

췌장 베타세포에서 인터루킨-1 β 로 유도한 인슐린 의존형 당뇨병 실험 모델

이인순 · 이인자** · 김경태

포항공과대학교 생명과학과, 효성기톨릭대학교 약학대학*

(Received March 30, 1998)

Prediabetic *In vitro* Model in Pancreatic Beta Cells Induced by Interleukin-1 β

Ihn-Soon Lee, In-ja Rhee** and Kyong-Tai Kim

Department of Life Science, 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 Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) in cellular level we have designed experimental prediabetic model in pancreatic beta cells. RINm5F, HIT-T15 and isolated rat islets were chosen as pancreatic beta cells. Since interleukin-1 β -induced beta cell cytotoxicity has been implicated in the autoimmune cytotoxicity of IDDM, we used interleukin-1 β as diabetogenic agent. For establishment of prediabetic *in vitro* model, the degree of beta cell deterioration was determined by cell proliferation, insulin release and morphological appearance. Cell proliferation, insulin release and morphology were changed dosedependently in condition that interleukin-1 β was exposed to pancreatic beta cells. The concentration and exposure time of interleukin-1 β to set up prediabetic model in beta cell lines and isolated rat islets were 100~1000 U/ml, 48 hr. and 25~100 U/ml, 48 hr., respectively.

Keywords □ IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus), interleukin-1 β , RINm5F, HIT-T15, rat islets, insulin, cell proliferation, prediabetic model.

Interleukin-1은 활성화된 대식세포(macrophage), 각질세포(keratinocytes), 각막상피세포(corneal epithelial cells), 성상세포(astrocytes), 그리고 신사구체간질세포(renal mesangial cells)등에서 분비되는 polypeptide로서 많은 target cell에 대하여 다양한 생물학적인 효과를 발휘하며, 염증반응과 면역반응에서도 중요하게 작용한다.¹⁾

면역기전에 관하여는 interleukin-1 β 가 인슐린의존형(제 1형)당뇨병의 병인론에서 베타세포 파괴가 진행될 때 베타세포에 대하여 병리적인 작용을 나타내며, 또 베타세포의 생리적인 기능에 중요한 조절제(modu-

tor)로 작용하여²⁾ interleukin-1이 포도당(glucose) 또는 다른 분비 자극제(secretagogues)에 의한 인슐린 분비를 interleukin-1의 농도와 처리 시간에 따라 증진시키거나 또는 억제시킨다.³⁾ Interleukin-1의 베타세포 독성(cytotoxicity)에 대한 연구를 살펴보면, interleukin-1은 단독으로는 베타세포 파괴를 일으키는 직접적인 원인을 제공하지 못하고, Interleukin-2, tumor necrosis factor, interferon- γ 그리고 lymphotoxin등과 같은 다른 종류의 cytokine들이 함께 존재할 때 그 작용이 나타난다고 보고되어 있다.⁴⁾ 이와같이 베타세포에 대한 interleukin-1의 작용들은 서로 일치하지 않으며, interleukin-1단독으로 유도되는 베타세포 독성에 의한 당뇨병 실험모델에 대한 연구는 아직 부족하다. 자가 면역반응이 증재되는 인슐린 의존형 당뇨병은 아직 명확하게

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

밝혀지지는 않았으나 interleukin-1이 중요하게 관여하며, 또 인슐린 의존형 당뇨병이 발병하기까지 오랜 기간 베타세포 파괴 과정이 일어나므로 이 기간을 설명할 수 있는 세포수준의 실험모델이 수립되면 제 1형 당뇨병의 예방과 치료에 도움이 될 것이다. 따라서 이번 연구에서는 인슐린의존형 당뇨병의 병인론에 관련이 있는 것으로 알려진 interleukin-1 β 를 이용하여 인슐린 의존형 당뇨병의 병리과정의 설명이 가능한 실험 모델을 만들기 위하여, 생체 정상 생리 조건의 포도당 농도에서 interleukin-1 β 가 베타세포의 인슐린 분비기능과 베타세포의 파괴 정도, 베타세포의 morphology에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. 제 1형 전 당뇨(prediabetic)모델의 판정 기준은 90% 이상의 베타세포가 파괴되었을 때 제 1형 당뇨병의 임상증상이 나타나는 것을 고려하여⁵⁾ 10~90%의 세포활성 또는 세포기능 억제제가 나타나는 범위를 기준으로 정하였다.

재료 및 방법

시약

실험에 사용한 시약은 RPMI 1640 medium(Sigma, USA), Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL, USA), Interleukin-1 β (Boehringer Mannheim, Germany), [methyl-³H] 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.

세포 배양

세포주는 ATCC(American Tissue Culture Collection)에서 구입한 RINm5F cell과 HIT-T15 cell을 실험에 사용하였다. 흰쥐와 햄스터에서 유래한 췌장 베타세포주 RINm5F⁶⁾와 HIT-T15cell⁷⁾은 각각 10% FBS, penicillin-streptomycin(100u~100 μ g/ml), 5.5 mM glucose가 함유된 RPMI 1640배지(complete medium, CM)에서 3~4일 간격으로 계대 배양하면서 유지시켰다. 실험을 위해서는 매 실험 1~2일전 배양된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척

하고 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 세포를 분리시켜 5 \times 10⁴ cell/ml 농도가 되도록 조정하여 각각의 세포를 complete medium에서 안정화시켜서 실험을 시작하는 날 5.5 mM glucose가 함유된 Krebs-Ringer buffer에 각 농도의 Interleukin-1 β 를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양한 후 morphology의 변화를 관찰하고 세포증식 정도를 thymidine uptake법으로 측정하였다.

췌장 소도세포 분리 (Isolation of Islets)⁸⁾

체중 150~200 g의 Sprague-Dawley 흰쥐를 실험 동물로 사용하여 실험 전날 밤부터 금식시킨 후, 체중 Kg 당 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 25개이지 바늘을 삽입하고 4 $^{\circ}$ C로 냉각시킨 collagenase(1 mg/ml in HBSS, Type IV) 용액을 주입하여 췌장을 팽창시켰다. 팽창시킨 췌장을 떼어내어 37 $^{\circ}$ C 항온조에서 20분간 방치한 후, 미리 냉각시킨 HBSS 용액 20 ml를 넣고 굵은 피펫으로 수차례 기계적인 조작을 가한 다음 얼음 수조에서 용액을 상하 혼합하였다. 이 혼합액을 약 3분간 방치한 후 상층액을 다른 tube에 옮기고, 가라 앉은 pellet에 냉각된 HBSS 용액 20 ml를 다시 넣어 같은 조작을 2회 시행하고 상층액을 한 tube에 모았다. 이 상층액의 윗층을 제거하고 200 \times g에서 5분간 원심분리하여 췌장조직들을 회수한 다음 2회 세척하였다. 이렇게 침전된 췌장조직에 27%, 23%, 20%, 11%의 Ficoll 용액을 넣어 불연속 구배를 만들고 실온에서 800xg으로 제동없이 15분간 원심분리하여, Ficoll용액 20%와 11%의 농도 사이에 선택적으로 모인 췌도세포를 수거하여 complete medium으로 2회 세척하였다. 이렇게 분리한 췌장 소도세포는 complete medium 10 ml에 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 하룻밤 배양하였다. 실험 당일에 5.5 mM glucose가 함유된 Krebs-Ringer buffer에 각 농도의 Interleukin-1 β 를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양한 후 morphology의 변화를 관찰하고 방사면역법으로 인슐린 분비정도를 측정하였다.

세포증식(Cell Proliferation)

베타세포의 세포증식 정도는 thymidine uptake법으로

로 관찰하였다.⁹⁾ 세포 배양을 마치기 24시간 전 medium에 2 μ ci의 methyl-³H-thymidine을 넣고 배양한 후, 배양액의 상층액을 버리고 PBS로 3회 세척한 다음, 0.5 N-NaOH 500 μ l/well을 넣어 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 골고루 섞은 다음, 용해액 200 μ l를 취하여 Scintillation cocktail (Aqualuma Plus) 10 ml을 넣고 β -counter(Beckman, USA)로 ³H의 편입(incorporation)정도를 측정하였다.

인슐린 분비(Insulin Release)

인슐린분비 정도는 방사면역법(RIA: radioimmunoassay)으로 측정하였다.¹⁰⁾ 48시간 배양한 베타세포의 상층액을 PBS로 적절하게 희석하여 희석한 상층액을 분석시료로 200 μ l/tube씩 취하였다. Standard로는 쥐 인슐린을 사용하였으며, 각 농도별 standard solution을 200 μ l/tube씩 취하여 standard curve 작성에 사용하였다. Antibody로는 guinea pig antiporcine insulin antiserum을 사용하여 시료 및 표준 인슐린 용액에 각각 200 μ l씩 넣었다. 여기에 ¹²⁵I-insulin 용액을 각 tube에 200 μ l씩 넣었으며 총 ¹²⁵I-insulin 양을 알기 위해서 한개의 tube에는 ¹²⁵I-insulin 만 200 μ l 넣었다. 각 tube를 잘 흔들어서 마개를 하고 실온에서 하룻밤 방치한 후 총 ¹²⁵I-insulin 측정용 tube를 제외한 나머지 tube의 상층액을 버리고 반응하지 않은 ¹²⁵I-insulin을 깨끗이 제거한 다음 ¹²⁵I-insulin-antibody 중의 radioactivity를 γ -counter로 측정하였다.

통계처리

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

결 과

HIT-T15 cell을 여러 농도(50 u/ml, 100 u/ml, 1000 u/ml)의 interleukin-1 β 로 처리했을 때의 morphology 변화와 세포활성 정도를 관찰하였다. 50 u/ml의 interleukin-1 β 에서는 거의 morphology변화가 관찰되지 않았으며 100~1000 u/ml의 interleukin-1 β 에서는 세포수가 현저하게 감소하는 현상을 보여주고 있으나(Fig. 1), 이미 보고한 Streptozotocin유도 모델의 경우¹¹⁾에 비해 훨씬 경미한 변화가 관찰되었다.

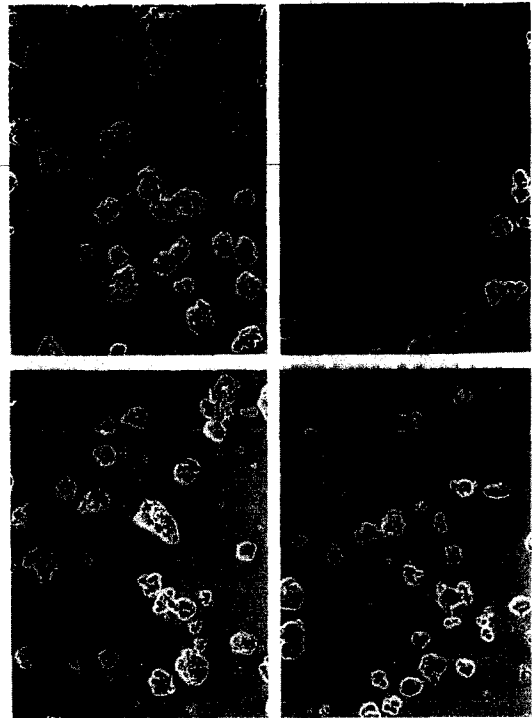


Fig. 1 — Morphological appearance of the IL-1 β -exposed HIT-T15 cells by inverted microscope (magnification $\times 40$). A: control group, B: 50 u/ml IL-1 β treated, C: 100 u/ml IL-1 β treated, D: 1000 u/ml IL-1 β treated.

Table I는 HIT-T15 cell에서 interleukin-1 β 에 의해 유도된 세포증식 억제 정도를 보여주는 결과인데, 대조군에 비해 각각 36%, 54%의 세포활성 억제를 나타내었다. 제 1형 당뇨병의 병인론에 의하면 췌장베타세포가 자가면역기전에 의하여 베타세포 파괴가 일어나기 시작하여 비교적 오랜기간 진행한 후 거의 모든 세포가

Table I — IL-1 β -induced prediabetic model by ³H-thymidine uptake in HIT-T15 cell

IL-1 β (u/ml)	³ H-thymidine uptake		Significance
	MEAN \pm S.D.		
	cpm	% of control	
0	3574 \pm 79.3	100	control
50	3468 \pm 156.9	97	n.s.
100	2316 \pm 90.2	64	**
1000	1588 \pm 90.4	44	**

Significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) between control and IL-1 β treated group.

n.s.: no significant differences

IL-1: interleukin-1

The experiments were performed 3 times independently

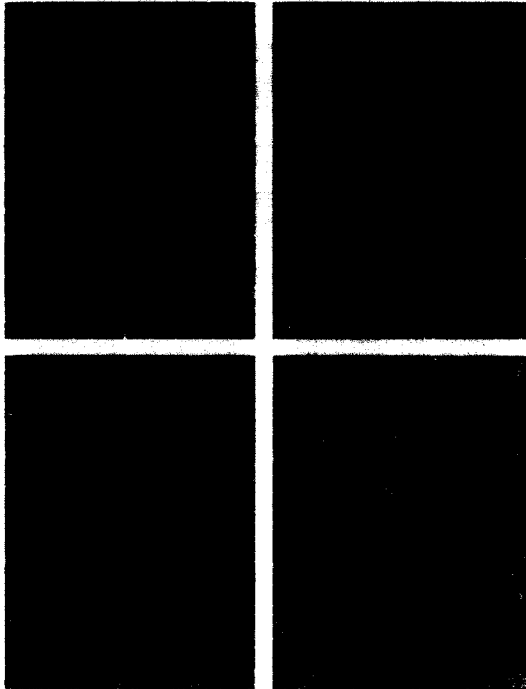


Fig. 2 — Morphological appearance of the IL-1 β -exposed RINm5F cells by inverted microscope (magnification $\times 40$). A: control group, B: 50 u/ml IL-1 β treated, C: 100 u/ml IL-1 β treated, D: 1000 u/ml IL-1 β treated.

파괴되었을 때 비로소 임상증상이 나타나므로, 제 1형 전 당뇨 실험모델의 설정 기준은 10~90%의 베타세포 파괴가 일어나는 조건으로 하였으며, 이를 측정하기 위하여 thymidine uptake 또는 방사면역측정법을 이용하여 이 범위내의 세포활성 또는 기능 억제가 나타나는 조건으로 판정기준을 정하였다.⁵⁾ 따라서 췌장 베타세포 수 변화와 세포증식 억제를 보인 100 u/ml, 1000 u/ml의 interleukin-1 β 로 48시간 배양한 조건에서 당뇨 전 단계 실험 모델을 수립할 수 있었다.

Fig. 2는 50 u/ml, 100 u/ml, 1000 u/ml의 interleukin-1 β 를 처리하였을 때 RINm5F cell의 morphology 변화를 나타낸 것이다. HIT-T15 cell에서와 마찬가지로 50 u/ml에서는 아무런 변화가 관찰되지 않았지만 100 u/ml, 1000 u/ml에서는 약간의 confluence 저하와 세포수의 감소가 확인되었다. 이 세포에서도 역시 streptozotocin 처리시¹¹⁾ 보다 훨씬 적은 morphology 변화를 보여주고 있는데, 이는 HIT-T15 cell의 경우와 마찬가지로 streptozotocin¹²⁾과 interleukin-1 β ¹³⁾가 세포 손상을 유발하는 반응 양상이 서로 다르기 때문인 것

Table II — IL-1 β -induced prediabetic model by ³H-thymidine uptake in RINm5F cell

IL-1 β (u/ml)	³ H-thymidine uptake		Significance
	MEAN \pm S.D.		
	cpm	% of control	
0	3338 \pm 87.0	100	control
50	3220 \pm 86.1	96	n.s.
100	2365 \pm 54.3	71	**
1000	1551 \pm 65.1	46	**

Significant differences (* p<0.05, ** p<0.01) between control and IL-1 β treated group.

n.s. : no significant differences.

The experiments were performed 3 times independently

으로 생각되어진다.

Table II의 결과를 보면, RINm5F cell의 morphology 변화가 관찰되지 않은 50 u/ml의 interleukin-1 β 를 처리했을 때에는 대조군과 유사한 정도의 세포증식을 나타내며, 100 u/ml, 1000 u/ml 처리시에는 대조군에 비해 29%, 54% 세포증식 억제를 보여 이 농도에서 제 1형 전 당뇨모델을 수립할 수 있었다.

소도세포에서 IL-1 β 에 의한 전 당뇨병(prediabetic) 실험 모델을 만들기 위하여 흰쥐에서 분리한 소도세포의

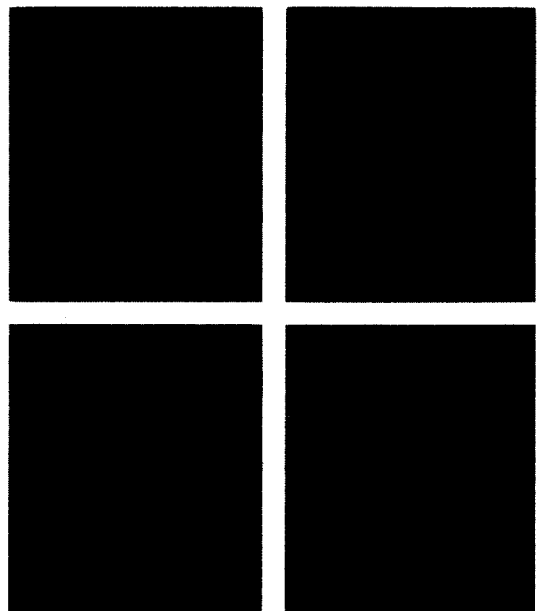


Fig. 3 — Morphological appearance of the IL-1 β -exposed isolated rat islets by inverted microscope (magnification $\times 40$). A: control group, B: 25 u/ml IL-1 β treated, C: 50 u/ml IL-1 β treated, D: 100 u/ml IL-1 β treated.

Table III— IL-1 β -induced prediabetic model in isolated rat islets by RIA

IL-1 β (u/ml)	MEAN \pm S.D.		Significance
	Insulin Release (ng/ml)	% of control	
0	3.4 \pm 2.0	100	control
25	19.4 \pm 3.0	63	**
50	9.0 \pm 1.1	29	**
100	3.30 \pm 0.6	11	**

significant differences (* < 0.05, ** < 0.01) between control and IL-1 β treated group.

IL-1 : interleukin-1 β , RIA : radioimmuno assay
The experiments were performed 3 times independently

morphology와 인슐린 분비능 변화를 관찰하였다. 흰쥐에서 분리한 소도세포의 경우 성숙동물(adult animal)의 베타세포의 증식은 한계가 있어서¹⁴⁾ 세포증식 측정이 불가능하여 소도세포의 기능 손상정도 즉 인슐린 분비정도를 측정하여 전 당뇨병(prediabetic)모델을 만들었다. Fig. 3은 25 u/ml, 50 u/ml 그리고 100 u/ml의 interleukin-1 β 를 첨가하여 배양한 후 촬영한 세포사진이다. 25 u/ml interleukin-1 β 처리시에는 대조군과 같이 소도세포막이 잘 유지되었으나, 50 u/ml, 100 u/ml처리시에는 소도 세포막의 변화가 관찰되었다.

Interleukin-1 β 에 의한 소도세포에서의 인슐린 분비는 Table III에서 보는 것과 같이 interleukin-1 β 25 u/ml, 50 u/ml, 100 u/ml 처리시 대조군에 비하여 각각 37%, 71%, 89% 억제되었다. 이러한 결과는 소도세포 손상에 요구되어지는 interleukin-1 β 의 양이 베타세포주(HIT-T15, RINm5Fcell)에 비해 훨씬 낮음을 알 수 있었으며, interleukin-1 β 25 u/ml, 50 u/ml, 100 u/ml 수준에서 전 당뇨병 실험 모델을 만들 수 있음을 보여주었다.

고 찰

Interleukin-1 β 는 주로 대식세포(macrophage) 또는 여러 형태의 세포에서 생성되며 광범위한 생리활성을 가지고 있다.¹⁵⁾ 특히 인슐린 분비의 생리적 조절제이며 제 1형 당뇨병의 병리인자(pathogenic factor)로 알려져 있다.¹⁶⁾ 즉, interleukin-1 β 는 소도세포에 국소화되어 면역반응을 유발하여 베타세포의 기능이상(dysfunction)과 파괴(destruction)를 일으키는 immunological effector molecule의 역할을 하는 것으로

알려져 있다.²⁾ 베타세포 상해를 일으키는 최근에 제시된 모델에 의하면, 소도에 침윤된 활성화된 대식세포(macrophage)에 의해 생성된 interleukin-1 β 가 베타세포에 존재하는 수용체에 작용하여 nitric oxide synthase의 expression을 유도하여 free radical nitric oxide를 생성하고, 이 nitric oxide가 베타세포의 mitochondria 기능저해와 DNA synthesis억제를 일으켜 결국 베타세포 파괴를 일으킨다고 한다.¹⁷⁾ Interleukin-1 β 수용체를 가진다고 밝혀진 HIT-T15 및 RINm5F세포주¹⁸⁾는 interleukin-1 β 로 유도된 전 당뇨병 모델 실험에 적합한 세포주라고 사료되어 본 실험에 착수하였다. Interleukin-1 β 는 이들 베타세포의 세포활성과 인슐린 분비에 대하여 이중효과(dual effects)를 나타내었는데¹⁹⁾(Table I, II), 50 u/ml 농도를 이중효과의 변곡 역가로 하여 이보다 낮은 농도에서는 베타세포주의 활성을 증진시켰으며(결과 생략), 50 u/ml에서는 대조군과 거의 동일한 활성을 보였고 그 이상의 농도에서는 베타세포의 증식과 인슐린 분비가 억제되어 interleukin-1 β 100 u/ml정도에서부터 prediabetes모델을 유도할 수 있었다.

Interleukin-1 β 에 의한 베타 세포주의 morphology 변화(Fig. 1, 2)를 관찰하였을때, 직접 베타세포 파괴에 관여하는 streptozotocin 보다¹¹⁾ confluence 저하가 낮게 관찰되었는데, 이는 interleukin-1 β 가 먼저 베타세포의 기능저하(dysfunction)를 일으킨 후, 세포막등의 세포형을 파괴(destruction)시킨다는 Corbett등의 보고와 일치한다.¹⁷⁾

소도세포에서의 interleukin-1 β 상해(Table III)는 streptozotocin으로 유도한 당뇨병 실험 모델 수립의 경우에서 처럼 베타세포주들에서 보다 훨씬 낮은 interleukin-1 β 역가(25 u/ml, 50 u/ml, 100 u/ml)에서 인슐린 분비가 억제되었다. 이는 streptozotocin에 의한 전 당뇨병 실험 모델(prediabetic in vitro model)수립에서 처럼 분리된 소도세포의 경우에는 소도세포 분리(isolation) 또는 배양 과정에 의해 베타세포가 어떤 자극에 대한 감수성이 매우 높은 primary culture이기 때문인 것으로 사료된다. 특히, 25 u/ml의 interleukin-1 β 를 처리하였을때 소도 세포막에는 별다른 영향을 나타내지 않았지만 베타세포의 인슐린 분비능은 억제되었는데, 이는 morphology가 그대로 유지한 상태에서도 세포 기능이 손상될 수 있음을 보여준다(Fig. 3).

현재까지 베타세포 손상에 요구되는 cytokine의 중

류는 종(human, rat, mouse 등)에 따라 다른 것으로 알려져 있으나^{4, 20)} 본 실험에 사용한 흰쥐 유래의 RINm5F cell, 랭스터 유래의 HIT-T15 cell, SD계 흰쥐의 isolated islet은 모두 interleukin-1 β 단독에 의해 인슐린 의존형 전 당뇨병 시기의 베타세포와 유사한 세포 손상을 유도할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 학술진흥 재단과 효성 가톨릭대학의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

문헌

- 1) Durum S. K., Schmidt J. A. and Openheim J. J. : Interleukin-1: an immunological perspective. *Annu Rev Immunol*, **3**, 268 (1985).
- 2) Nerup J., Mandrup-Poulsen T. and Mølving J. : The HLA-IDDm association: implication for etiology and pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev*, **3**, 779 (1987).
- 3) Comens P. G., Wolf B. A., Unanue E. R., Lacy P. E. and McDaniel M. L. : Interleukin-1 is potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* **36**, 963 (1987).
- 4) Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A : Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines: synergistic interactions of interferon- γ , tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-1. *Diabetes* **37**, 133 (1988).
- 5) Gepts W. : The pathology of the pancreas in human diabetes *In Immunology in Diabetes*. Andreani D et al (Eds), Kimpton Medical Publication London, 21 (1984).
- 6) Varey A. M., Lyduard P. M., Dean B. M., Van der Meide P. H., Baird and Cooke A. : Interferon- γ 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) 이기업, 임성희, 이문규, 이병두, 이홍규, 고창순, 민현기 : 총담관내 콜라겐 분해효소 주입 법에 의한 백서 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 L., Pohl S. L.(eds): *Methods in Diabetes Research* Vol. 1. A Wiley-Interscience Publication, New York, 310 (1985).
- 10) Johnstone A., Thorpe R. : Immunoassays In Immunochemistry in Practice 2nd., Blackwell Scientific Publications, London, 246 (1987).
- 11) 이인순, 이인자, 김정태 : 췌장 베타세포에서 스트렙토조토신으로 유도한 인슐린 의존형 당뇨병 실험모델. 약학회지 **41**(2), 260 (1997).
- 12) Wogensen L. D., Kolb-Bachofen V., Mandrup-Poulsen T., Christensen P., Martin S. and Nerup J. : Functional and morphological effects of interleukin-1 β on the perfused rat pancreas. *Diabetol*, **33**, 15 (1990).
- 13) Morgan N. G., Cable H. C., Newcombe N. G. and Williams G. T. : Treatment of Cultured Pancreatic B-cells with Streptozotocin Induces Cell Death by Apoptosis. *Biosci. Rep.* **14**(5), 243 (1994).
- 14) Brelje T. C., Darsons J. A., and Sorenson R. L. : Regulation of Iset β -Cell proliferation by Prolactin in Rat Islets. *Diabetes* **43**, 263 (1994).
- 15) Dinarello C. A. : Biology of Interleukin-1. *FASEB J.* **2**, 108 (1988).
- 16) Bendtzen K., Mandrup-Poulsen T. : Cytotoxicity of human pI7 interleukin-1 for pancreatic islets of langerhans. *Science* **232**, 1545 (1986).
- 17) Corbett J. A. and Mcdaniel M. L. : Does Nitric Oxide mediate autoimmune destruction of β -Cells? *Diabetes* **41**, 897 (1992).
- 18) Eizirik D. I., Tracey D. E., Bendtzen K., Sandler S. : An interleukin-1 receptor antagonist protein protects insulin-producing β -cells against suppressive effects of interleukin-1 β . *Diabetol*, **34**, 445 (1991).
- 19) Zawulich W. S. and Zawulich K. C. : Interleukin-1 is a potent stimulator of islet insulin secretion and phosphoinositide hydrolysis. *Amer. J. Physiol.* **256**, E19 (1989).
- 20) Campbell I. L., Iscaro A., Harrison L. C. : IFN- α and tumor necrosis factor- α cytotoxicity to murine islets of langerhans. *J. Immunol.* **141**, 2325 (1988).