계처리는 SPSS프로그램을 사용하여 Student's unpaired/paired *t*-test로 검정하였으며 유의수준은 *p*<0.05 또는 *p*<0.01로 하였다.

## 결과 및 고찰

베타세포에서 제 1형 전 당뇨(prediabetes)모델을 만들기 위해 선택적 베타세포 독성을 나타내는 streptozotocin을 사용하였다.

Streptozotocin은 포도당과 구조적으로 유사한 D-glucosamine의 N-nitroso 유도체로서, deoxyglucose 부분에 의해 베타세포의 세포막 투과를 항진시키며, 뒤이어 nitrosourea 부분에 의해 세포독성을 발생시켜 세포막 장애와 세포내 상해를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>11-14)</sup>

Streptozotocin을 이용하여 햄스터 유래 췌장베타세포(HIT-T15 cell), 흰쥐에서 유래한 췌장 베타세포(RINm5F cell), 그리고 SD계 수컷 흰쥐로부터 분리한 췌장소도에서 세포손상을 유발시킨 결과, 세포들이 유래하는 종(strain)에 따라 감수성의 차이를 보였지만 모두 세포활성 또는 인슐린 분비가 감소되는 추세를 보였다(Fig. 1, 4, Table I).

Fig. 1에서는 베타세포를 선택적으로 파괴하는 환경인자로 streptozotocin을 처리했을 때 HIT-T15 cell의 세포증식에 미치는 영향을 나타내었다. HIT-T15 cell에 대한 streptozotocin의 손상 정도는 농도 의존형이

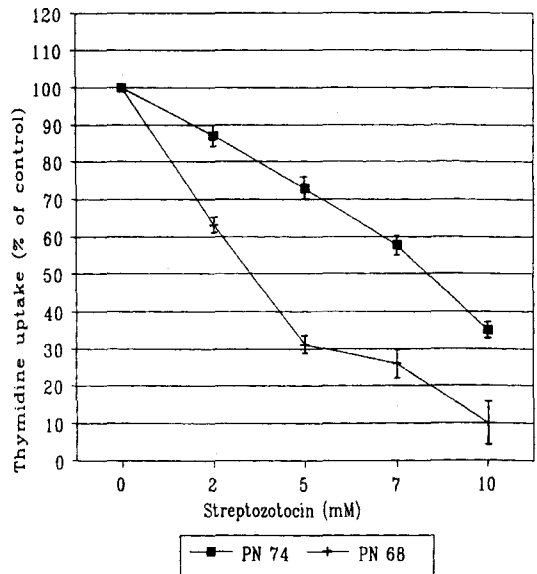


Fig. 1 — STZ-induced model of HIT-T15 Cell by <sup>3</sup>H-thymidine uptake. Each point and bar represent a mean and S.D. of 4 replicates wells. PN; passage number.

었으며, passage number 68의 세포가 passage number 74의 세포보다 훨씬 더 예민하게 streptozotocin에 반응함을 알 수 있었다 (Fig. 1). 90% 이상(total or almost total)의 베타세포가 파괴되었을 때 제 1형 당뇨병의 임상증상이 나타나는 것을 고려할 때<sup>15)</sup> 2 mM-10 mM streptozotocin 농도범위에서 10~90%의 세포활성 억제가 나타나 이 범위에서 streptozotocin 유도 prediabetes 모델이 확립되었다고 생각되어진다.

HIT-T15 Cell은 Syrian 햄스터의 췌장소도를 Simian virus 40으로 transformation한 췌장소도 베타세포주이다.<sup>16)</sup>

HIT-T15 cell은 생리적(physiological), 약리적(pharmacological) 자극 즉, 포도당, 아미노산, 관련 호르몬, sulfonyl ureas 등에 대해 적절한 반응성을 보유하는 정상세포의 특성을 가지므로 많은 연구자들이 이 HIT-T15 cell을 베타세포 기능 연구에 유용한 모델로 그 가치를 평가하고 있다.<sup>17)</sup> 그러나 glucose에 대한 인슐린 반응성은 cell의 passage number가 증가함에 따라 감소하기 때문에 glucose-induced insulin secretion에 관한 연구에서는 passage number를 81까지 제한하여야 한다.<sup>16, 18)</sup> 본 실험에서도 glucose 구조 유사성을 가진 streptozotocin<sup>33)</sup>에 의한 세포 손상에 있어서 passage dependence현상(Fig. 1)을 나타내는 것은 HIT-T15 cell의 glucose 반응성에 대한 passage dependence와 관련이 있는 것 같다.

Fig. 2의 결과에서는 RINm5F cell의 경우 streptozotocin의 처리량이 2 mM에서 10 mM범위로 증가 시킴에 따라 세포중식이 대조군에 비해 35~70%까지 억제되어짐을 보여주고 있다. HIT-T15 cell에 비하면 (Fig. 1) 다소 완만한 손상 경향을 관찰할 수 있었으나, 이 경우에도 역시 early passage가 late passage 보다 streptozotocin 손상에 더 예민한 반응을 나타내었으며, 2 mM~10 mM streptozotocin 농도범위에서 prediabetes모델이 확립되었다.

RINm5F cell은 여러가지 약제들(agonist, antagonist)에 의해 인슐린 분비량의 적절한 변화를 나타내는 베타세포주이다.<sup>19)</sup> 특히 glucose 반응성을 보면 낮은 농도에서는 매우 감수성이 높아 전형적인 정상 베타세포의 특성을 나타내나, glucose 농도가 높은 조건에서는 부적절한 감수성을 나타내며 passage number에도 제한을 받는다.<sup>20, 21)</sup> 본 실험에서 RINm5F

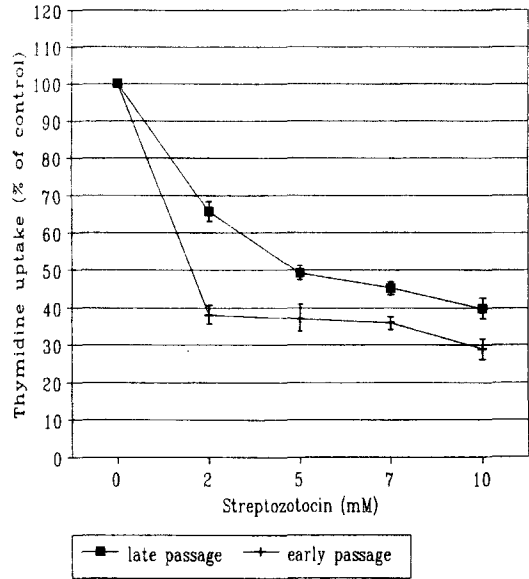


Fig. 2—STZ-induced model of RINm5F cell by <sup>3</sup>H-thymidine uptake. Each point and bar represent a mean and S.D. of 4 replicates wells. The meanings of early passage and late passage describe in the experimental method section.

cell이 streptozotocin에 의해 손상이 유발되는 정도 (Fig. 2)가 5 mM streptozotocin 농도에서 부터는 HIT-T15 cell에 비해 비교적 완만한 경향을 나타내는데, 이것은 고농도 glucose에 대한 RINm5F cell의 부적절한 반응성<sup>20)</sup>과 관련이 있는 것 같다. 따라서, RINm5F cell의 전 당뇨 모델(prediabetes model) 설정시에는 2 mM정도의 낮은 농도를 택하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

분리된 흰쥐의 췌장소도의 경우 성숙동물(adult animal)의 췌장 베타세포의 증식은 한계가 있어서<sup>22)</sup> 세포 증식 측정이 불가능하였다. 따라서 소도세포의 기능손상 정도, 즉 인슐린 분비정도를 측정하여 당뇨 전 단계모델을 만들었다. 그 결과를 Table I에 나타내었는데 streptozotocin을 처리한 실험군에서의 인슐린 분비가 대조군에 비해 농도 의존형으로 감소되었다. 분리된 흰쥐의 췌장소도에서 streptozotocin에 의한 손상정도는 다른 베타세포주들에 비해 다소 낮은 농도에서 나타났다 (Table I). HIT-T15 cell과 RINm5F cell의 경우 세포 주로 수립하는 과정에서 베타세포의 기능은 유지시킨 체 transgenic 또는 transformation 시킨 것인 반면, 분리된 흰쥐의 췌장소도들은 흰쥐에서 분리하여 primary

culture한 것이기 때문에 streptozotocin과 같은 환경 인자에 후자가 더 예민하게 반응하는 것 같다.

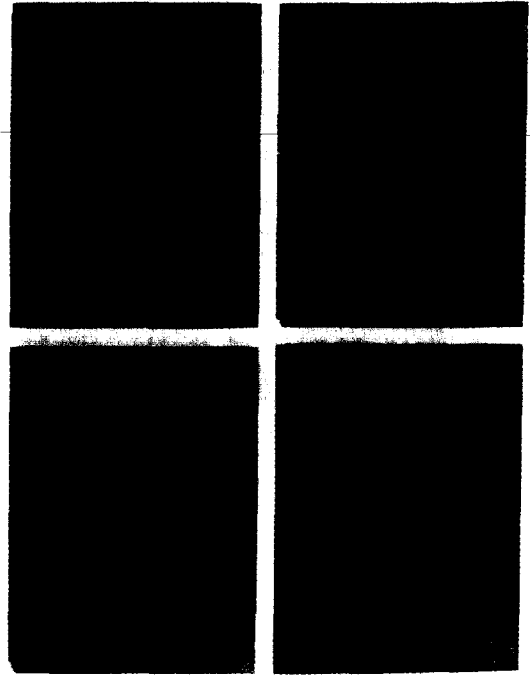
Streptozotocin에 의한 베타세포주들의 morphology 변화(Fig. 3, 4)를 위상차 현미경으로 관찰하였다. HIT-T15 cell과 RINm5F cell은 모두 streptozotocin 농도의존형으로confluence가 낮아지며 베타세포수가 현저하게 감소되는 현상을 나타내어streptozotocin에 의한 손상이 직접적인 cell death에 의한을 확인할 수 있었다.

소도세포에서 나타난 streptozotocin에 의한 morphology 변화(Fig. 5)로는 소도세포막의 변화가 관찰

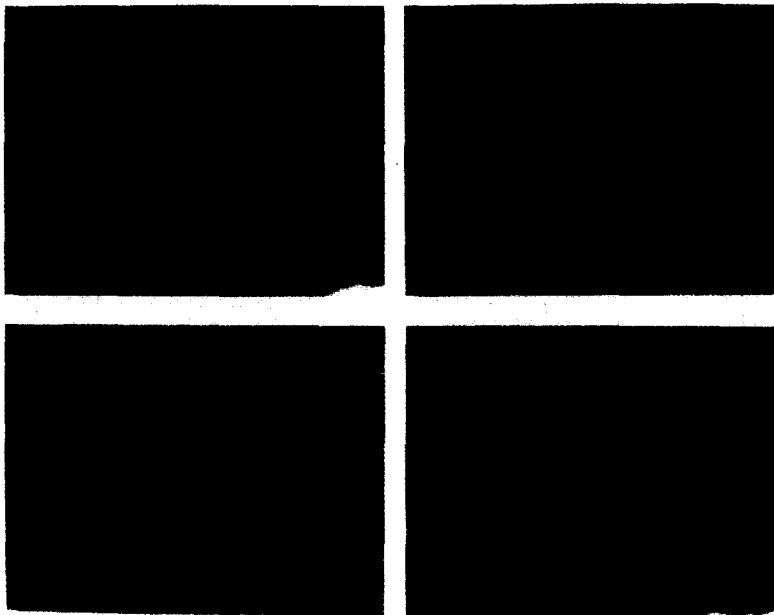
**Table I**—STZ-induced model of isolated rat islets by RIA

STZ (mM)	Insulin Release		Significance
	Mean±S.D.		
	ng/ml	% of control	
0	30.20±0.37	100	control
1	19.15±2.87	63	**
2	8.40±0.37	28	**
5	2.75±0.49	9	**

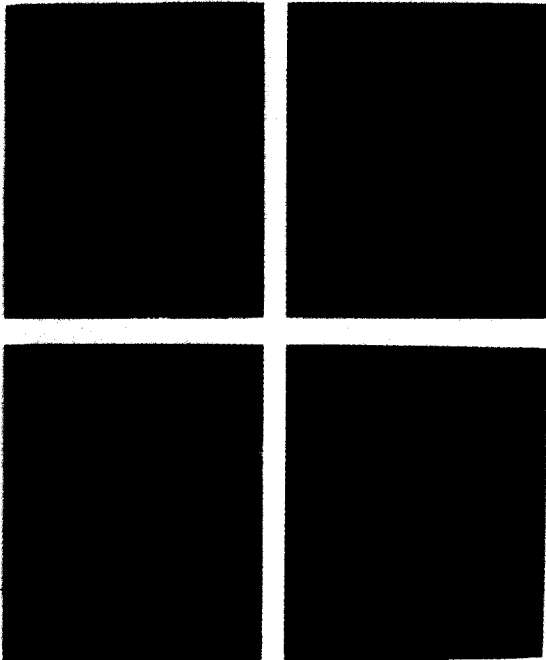
-Significant differences (\*p<0.05, \*\*p<0.01) between control and STZ treated group.  
 -STZ: streptozotocin, RIA: radioimmuno assay



**Fig. 3**—Morphological appearance of the STZ-treated HIT-T15 cells by inverted microscope (magnification×40).  
 A: control group, B: 2 mM STZ treated  
 C: 5 mM STZ treated, D: 10 mM STZ treated



**Fig. 4**—Morphological appearance of the STZ-treated RINm5F cells by inverted microscope. (magnification×40)  
 A: control group, B: 2 mM STZ treated  
 C: 5 mM STZ treated, D: 10 mM STZ treated



**Fig. 5** - Morphological appearance of the isolated rat islets treated with STZ by inverted microscope. (magnification×100)  
 A: control group, B: 1 mM STZ treated  
 C: 2 mM STZ treated, D: 5 mM STZ treated

되었는데, Streptozotocin 농도가 1 mM, 2 mM, 5 mM로 높아짐에 따라 소도세포막의 손상정도가 농도의존형으로 더욱 크게 나타났다. 이 변화된 소도세포막이 자가면역공격에 더욱 쉽게 손상받아 인슐린염 상태가 초래하여 인슐린 의존형 당뇨병으로 진행되는 것<sup>15)</sup>으로 생각되어진다.

인슐린 의존형 당뇨병 환자의 췌장소도(islets)에서는 뚜렷한 병리조직학적인 변화가 관찰되나, 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 소도는 정상인과 뚜렷한 차이를 나타내지 않는다는 보고를 고려할 때<sup>15)</sup>, morphology 변화에 대한 이러한 결과들은 본 실험에서 수립된 세포수준에서의 실험 모델이 인슐린 의존형 당뇨병의 실험 모델로서의 응용 가능성을 시사해 주는 것으로 사료된다.

**결 론**

streptozotocin 농도에 따라 HIT-T15 cell과 RINm5F cell의 형태는 confluence가 낮아지며 세포수가 감소되었으며, 분리한 소도세포의 경우 소도세포

막의 현저한 변화가 관찰되었다.

streptozotocin-induced prediabetes model 확립 시 베타세포주(HIT-T15 cell, RINm5F cell)들은 2~10 mM의 streptozotocin, 30분 노출조건에서 확립되었으며, streptozotocin의 세포독성 정도는 early passage가 late passage보다 더 민감하게 손상받는 passage dependence 양상을 나타내었고, HIT-T15 cell에 비해 RINm5F cell의 streptozotocin 세포독성 정도가 완만한 농도의존형을 나타내어 세포주 기원에 따라 streptozotocin-induced model의 확립 경향이 다르게 나타남을 알 수 있었다.

그리고 소도세포의 경우 베타세포주들 보다 streptozotocin에 더욱 민감한 반응을 보여 훨씬 낮은 농도(1~5 mM)에서 전 당뇨(prediabetes) 모델이 확립되었다.

**감사의 말씀**

본 연구는 학술진흥재단의 연구비지원으로 수행되었슴에 감사드립니다.

**문 헌**

- 1) Andreani, D., Mario U. D. : Immunology in Diabetes: Introduction and Overview in *Immunology in Diabetes*, Kimpton Medical Publications, London, p. 1-31, (1986).
- 2) Ozturk, Y., Altan V. M. and Yildizoglu-ari N. : Effects of Experimental Diabetes and Insulin on Smooth muscle Functions. *Pharmacological Reviews*, **48**(1) 69-112, (1996).
- 3) 이기업 : 제1형 당뇨병의 실험동물모델. *당뇨병*, **14**, 143 (1990).
- 4) Rossini, A., Mordes, J. P. and Like, A. A. : Animal Models of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus In *Immunology in Diabetes*, D. Andreani (Eds), Kimpton Medical Publications, London, p. 35-44 (1984).
- 5) Rossini, A. A., Handler, E. S. and Mordes, J. P. : The BB Rat as an Animal Model of Autoimmune Diabetes Mellitus In *The Immunology of Diabetes Mellitus*. Martine A. Jaworski et al. (Eds) : Kimpton Medical Publications, London, 105-111 (1986).

- 6) Varey, A. M., Lyduard, P. M., Dean, B. M., Van der Meide, P. H., Baird, J. D. and Cooke, J. : Interferon- $\gamma$  induces Class II MHC Antigens on RINm5F Cells. *Diabetes* **37**, 209 (1988).
- 7) Regazzi, R., Li, G., Deshusses, J. and Wolheim, C. B. : Stimulus-Response Coupling in Insulin-secreting HIT Cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 15003 (1990).
- 8) 이기엽, 임성희, 이문규, 이병두, 이홍규, 고창순, 민현기 : 총담관내 콜라겐 분해효소 주입법에 의한 흰쥐 췌장 소도의 분리. *당뇨병* **12**, 147 (1989).
- 9) Rabinovitch, A. : Pancreatic Monolayer cultures-Preparation of purified Islets cell cultures and Assessment of beta cell replication. In Joseph Lerner, S.L. Pohl (eds): *Methods in Diabetes Research* Vol. 1, A Wiley-Interscience Publication, NewYork, 310-314 (1985).
- 10) Johnstone, A. and Thorpe, R. : Immunoassays In *Immunochemistry in Practice* 2nd., Blackwell Scientific Publications, London, 246-254 (1987).
- 11) Eizirik D. L. and Sandler, S. : Function and Metabolism of Pancreatic  $\beta$ -Cells Maintained in Culture Following Experimentally Induced Damage. *Pharmacol. Toxicol.* **65**, 163 (1989).
- 12) Eizirik, D. L., Strandell, E. and Sandler, S. : Culture of Mouse Pancreatic Islets in Different Glucose Concentrations Modifies  $\beta$ -Cell Sensitivity to Streptozotocin. *Diabetol.* **31**, 168 (1988).
- 13) Mcculloch, D. K. and Raghu, P. K. : Defects in  $\beta$ -Cell Function and Insulin Sensitivity in Normoglycemic Streptozotocin-treated Baboons: A Model of Preclinical Insulin-dependent Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **67**, 785 (1988).
- 14) Golden, P., Baird, L., Malaisse, W. J. and Malaisse-Lagae, F. : Effect of Streptozotocin on Glucose-induced Insulin Secretion by Isolated Islets of Langerhans. *Diabetes* **20**, 513-18 (1971).
- 15) Gepts, W. : The Pathology of the Pancreas in Human Diabetes In *Immunology in Diabetes*. D. Andreani et al(Eds), Kimpton Medical Publications London, 21-34 (1984).
- 16) Zhang, H. J., Walseth, T. F. and Robertson, R. P. : Insulin Secretion and cAMP Metabolism in HIT Cells. *Diabetes* **38**, 44 (1989).
- 17) Richardson, S. B., Eyler, N., Twente, S., Monaco, M. : Effects of Vasopressin on Insulin Secretion and Inositol Phosphate Production in a Hamster Beta Cell Line (HIT). *Endocrinol.* **126**, 1047 (1990).
- 18) Olson, L. K., Redmon, L. B., Towle, H. C. and Robertson, R. P. : Chronic Exposure of HIT Cells to High Glucose Concentrations Paradoxically decreases Transcription and alters Binding of Insulin Gene Regulatory Protein. *J. Clin. Invest.* **92**, 514 (1993).
- 19) Ullrich, S. and Wollheim, C. B. : Expression of Both 1 and 2- Adrenoceptors in an Insulin Secreting Cell Line. *Molecular Pharmacol.* **28**, 100 (1985).
- 20) Halban, P. A., PrazG. A. and Wollheim C. B. : Abnormal Glucose Metabolism accompanies Failure of Glucose to Stimulate Insulin Release from a Rat Pancreatic Cell Line (RINm5F). *Biochem. J.* **212**, 439, (1983).
- 21) Sai, P., Poguand, S. and Ouary, M. : Heparin Attenuates Low-Dose Streptozotocin-induced Immune Diabetes in Mice and Inhibits the Beta-Cell Binding of T-splenocytes *in Vitro*. *Diabetol.* **34**, 212, (1991).
- 22) Brelje, T. C., Darsons, J. A. and Robert L., Sorenson : Regulation of Iset  $\beta$ -Cell Proliferation by Prolactin in Rat Islets. *Diabetes* **43**, 263 (1994).
- 23) Murray, P., Pitt, B., and Webb, R. C. : Ramipiril prevents hypersensitivity to phenylephrine in aorta from STZ-induced diabetic rats. *Diabetol.* **37**, 664 (1994).
- 24) Stephenson, Gabriela M. M., Stephenson, D. George : Single-Fiber Study of Contractile and Biochemical Skeletal Muscles in STZ-induced Diabetic Rats. *Diabetes* **43**, 622 (1994).
- 25) Cameron, N. E., Cotter, M. A., Dines, K. C., Maxfield, E. K., Carey, F., and Mirrlees, D. J. : Aldose reductase inhibition, nerve perfusion, oxygenation and function in STZ-diabetic rats. *Diabetol.* **37**, 651 (1994).
- 26) Gerling, I. C., Friedman, H., Greiner, D. L., Shultz, L. D., and Leiter, E. H. : Multiple Low-Dose STZ-induced Diabetes in NOD-scid/scid Mice in the Absence of Funtional Lymphocytes.

- Diabetes* **43**,433 (1994).
- 27) Feve, B., Segain, J. P., Charbonnel, B., and Sai, P. : B-cell adherent splenocytes precede the onset of diabetes in low-dose STZ-treated mice. *Diabetol.* **33**, 9 (1990).
- 28) Mcevoy, R. C., Anderson J., Sandler, S., Hellerstrom, C. : Multiple Low-Dose STZ-induced Diabetes in the Mouse. *J. Clin. Invest.* **74**, 715 (1984).
- 29) Bolaffi, J. L., Nowlain, R. E., and Grodisky, G. M. : Progressive damage of cultured pancreatic islets after single early exposure to STZ. *Diabetes*, **35**, 9 (1986).
- 30) Eizirik, D. L., Sandler, S., Welsh, N., and Hellerstorm, C. : Preferential reduction of insulin production in mouse pancreatic islets maintained in culture after STZ exposure. *J. Clin. Endocrin*, **122**, 4 (1988).
- 31) Eizirik, D. L., Strandell, E., and Sandler, S. : Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies B-cell sensitivity to STZ. *Diabetologia*, **31** (1988).
- 32) Eizirik, D. L., Sandler, S., Sener, A., and Malaisse, W. J. : Defective catabolism of D-glucose and L-glutamine in mouse pancreatic islets maintained in culture after STZ exposure. *J. Clin. Endocrin*, **2**, 133 (1988).
- 33) Gunnarsson, R., Berne, C., and Hellerstorm, C. : Cytotoxic effects of STZ and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B-cells with special regard to the role of nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J.* 140 (1974).
- 34) Morgan, N. G., cable, H. C., Newcombe, N. R., and Williams, G. T. : Treatment of cultured pancreatic B-cells with STZ induces cell death by apoptosis. *Bioscience Reports*, **14**, 5 (1994).