

배에서 추출한 Phenolic Compound가 Streptozotocin으로 유발된 고혈당 생쥐에 미치는 영향

김정상[†] · 나창수

동신대학교 한의과대학

Effects of Pear Phenolic Compound on the STZ-treated Mice for Induction of Diabetes

Jeong Sang Kim[†] and Chang Soo Na

College of Oriental medicine, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract

This study has been carried out to investigate the effects of the phenolic compound on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin (STZ). The effects of the phenolic compound were assayed by the changes of the blood glucose, creatinine and blood urea nitrogen (BUN) levels, and insulin-immunohistochemical staining and electron microscopical observation for β -cells of the Langerhans' islet, under the same experimental conditions. For this purpose, male mice were fed with phenolic compound (PA group, 15 mg/kg/day; PB group, 90 mg/kg/day) in their diet while the control group received the same commercial diet, for 6 weeks. The blood glucose contents was examined by tail vein blood once a week for 6 weeks. Samples of the pancreas removed after that period were processed for the immunohistochemical identification of β -cells as well as for measuring ultrastructural changes of β -cells. The levels of serum glucose were decreased significantly ($p < 0.05$) on the PB group compared with the control and PA group. The blood BUN and creatinine levels are slightly decreased in the phenolic compound feeding groups compared with control group. The β -cells on Langerhans' islet were destroyed by administration of STZ, so that a few of insulin-positive cells were observed in the control group. A lot of insulin-positive cells were observed in the PB group compared with the control group. According to the electron microscopical observation, β -cells are recovered from the damage in the PA group. The β -cell contained a lot of electron dense and pale granules compared with control group. These results suggest that administration of the pear phenolic compound to the mice helped recovery from the damage induced by STZ.

Key words: pear phenolic compound, diabetes, insulin-immunostain, Langerhans islet

서 론

제1형 당뇨병은 췌장섬(Langerhans islet)에서 인슐린을 생산하는 β -세포의 자가면역 파괴로, 당뇨병은 β -세포의 대부분이 파괴되었을 때 발병된다(1). 인슐린 대체 치료가 당뇨병환자들에게 시행되지만 환자들 대부분은 망막과 신장의 사구체에서 심각한 2차적인 미세혈관 병리가 발생된다(2). 당뇨병환자에 대한 인슐린의 투여는 주사부위의 지방 침착이나 국소적인 비대증과 같은 부작용(3)이 있기 때문에 코(4), 폐(5), 눈(6)을 통한 인슐린 투여 연구들이 수행되고 있다. 최근 들어 췌장섬의 이식수술이 행하여지고 있지만 자가면역반응에 의한 이식된 조직에 대한 거부반응 때문에 매우 한정적으로 행하여지고 있다(7).

인슐린을 구강투여하면 간을 경유하기 때문에 간에서 포도당의 생산을 억제하여 인슐린과 같은 유사한 효과를 나타낸다(8). 그러나 인슐린과 같이 peptides 또는 단백질의 구강투여는

효소들에 의해서 흡수되기 이전에 분해되기 때문에 안전성 문제 문제가 따른다(9).

제1형 당뇨병을 치료하기 위해서는 췌장섬 세포 전구체로부터 β -세포의 재생과 재발하는 자가면역성 방지가 요구되지만 성인의 췌장섬 세포들은 세포분열능력을 갖는 소수의 췌장섬 세포들에 의해서 서서히 그리고 지속적으로 대체된다(10). 또한 성인의 췌장에서는 관줄기세포(ductal stem cells)가 내분비 세포로 분화되어 하나의 췌장섬을 형성한다(11,12). *in vitro*에서 성장인자들은 췌장섬 안에서 세포의 복제(13)나 관상피세포(ductal epithelial cell)의 유사분열의 촉진을 유도한다(14-16). Insulin-like growth factor I(IGF-I)은 인슐린과 유사한 대사효과를 갖고 있으면서 세포의 증식과 분화를 자극한다(17). IGF-I은 주로 간에서 합성되어 순환되지만 autocrine과 paracrine 방식으로 작용하는 췌장과 같은 대부분의 조직에서도 국소적으로 생산된다(18). 특히 IGF-I은 췌장 절제 수술을 한 흰쥐와 개의 췌장 재생부위에서 국소적으로 증가하였는데

[†]Corresponding author. E-mail: jskim@red.dongshinu.ac.kr
Phone: 82-61-330-3512, Fax: 82-61-330-2900

이와 같은 결과는 IGF-I이 췌장조직의 성장과 재생에 관여한 결과라고 하였다(19,20).

민간요법으로 당뇨병 환자의 치료에 사용되어 온 배(*Pyus bretschnideri* Rehd.)는 맛이 달고 성질은 조금 차갑다. 열을 내리고 화를 내리는 효능이 있어서 열병을 치료할 수 있다고 보았다. 한의학에서는 인체를 경락체계로 보는데, 배는 경락 중 폐·위경으로 들어가서 진액을 만들어 주고, 갈증을 해소하며, 열을 맑혀주며, 담을 묽혀주는 효과가 있기 때문에 열병으로 진액이 손상된 소갈병 즉 당뇨병의 치료에 사용되어 왔다.

본 연구자들은 streptozotocin(STZ)을 저용량 중독 투여하여 췌장섬을 파괴한 고혈당 생쥐 실험모델을 만든 후, 배에서 추출한 phenolic compound를 투여하여 고혈당 생쥐의 췌장섬 세포의 재생과 제1형 당뇨병에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

당뇨유발

실험에 사용한 모든 생쥐는 정상적인 사육환경에서 2주 이상 적응시킨 후 2시간 동안 절식시킨 다음 각각의 생쥐에 STZ 50 mg/kg을 24시간 간격으로 2회 투여하여 1차 유발한 다음 3일 후에 STZ 100 mg/kg을 복강 투여하여 고혈당 생쥐 모델을 구축하였다.

Phenolic compound의 추출

Phenolic compound의 총 페놀성 물질의 함량은 AOAC 방법(21)에 의하여 측정하였다. 배 신선시료와 건조(동결건조)된 과육과 과피를 각각 일정량 취하여 잘게 자른 후 70% methanol로 60°C water bath에서 2시간 추출하였다.

실험군 설정 및 약물 투여

대조군은 췌장 손상을 유발한 다음 약물을 처치하지 않고 자연 치유과정을 거치게 하였다. 실험군은 phenolic compound (PA군, 15 mg/kg/day; PB군, 90 mg/kg/day)를 6주간 사료에 혼합하여 식이하도록 하였다.

혈당측정

매주 1회씩 6회 실시하였으며, 측정 12시간 전에 금식을 시킨 다음 꼬리정맥혈을 취하여 Glucometer 4(Bayer Co.)로 측정하였다.

BUN 측정

혈청을 분리한 다음 Photometer 5010(Robert Riele GmbH & Co KG, Germany)를 이용 546 nm 파장에서 측정하였다.

Creatinine 측정

혈청을 분리한 다음 Photometer 5010(Robert Riele GmbH & Co KG, Germany)를 이용 505 nm 파장에서 측정하였다.

면역조직화학적 검사

생쥐의 췌장조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde를 사

용하여 24시간 동안 고정시킨 다음, 췌장조직을 paraffin으로 포매한 후 microtome을 사용하여 조직을 5 µm 두께로 절편하였다. 절편한 조직을 slide glass 위에 부착시킨 다음 이를 xylene에서 100%, 90%, 80% ethanol과 같이 농도가 낮아지는 순으로 5분씩 담구어 paraffin을 제거하였다. 다음날 pH 7.2, 0.1 M의 phosphate buffer saline(0.9% NaCl) 용액에 하루밤 동안 배양시킨 다음 15분간 PBS로 세척한 뒤 10% horse serum을 함유한 blocking solution을 사용하여 20분 동안 배양시키고 다시 PBS용액으로 15분간 세척하였다. 세척한 각각의 조직위에 인슐린 항체를 처리하고 습도가 높은 상온의 배양접시에서 2시간 동안 배양시킨 뒤 15분간 PBS용액으로 세척하고 biotinylated anti-mouse IgG를 처리하여 30분간 배양시킨 후 15분간 PBS용액으로 세척하였다. 이를 다시 avidin-biotinylated enzyme complex(ABC) reagent(Vector Lab, CA, USA)를 조직에 처리 30분간 반응시키고 다시 PBS용액에서 15분간 세척하였다.

DAB 발색시약을 조직에 떨어뜨려 2분간 발색시키고 난 후 흐르는 물에 과량의 염색시약을 제거하였다. 물기를 제거한 후 여과시킨 hematoxylin에 20초간 대조염색을 한 다음 통상적인 방법에 따라 표본을 제작하여 광학현미경으로 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

전자현미경관찰

췌장조직의 일부를 절취하여 전고정액 속에서 1 mm³ 크기로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde(phosphate buffer, pH 7.4)로 2시간 동안 전고정하였다. 전고정이 끝난 조직은 동일 완충액을 사용 10분 간격으로 3회 세척한 후 1% osmium tetroxide (OsO₄)로 2시간 후고정한 다음 동일 완충액으로 3회 세척하였다. 세척후 시료들은 상승농도 순의 에탄올로 탈수하여 propylene oxide로 치환한 후 Epon-Araldite 혼합액으로 포매하였고 60°C 오븐에서 30시간 중합시켰다. 포매된 조직들을 LKB-V형 ultramicrotome을 사용 1 µm 두께로 절편을 제작하여 1% toluidine blue로 hot plate(60°C)상에서 염색하였다. 염색된 시료를 광학현미경으로 관찰하여 조직을 확인한 다음 동일한 부위에서 60 nm 두께로 초박절편을 제작하여 silver grid에 부착하였고, uranyl acetate 와 lead citrate로 이중 염색한 다음 JEM 100 CX-II 투과형 전자현미경(80 KV)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

혈당량의 변화

대부분의 당뇨병은 자가면역 질환으로 β-세포들이 심하게 손상된 후에 나타나게 된다(2). 본 실험에서 6주 동안 매주 1회 채혈하여 혈당을 측정된 결과, STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 대조군의 혈당은 3주(190 ± 30.6 mg/dL)부터 급격히 증가하여 4주(203 ± 34.5 mg/dL) 이후 높은 혈당수준이 유지되었다(Table 1). 이와 같은 결과는 Murali와 Goyal의 결과(22)와

Table 1. The changes of blood glucose (mg/dL) levels according to the feeding of pear phenolic compound to the mice for 6 weeks following treatment with STZ

Groups	Weeks 1		2		3		4		5		6	
	Mean±SD	Prob> T	Mean±SD	Prob> T	Mean±SD	Prob> T	Mean±SD	Prob> T	Mean±SD	Prob> T	Mean±SD	Prob> T
Con	123±9.5		183±13.4		190±30.6		203±34.5		205±15.1		210±18.5	
PA	122±5.8	0.00	119±12.0	0.00	127±14.0	0.19	130±28.1	0.81	133±18.3	0.00	164±15.3	0.06
PB	122±10.3	0.00	129±10.7	0.00	123±24.5	0.26	100±25.6	0.35	97±20.4	0.00	95±14.6	0.00

Control, group of treated with STZ; PA, group of phenolic compound (15 mg/kg/day) feeding to mice following treatment with STZ; PB, group of phenolic compound (90 mg/kg/day) feeding to mice following treatment with STZ; Mean±SD, standard deviation; Prob>|T|, Values in the T-test.

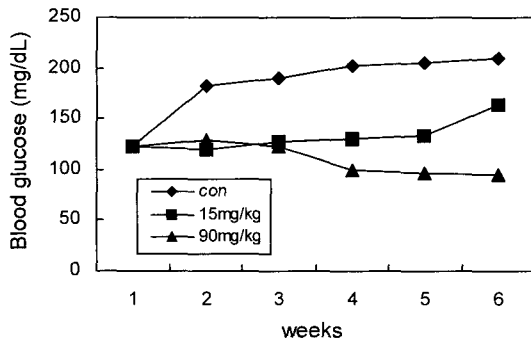


Fig. 1. The changes of blood glucose levels according to the feeding of pear phenolic compound for 6 weeks following treatment with STZ.

일치하였다.

STZ를 투여하여 고혈당을 유발시킨 생쥐에 사료와 phenolic compound를 혼합하여 6주 동안 식이하도록 한 결과 PA군(15 mg/kg/day)의 혈당량은 대조군에 비하여 유의성(p<0.05)있게 감소하였으나 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. PB군(90 mg/kg/day)의 혈당량은 전반적으로 대조군에 비하여 낮았으며, 특히 4주(100±25.6 mg/dL)부터 대조군이나 PA군에 비하여 현저히 감소하기 시작하여, 그 이후 유의성(p<0.05)있게 낮은 혈당량이 6주(95±14.6 mg/dL)까지 유지되었다(Table 1, Fig. 1). 이와 같은 결과는 배의 phenolic compound가 췌장섬에 작용하여 인슐린 분비에 관여하였음을 암시한 것으로 사료된다.

혈중 BUN과 creatinine의 변화

BUN의 변화는 실험개시 6주 후에 생쥐의 심장으로부터 채혈하여 측정한 결과 대조군(34.18±5.83 mg/dL)에 비하여 PA군(29.48±8.00 mg/dL)과 PB군(32.59±6.92 mg/dL)에서 다소 낮게 관찰되었으나 유의성은 없었다(Table 2).

혈중 creatinine의 농도 변화 또한 6주 후에 생쥐의 심장으로부터 채혈하여 측정한 결과 대조군(0.54±0.06 mg/dL)에 비하여 PA군(0.51±0.06 mg/dL)과 PB군(0.50±0.05 mg/dL)에서 다소 낮게 관찰되었다(Table 3).

STZ 투여로 유발된 당뇨병 흰쥐는 신장 질환이 동반되어 blood urea nitrogen(BUN)과 blood creatinine은 증가한다(22). 본 연구에서 phenolic compound 투여한 6주 후에 채혈하여 BUN과 creatinine의 농도를 측정한 결과 대조군에 비하여 PA군과 PB군에서 약간 감소한 것으로 보아 신장의 기능에 효과

Table 2. Effect of the pear phenolic compound on the BUN levels in STZ-induced hyperglycemic mice

Groups	Blood urea nitrogen (mg/dL)	
	Mean±SD	Prob> T
Control	34.18±5.83	
PA	29.48±8.00	0.26
PB	32.59±6.92	0.68

See the legend of Table 1.

Table 3. Effect of the pear phenolic compound on the creatinine levels in STZ-induced hyperglycemic mice

Groups	Creatinine (mg/dL)	
	Mean±SD	Prob> T
Con	0.54±0.06	
PA	0.51±0.06	0.39
PB	0.50±0.05	0.24

See the legend of Table 1.

가 있을 것으로 사료되었다.

Insulin-면역조직화학적 및 전자현미경관찰

β-세포의 파괴와 인슐린 분비상태를 구명하기 위하여 6주 후 대조군 췌장 조직을 절취하여 insulin-면역조직화학적 검색하였다. 대조군에서는 전반적으로 췌장섬(Langerhans islets)이 거의 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 극소수 관찰되는 췌장섬에서는 insulin-positive β-세포들이 소수 존재하였으며, 면역반응성 또한 매우 미약하였다(Fig. 2a). 전자현미경 관찰 결과에서도 췌장섬의 β-세포들은 인슐린 함유파립들이 매우 드물게 관찰되었을 뿐만 아니라 세포소기관의 발달이 미약하였다(Fig. 2b). 이와 같은 결과는 STZ로 고혈당이 유발된 당뇨 생쥐는 β-세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 극히 저조하여 그 결과 혈당량의 증가한 것으로 보인다.

PB군의 β-세포들에서는 인슐린 함유파립들이 대조군에 비하여 다수 관찰되었을 뿐만 아니라 전자밀도가 높은 것과 낮은 파립들이 다수 관찰되었다. 파립형질세망과 골지체의 발달이 대조군에 비하여 현저히 발달해 있었다(Fig. 3b). 이와 같은 결과는 인슐린의 합성과 분비가 활발한 β-세포들은 전자밀도가 높은 인슐린 함유파립들과 인슐린이 분비되고 있는 것으로 사료되는 밝은 파립들이 다수 존재한다는 Gisela 등(23)의 견해와 일치하였다.

정상 생쥐의 췌장에서는 소량의 IGF-I mRNA를 발현되는

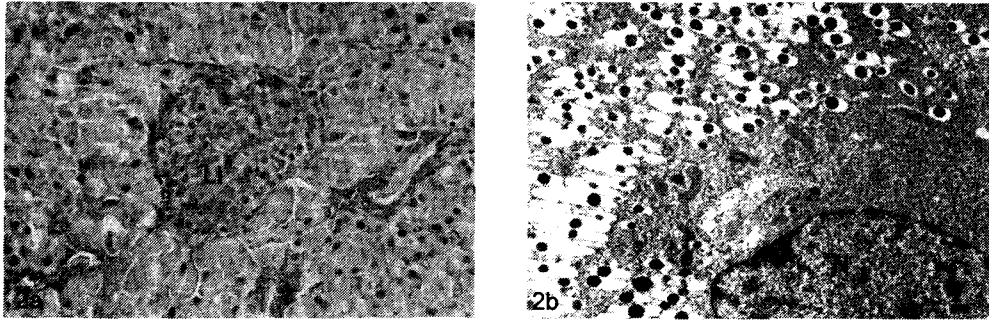


Fig. 2a. Light micrograph of pancreas from the 6 weeks mouse administered streptozotocin (STZ). A few of insulin-immunoreactive β -cells were observed in the islet of Langerhans (LI). Insulin-immuonstain, $\times 100$.
Fig. 2b. Electron micrograph of pancreatic β -cell from the 6 weeks mouse following administered STZ. In the control group the less dense impression of the granules in comparison with the density of the granules in experimental group were found. N, nucleus. $\times 20,000$.

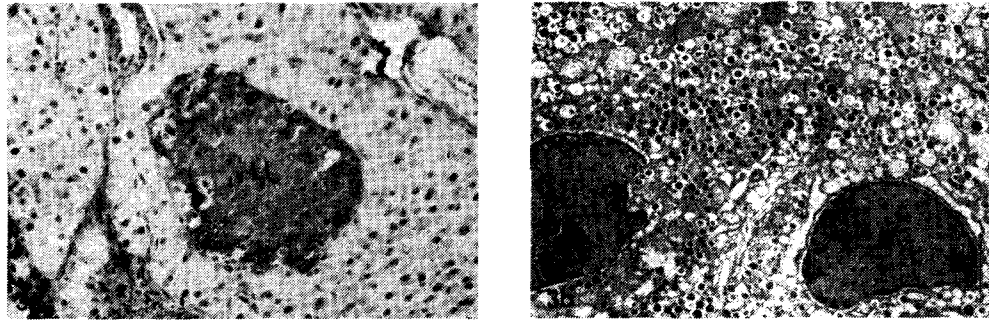


Fig. 3a. Light micrograph of pancreas from the mouse feeding phenolic compound (90 mg/kg/day) during 6 weeks following treatment with STZ. A Langerhans islet (LI) with stronger staining for insulin than control group were observed. Insulin-immuonstain, $\times 100$.
Fig. 3b. Electron micrograph of pancreatic β -cell from the mouse administered phenolic compound for 6 weeks following treatment with STZ. The β -cell contained a lot of electron dense and pale granules compared with control group. N, nucleus. $\times 12,000$.

데(24), STZ 투여로 β -세포를 파괴시킨 *in vitro* 실험에서 IGF-I을 처리하면 β -세포의 복제가 증가된다(25). 자가면역 질환인 당뇨병은 β -세포들이 심하게 손상되거나 파괴되면, 췌장섬에서는 β -세포의 복제와 신생을 유도하는 주요 인자가 발견되어 면역반응에 대응하며, β -세포에서 IGF-I이 발견되어 β -세포 집단을 복원하고 정상적인 혈당을 유지한다(26). 포도당 또한 β -세포의 증식을 자극하는 주요 자극제라고 하였다(27,28). 10% sucrose를 물에 혼합하여 공급한 hamster의 β -세포는 전자밀도가 높은 분비과립들의 수는 감소한 반면, 인슐린을 분비하여 전자밀도가 낮아진 과립들의 수는 증가하였다. 또한 혈청내 인슐린의 농도도 수돗물을 공급한 대조군에 비하여 높아졌다(28). 정상적인 환경에 sucrose 식이를 한 결과 췌장섬의 숫자가 약 6.8배 증가하였다고 하였다(29).

본 연구의 PB군에서는 4주부터 혈당량이 감소하기 시작하였으며, 그 이후 대조군에 비하여 낮은 혈당량이 6주까지 유지되었다(Table 1, Fig. 1). 또한 인슐린 면역조직화학적 검색결과, STZ를 투여하고 보통 식이를 한 대조군에서는 거의 관찰되지 않았던 췌장섬들이 다수 관찰되었을 뿐만 아니라 모든 췌장섬들은 인슐린에 대하여 강한 면역반응성을 보여주어(Fig.

3a) β -세포의 인슐린 합성과 분비가 대조군에 비하여 현저함을 알 수 있었다. 전자현미경을 통한 β -세포의 미세구조 관찰 결과 인슐린 함유과립들이 대조군에 비하여 다수 관찰되었을 뿐만 아니라 전자밀도가 높았으며, 과립형질세망과 골지체들이 대조군에 비하여 현저히 발달해 있었다(Fig. 3b). 이와 같은 결과로 보아 본 연구에서 투여한 배 추출 phenolic compound가 β -세포의 복제 또는 신생에 관여하였을 것으로 보인다. 앞으로 phenolic compound의 분석을 통하여 phenolic compound가 IGF-I와 유사한 효능 갖고 있는 물질이나, IGF-I의 효능을 활성화시키는 물질을 포함하고 있는지가 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

요 약

배에서 추출한 phenolic compound가 streptozotocin(STZ)을 투여하여 고혈당을 유발시킨 생쥐에 미치는 영향을 밝히고자, 생쥐의 혈당, 혈중 creatinine, BUN의 변화 및 insulin-면역조직화학적 검색과 췌장섬 β -세포의 전자현미경관찰을 통한 미세구조 변화를 관찰하였다. 실험군은 정상적인 동물 사료를

식이토록 한 대조군, 사료에 phenolic compound(PA군, 15 mg/kg/day; PB군, 90 mg/kg/day)를 혼합하여 6주 동안 섭식하게 한 실험군으로 구분하였다. 대조군의 혈당 농도는 4주부터 높게 나타났으며, PA군의 혈당은 대조군에 비하여 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였으며, 특히 PB군에서는 4주부터 감소하기 시작하여 6주까지 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다. BUN과 creatinine의 농도는 대조군에 비하여 실험군에서 다소 감소하였으나 유의성은 없었다. STZ를 투여한 대조군의 췌장섬은 대부분 파괴되어 insulin-면역조직화학적 반응을 보인 세포들이 거의 관찰되지 않았으나, PB군에서는 다수의 췌장섬이 관찰될 뿐만 아니라 인슐린-면역조직화학적 반응이 양성으로 관찰되었다. 전자현미경 관찰 결과 대조군의 β -세포에서는 인슐린 함유 과립들이 소수 관찰되었으나 PB군에서는 이들 과립들이 다수 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 phenolic compound를 섭식한 실험군 생쥐는 STZ에 의해서 손상된 췌장섬이 회복 또는 재생되어 β -세포의 인슐린 분비가 복원되어 가고 있다고 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 정책연구과제(전남-0102)의 지원에 의해서 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Tisch R, McDevitt H. 1966. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-297.
2. Pickup JC, Williams G. 1994. Chronic complications of diabetes. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom. p 313.
3. Skyler JS. 1986. Lessons from studies of insulin pharmacokinetics. *Diabetes Care* 9: 666-668.
4. Chien YW, Banga AK. 1989. Potential developments in systemic delivery of insulin. *Drug Dev Ind Pharm* 15: 1601-1607.
5. Adjei A, Gupta P. 1994. Pulmonary delivery of therapeutic peptides and proteins. *J Control Release* 29: 361-369.
6. Morgan RV, Huntzicker MA. 1996. Delivery of systemic regular insulin via ocular route in dogs. *J Ocul Pharmacol Ther* 12: 515.
7. Weir GC, Bonner-Weir S. 1997. Scientific and political impediment to successful islet transplantation. *Diabetes* 46: 1247-1256.
8. Lewis GF, Zinman B, Groenewoud Y, Vranic M, Giacca A. 1996. Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic effects of insulin in humans. *Diabetes* 45: 455-462.
9. Roberts RL, Sandra A. 1992. Receptor-mediated endocytosis of insulin by culture endothelial cells. *Tissue Cell* 24: 603-611.
10. Swenne I. 1983. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic β -cell of the rat. *Diabetes* 32: 14-19.
11. Booner-Weir S. 2000. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302.
12. Ramiya VK. 2000. Reversal of insulin-dependent diabetes

- using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med* 6: 278-282.
13. Hellerstrom C, Swenne I. 1991. Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic β -cells. *Diabetes* 40 (Suppl.2): 89-93.
14. Rooman I, Schuit F, Biuwens L. 1997. Effects of vascular endothelial growth factor on growth and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 76: 225-232.
15. Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. 1997. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamster. *J Clin Invest* 99: 2100-2109.
16. Lefebvre VH, Otonkoski T, Ustinov J, Huotari MA, Pipeleers DG, Bouwens L. 1998. Culture of adult human islet preparations with hepatocyte growth factor and 804G matrix is mitogenic for duct cells but not for β -cells. *Diabetes* 47: 134-137.
17. Le Roith D. 1997. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 336: 633-640.
18. Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9343-9347.
19. Smith FE, Rosen KM, Villa-Krmaroff L, Weir GC, Bonner-Weir S. 1991. Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6152-6156.
20. Hayakawa H, Kawarada Y, Mizumoto R, Hibasami H, Tanaka M, Nakashima K. 1996. Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J Endocrinol* 149: 259-267.
21. AOAC. 1980. *Official Methods of Analysis*. 13th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
22. Murali B, Goyal RK. 2001. Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Hypertens* 23: 513-520.
23. Gisela C, Hector DZ, Cesar LA, Gomez D, Juan JG. 2000. Quantitative ultrastructural changes induced by sucrose administration in the pancreatic B cells of normal hamster. *Biocell* 24: 31-37.
24. Calbo EL, Bernatchez G, Pelletier G, Iovanna JL, Morisset J. 1997. Down regulation of IGF-I mRNA expression during postnatal pancreatic development and overexpression after subtotal pancreatectomy and acute pancreatitis in the rat pancreas. *J Mol Endocrinol* 18: 233-242.
25. Hugl SR, White MF, Rhodes CJ. 1998. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic β -cell growth is glucose-dependent: synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathway by glucose and IGF-I in Ins-1 cells. *J Biol Chem* 269: 28783-28789.
26. George M, Eduard A, Alba C, Cristina C, Jean CD, Bosh F. 2002. β -cell expression of IGF- I leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest* 109: 1153-1163.
27. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. 1989. Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38: 49-53.
28. Bonner-Weir S, Smith FE. 1994. Islet growth and the growth factors involved. *Trends in Endocrinology and metabolism* 5: 5137-5140.
29. Del Zotto H, Gomez Dumm CL, Drago S, Fortion A, Luna GC, Gagliardino JJ. 2002. Mechanism involved in the beta-cell mass increase induced by chronic sucrose feeding to normal rats. *J Endocrinol* 174: 225-231.