

췌장소도세포와 면역세포에 미치는 팔미원의 영향

이인순 · 이인자*

대구효성가톨릭대학교 약학대학

(Received July 10, 1995)

Effects of PALMIWON on Cell Viability of Immune Cell and β -cell

Ihn-soon Lee and In-ja Rhee*

College of Pharmacy, Daegu-hyoseong Catholic University, KungSan 713-702, Korea

Abstract—In order to investigate the usability of PALMIWON as antidiabetic immuno-modulating prescription for Insulin-dependent diabetes, we studied the effects of PALMIWON on immune cell and β -cell. U937 was used as the model of immune cell and RINm5F as the model of β -cell. The effects of PALMIWON was measured by cell viability in terms of MTT assay. As a result, PALMIWON and the compositional drugs showed the different effects on immune cell and β -cell. Cell viability of U937 was significantly decreased whereas that of RINm5F was no significantly difference between drug treated group and control, or significantly less reduction compared with U937. It implies that PALMIWON is useful as immunotherapeutic agents in the prevention and therapy of type 1 diabetes.

Keywords □ PALMIWON, U937, RIN_m5F, type 1 diabetes, MTT, antidiabetic immunomodulating agents.

팔미원은 8가지 생약으로 구성된 한방처방으로 항당뇨 효과를 가진 보약이다.^{1, 2, 3)} 보약이란 몸을 보호하고 건강을 유지시킨다는 뜻으로 현대 의학적으로는 체내 면역계를 조절한다는 의미로 해석할 수 있다.⁴⁾

유전적 감수성과 각종 환경인자의 상호작용에 의해 췌장 베타세포(β -cell)의 자가 면역적 파괴가 서서히 일어나 인슐린의 절대 결핍을 초래하는 제1형 당뇨병의⁵⁾ 예방과 치료에^{6, 7)} 팔미원의 응용 가능성을 알아보고자 하는 실험으로 면역 세포와 췌장 세포에서의 팔미원과 팔미원을 구성하는 8가지 생약 각각의 효능을 비교, 검색하였다.

면역 세포로는 human histiocytic lymphoma cell line인 U937 cell⁸⁾을 사용하였고 췌장 베타세포로는 생체 glucose 농도에서 insulin release를 유도하는 흰 쥐 유래 insulinoma cell line인 RIN_m5F cell⁹⁾을

이용하였다.

면역 세포와 췌장 소도세포에 대한 팔미원과 구성 생약들의 효과는 각 세포의 세포생존율(cell viability)을 측정하여 알아보았다.

세포생존율은 MTT(C,N-diphenyl-N'-4, 5-dimethyl thiazol-2yl tetrazolium bromide) colorimetric assay^{10, 11)}를 이용하여 측정하였다.

실험방법

세포 배양조건 - U937 cells과 RIN_m5F cells (ATCC사 구입)은 100 u~100 μ g/ml penicillin-streptomycin(Gibco, Euro), 10% (vol/vol) Fetal calf serum(FCS, Gibco) 이 첨가된 RPMI 1640(Gibco, U.S.A)배지, 37°C, 5%-CO₂, 95%-humidity air incubator에서 배양하였다. 각각의 cells은 population doubling time이 지나면 subculture 하여 cells을 유지시켰다. cell culture 중에 사용하는 시

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

약들은 cell culture용 또는 특급 시약들을 무균화하여 사용하였다.

시료의 제조 - 팔미원과 각 구성 생약들을 100 g정도 칭량하여 그 10배의 증류수를 가하여 3시간 가열 추출하였다. 추출액을 여과하고 그 여액을 Rotary evaporator를 이용하여 1/2정도의 용량으로 감압 농축시켰다.

농축액을 동결건조하고 건조 분말화하여 시료로 사용하였다.

각각의 생약 건조 분말들을 칭량하여 phosphate-buffered saline(PBS)에 녹이고 0.2 μ m filter (Millipore, Molsheim, France)를 통과시킨후 각 세포에 적용시켰다. 팔미원 1첩의 구성생약들과 용량은 다음과 같다.

숙지황(Rehmanniae Radix Preparata)	16 g
산약(Dioscoreae Radix)	8 g
산수유(Corni Fructus)	8 g
목단피(Moutan cortex Radicis)	6 g
택사(Alismatis Rhizoma)	6 g
복령(Hoelen)	6 g
육계(Cinnamomi Cortex Spissus)	2 g
부자(Aconiti Tuber)	2 g

MTT assay - MTT(C, N-diphenyl-N'-4, 5-dimethyl thiazol-2yl tetrazolium bromide, Sigma M2128)를 1 mg/ml 농도로 PBS(PH 7.4)에 녹여 0.2 μ m filter (Millipore, Molsheim, France)를 통하여 냉암소(-20°C)에 보관하면서 사용하였다. Formazan crystal을 녹이는 용매는 DMSO(Sigma D8779)를 실온에서 보관하며 사용하였다.

U937의 세포생존율 측정을 위한 MTT assay는 다음과 같이 행하였다.

Tissue culture flask (75 cm² Corning, N.Y. 14831)에서 배양된 U937 cells의 cell density를 1 \times 10⁵ cell/ml로 조정하였다.

1 \times 10⁵ cell/ml의 세포 현탁액에 각각의 생약들을 가하여 각 농도별 약물-세포 현탁액으로 조제하였다.

각 약물 농도로 조정된 약물-세포현탁액(drug-cell suspension)을 96-well microtiter plate (Costar, U.S.A)에 각 well마다 150 μ 씩 주입하였다. 37°C, 5%-CO₂, 95%-humidity air incubator에서 44시간 배양시킨후 각 well에 1 mg/ml의 MTT를 50 μ 씩 가하고 4시간 더 배양시켜, MTT와 cells이 충분히 반응

하여 formazan crystal 생성이 평형에 도달한 후 incubation을 종료하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 formazan crystal을 침전시켰다. 각 well의 배양 여액을 30 μ 정도 남긴 채, 상층액을 제거하고 침전된 formazan crystal을 150 μ /well DMSO로 용해시켰다.

광파장 540 nm의 filter가 부착된 ELISA reader (Multiscan MCC 340)에서 흡광계수 (optical density, OD)를 측정하였다. 모든 실험은 6개 well의 평균치로 평가하였다.

$$\text{세포생존율(cell viability)} = \frac{\text{O.D. of sample}}{\text{O.D. of control}} \times 100$$

각 세포의 세포생존율은 다음과 같이 계산한다.

RIN_m5F cell은 5 \times 10⁴ cell/ml 농도로 2일간 preincubation 시킨후 각 well마다 각 농도의 약물을 가하여 U937 cell과 같은 방법으로 MTT assay하였다.

통계처리 - 각각의 실험은 6회 실시하였으며 통계 처리는 Student's t-test를 이용하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

현대의학의 개념으로 면역 조절성 항 당뇨제로 설명할 수 있는 팔미원과 그 구성 생약들이 면역세포와 체장소도 세포에 대해 어떠한 영향을 미치는 지를 *in vitro*에서 살펴보았다.

본 실험에서 면역세포 모델로 설정한 U937 cell은 단핵구(monocyte)에서 대식세포(macrophage)로의 분화연구에 많이 이용되는 cell line이며, human monocyte와 macrophage는 tumor cells을 포함하는 여러 가지 target cells의 살멸에 관여한다.^{12, 13)} 체장 소도세포의 *in vitro* model로 사용한 RIN_m5F cell은 인슐린 의존형당뇨병의 자가면역반응 유도실험의 모델¹⁴⁾로 사용되는 베타세포 주이다.

제1형 당뇨에서의 대식세포는 소도염(Insulinitis) 초기에 관여하는 것으로 알려지고 있으며, 또한 활성화된 대식세포는 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 저해하거나 체장 소도에 대해 세포 독성을 나타낸다.^{15, 16, 17)} 이와 같이 인슐린 의존형 당뇨병에서의 대식세포의 역할은 항원 표현 세포(antigen presenting cell, APC)로서

Table I— Effects of PALMIWON on the Cell Viability of U937 & RIN cell

concentration of drug (ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	102.000±12.633*	104.333± 5.428	-
5	101.000±12.377	98.000± 5.099	-
10	93.333±12.078	100.667± 5.279	-
50	86.667±11.308	96.500± 5.683	c
100	78.667±11.147	99.166± 6.401	a,c
200	72.333±10.250	95.167± 6.585	a,c
500	62.833± 8.495	87.333±10.270	a,b,c
1000	46.667± 9.832	80.833± 6.853	a,b,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments

-a: significance of RIN vs U937, p<0.05.

-b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.

-c: significance of control-U937 vs drug treated U937 Cell, p<0.005.

소도염의 초기에 관여하며, 또한 소도로 침윤된 대식세포는 cytokines을 생성 분비하여 베타세포 파괴에 관여하는 것으로 생각된다.^{18, 19)}

본 실험 결과에서는 제1형 당뇨병 발생에서 췌장 소도 세포를 공격하는 면역세포와 면역세포의 공격을 받는 췌장 세포 모델로 선정된 U937 cell과 RIN_m5F에서 팔미윈과 그 구성생약들이 서로 다른 양상의 영향을 보여 주어 제1형 당뇨병에서의 면역요법제로의 응용가능성을 시사하였다.

U937과 RIN_m5F cells에 대한 팔미윈과 그 구성생약들의 효능은 MTT assay를 이용한 세포생존율(cell viability)로 평가하였다.

MTT-based colorimetric assay는 세포의 성장과 생존(cellular growth and survival)을 정량하는 적합한 방법으로 살아있는 세포의 mitochondrial oxidative process를 간접적으로 측정하는 방법이다. 즉, soluble tetrazolium salt MTT를 불용성 formazan 결정으로 바꿀 수 있는 살아있는 세포(viable cells)의 능력을 평가하는 방법이다.

U937 cell에 MTT assay를 적용한 예들은 cell proliferation,⁸⁾ cell number & optical density²⁰⁾ 관련성 등에 이용한 연구들이 있다.

베타세포에 대한 MTT assay 적용 타당성은 MTT assay의 독특한 대사 특성(unique metabolic feature of the test)을 고려해 볼 때 베타세포의 기능 평가에 특별히 적합하며, 덧붙여 MTT test는 인슐린 분비세포들에 대한 β-cytotoxic agents들의 효과 측정에도 유용하다.²¹⁾

U937과 RIN_m5F에 대한 팔미윈과 그 구성생약들의 작용양상은 서로 다른 경향을 나타내어 면역세포에 대

해서는 농도의존형으로 세포생존율을 억제시키며, 베타세포의 경우는 전체 실험농도에서 대조군에 상당하는 세포생존율을 나타내었다.

U937세포배양에 대한 팔미윈의 영향은 50 ug/ml 농도부터 유의적인 세포생존율 감소를 나타내어 100 ug/ml 농도에서는 50%이상의 세포생존 억제를 나타내었다.(Table I)

RIN_m5F cell에 미치는 팔미윈의 영향은 200 ug/ml 농도까지는 대조군과 비슷한 세포생존율을 나타내며 U937 cell의 IC₅₀ 부근 즉, 100 ug/ml에서는 80%의 생존율을 나타내어 대조를 보여주며 베타세포와 U937의 두 세포들 간의 세포생존율의 차이는 약물농도 100 ug/ml에서 부터 유의적인 차이를 나타내었다.(Table I)

이러한 결과는 팔미윈이 베타세포에 대해서는 거의 cytotoxicity가 없고 면역세포에 대해서는 일정 농도이상에서 부터 cytotoxicity를 가짐을 알 수 있다.

제1형 당뇨병의 초기에 면역세포가 비정상적으로 활성화되어 이들 면역세포에 의한 베타세포의 파괴가 인슐린의 절대 결핍을 초래한다는 것을 고려해 볼 때, 면역세포의 세포생존율은 억제 시키면서 베타세포에 대해서는 대조군과 비슷한 세포생존율을 유지해주는 팔미윈이 면역학적 공격으로부터 베타세포를 보호해 줄 가능성을 기대해 볼 수 있다. 팔미윈의 어떤 성분이 이러한 작용을 발휘할 것인가에 대해서는 지금까지 보고된 영양물질들에 의한 베타세포 보호효과²²⁾와 팔미윈이 각각의 유효성분들을 가진 8가지 생약으로 된 복합제제이며 예로부터 사용되어온 보약이라는 점을 관련시켜 생각해 볼 때 매우 흥미 있는 결과이다.

8가지 구성생약 중 가장 큰 배합 비중을 차지하는 속지의 경우 RIN_m5F의 세포생존율은 실험한 전 농도 범

Table II— Effects of Rehmanniae Radix Preparata on the Cell Viability of U937 & RIN Cell

concentration of drug (ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	95.667±13.3367*	98.333±6.055	-
5	100.833±10.944	97.677±4.967	-
10	102.667± 9.893	99.166±6.432	-
50	98.667±12.193	102.500±5.468	-
100	93.833±11.107	105.166±5.193	a
200	84.166±11.462	103.333±6.314	a,c
500	81.167±11.686	102.833±7.468	a,c
1000	50.166±15.892	86.833±6.969	a,b,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments

-a: significance of RIN vs U937, p<0.05.

-b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.

-c: significance of control-U937 vs drug treated U937 Cell, p<0.05.

Table III— Effects of Dioscoreae Radix on the Cell Viability of U937 & RIN

Concentration of drug(ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	92.833±12.106*	94.833±10.420	-
5	88.833±11.686	98.833± 7.935	-
10	79.166±10.496	97.000± 4.858	a,c
50	62.166± 9.827	96.667± 6.653	a,c
100	58.833±10.108	105.000± 7.925	a,c
200	53.666± 9.352	103.166± 9.131	a,c
500	47.166±13.512	108.000± 8.989	a,b,c
1000	40.000±17.029	96.333± 5.645	a,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments

-a: significance of RIN vs U937, p<0.05.

-b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.

-c: significance of control-U937 vs drug treated U937 Cell, p<0.05.

Table IV— Effects of Corni Fructus on the Cell Viability of U937 & RIN Cell

concentration of drug(ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	103.166±12.222*	101.333±7.528	-
5	90.666±11.147	104.333±5.888	a
10	80.166±15.079	107.667±8.578	a,c
50	71.666±17.270	105.000±7.259	a,c
100	64.833±14.986	104.500±8.578	a,c
200	50.166±11.583	101.000±6.000	a,c
500	40.166±15.459	97.833±6.585	a,c
1000	27.000±14.478	82.500±7.036	a,b,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments

-a: significance of RIN vs U937, p<0.05.

-b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.

-c: significance of control-U937 vs drug treated U937 Cell, p<0.05.

위에서 대조군과 유사하거나 다소 증가하는 세포생존율을 나타내나, U937의 경우 200 ug/ml 약물농도에서부터 유의적인 세포생존율 억제를 나타내며 두 세포들 간의 유의적인 세포생존율 차이는 100 ug/ml 약물농도에서 부터 나타난다.(Table II)

산약, 산수유 그리고 복령은 모두 면역세포에 대해서는 농도의존형으로 세포생존율 억제를 보였으며, 베타 세포에 대해서는 실험한 전 약물농도 범위에서 대조군에 상응하는 세포생존율을 나타내어 면역세포만을 선택적으로 생존억제하는 경향을 나타내었다.(Table III,

Table V — Effects of Moutan cortex Radicis on the Cell Viability of U937 & RIN Cell

Concentration of drug (ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	93.500±11.640*	96.000± 7.849	-
5	85.166±11.940	98.667± 7.062	a,c
10	82.166±14.905	96.666± 6.154	c
50	81.500±15.630	95.666± 0.652	c
100	54.116± 8.256	93.833± 7.223	a,c
200	37.000± 7.694	100.333±10.073	a,c
500	32.333±10.405	98.667± 8.214	a,c
1000	25.500±16.897	83.500± 7.342	a,b,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments
 -a: significance of RIN vs U937, p<0.05.
 -b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.
 -c: significance of control-U937 vs treated U937 Cell, p<0.05.

Table VI — Effects of Allismatis Rhizoma on the Cell Viability of U937 & RIN Cell

Concentration of drug (ug/ml)	cell viability (% of control)		Significance
	U937	RIN	
1	105.333±14.067*	96.333±10.985	-
5	102.000±13.653	94.666±10.053	-
10	101.666±12.144	91.666± 9.004	-
50	98.833±11.652	97.500± 7.609	-
100	87.833± 9.745	92.000± 8.532	c
200	75.833±10.458	95.000± 7.510	a,c
500	70.666±10.614	94.000± 7.642	a,c
1000	48.833±17.186	93.000± 8.579	a,c

-*: Mean Values±S.D. from 6 Experiments
 -a: significance of RIN vs U937, p<0.05.
 -b: significance of control-RIN vs drug treated RIN Cell, p<0.05.
 -c: significance of control-U937 vs drug treated U937 Cell, p<0.05.

IV, VII)

텍사는 RIN_m5F의 세포배양에 대해서는 약물적용 전 농도범위에서 대조군과 비슷한 세포생존율을 나타내며, U937 cell에서는 100 ug/ml 농도부터 유의적인 세포생존율억제를 나타내며, 두 세포군 간의 세포생존율 양상의 차이는 200 ug/ml 농도에서부터 유의적인 차이를 나타낸다.(Table VI)

목단피, 계지의 경우 U937의 세포생존율이 약물투여 군에서 현저하게 감소하여 IC₅₀은 각각 100 ug/ml 정도이며, RIN_m5F cell에서는 전 농도구간에서 대조군과 비슷한 수준의 생존율을 유지하여 U937과는 다른 양상의 세포생존율 변화를 나타내었다.(Table V, VIII)

부자는 면역세포에 대해서 농도 의존형으로 세포생존율을 억제시키며 IC₅₀은 200 ug/ml 정도이며, 베타세포에 대해서도 다른 생약과는 달리 세포생존율이 다소 억제되는 양상이나, 두 세포군 간의 생존율 억제 정도에는 50 ug/ml 농도에서 부터 유의적인 차이를 보인다.

(Table IX) 따라서 면역세포와 베타세포의 세포생존에 미치는 부자의 영향은 다른 생약들처럼 서로 다른 작용양상임을 알 수 있다.

이상의 결과에서 항 당뇨병 보약제인 팔미원과 팔미원을 구성하는 8가지 생약들이 lymphoma cell line U937 cell과 insulinoma cell line RIN_m5F cell의 세포생존율에 대해 서로 다른 경향을 가진다는 사실은 의미있는 현상이다. 이번 연구는 *in vitro* model을 이용한 실험으로 한계성을 가지긴 하지만 면역체계의 이상에 의한 베타세포 파괴가 병발원인인 인슐린 의존형 당뇨병의 예방과 치료에 팔미원의 적용 가능성을 지지하는 의미있는 결과를 보여준다. 다음 연구에서는 세포생존율 뿐만 아니라 베타세포의 주요한 기능인 insulin release를 측정하여 팔미원과 구성생약들이 인슐린 분비에는 어떠한 영향을 미치는지와 제1형 당뇨병 유발인자에 의해 손상된 베타세포에는 팔미원이 어떠한 작용을 나타내는지 조사해 보려한다. 그리고 각

생약들의 유효성분을 추출하여 적용해 봄으로써 어떤 성분들이 제1형 당뇨병의 예방과 치료에 직접 작용하는지, 그리고 더 나아가 인슐린 의존성 당뇨병의 분자 생물학적 수준에서의 연구에 다소 기여할 수 있을 것이다.

문 헌

- 1) 대한약사한약연구회편: 한약학, 한국 메디칼 인덱스사, 서울 p. 423 (1991).
- 2) 박영순: 한방의 약리해설, 한성사, 서울 p 642 (1994).
- 3) 동의 과학원: 동의 처방대전 1, 여강출판사, p. 56 (1993).
- 4) 박승용 외: 생약 추출물의 면역 조절작용 (I)-도꼬마리 추출물의 면역 억제작용, 대한 면역학회지, **12**, 1 (1990).
- 5) Lernamrk A.: Molecular biology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* **28**, 195 (1985).
- 6) Lampeter E. F., Signore A., Gale E. A. M., Pozzilli P.: Lessons from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **32**, 703 (1989).
- 7) Edward H. L. and David V. S.: Autoimmune diabetes in NOD mouse: suppression of immune defects by bone marrow transplantation and implication for therapy. *Clinical immunology and immunopathology* **59**, 323 (1991).
- 8) Jonkhoff, A. R., Huijgens, P. C., Versteegh, R. T., Van Dieren, E. B., Ossenkoppele, G. J., Martens, H. J. M. and Teule, G. J. J.: Gallium-67 radiotoxicity in human U937 lymphoma cells. *Br. J. Canc.* **67**, 693 (1993).
- 9) Erik, G. and Hellman, B.: Glucose-stimulated sequestration of Ca^{2+} in clonal insulin-releasing cell. *Biochem. J.* **233**, 865 (1986).
- 10) Janjic, D. and Wolheim, C. B.: Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* **35**, 482 (1992).
- 11) Ichiro M., Naomi I., Masanari O. and Hiroshi K.: Simple colorimetric cell-cell adhesion assay using MTT-stained leukemia cells. *Journal of Immunological Methods* **164**, 255 (1993).
- 12) Arjan A. Van de Loosdrecht, Robert H. J. B., Gert J. O., Majolein, G. B. and Mart M. A. C. L.: Cellular and cytokine dependent monocyte-mediated leukemic cell death: modulation by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Experimental Hematology* **21**, 461 (1993).
- 13) Van de Loosdrecht, A. A., Ossenkoppele, G. J., Beelen, R. H. J., Broekhoven, M. G., Drager, A. M. and Langenhuijsen, M. M. A. C.: Apoptosis in tumor necrosis factor- α -dependent, monocyte-mediated leukemic cell death: a functional, morphologic, and flow-cytometric analysis. *Experimental Hematology* **21**, 1628 (1993).
- 14) Anne-Marie Varey, Peter M. Lydyard, Betty M. Dean, Peter H. van der Meide, Jouce D. Baird, and Anne Cooke: Interferon- γ Induces class II MHC antigens on RIN_m5F cells. *Diabetes* **37**, 209 (1988).
- 15) Lee, K. U., Amano, K., and Yoon, J. W.: Evidence for initial involvement of macrophages in development of insulinitis in NOD mice. *Diabetes* **37**, 989 (1988).
- 16) Lee, K. U., Kim, M. K., Amano, K., Pak, C. Y., Jaworski, M. A., Mehta, J. G., and Yoon, J. W.: Preferential infiltration of macrophages during early stages of insulinitis in diabetes-prone BB rats. *Diabetes* **37**, 1053 (1988).
- 17) Amano, R. and Yoon, J. W.: Studies on autoimmunity for initiation of β -cell destruction. *Diabetes* **39**, 590 (1990).
- 18) Haneberg, H. Kolb-Bachofen, V. Kantwerk-Funke, G. and Kolb, H.: Macrophage infiltration precedes and is a prerequisite for lymphocytic insulinitis in pancreatic islets of pre-diabetic BB rats. *Diabetologia* **32**, 126 (1989).
- 19) Lee, K. U., Pak, C. Y., Amano, K. and Yoon, J. W.: Prevention of lymphocytic thyroiditis and insulinitis in diabetes-prone BB rats by the depletion of macrophages. *Diabetologia* **30**, 400 (1988).
- 20) Schweitzer, C. M. Van de Loosdrecht, A. A. Jonkhoff, A. R. Ossenkoppele, G. J. Huijgens, P. C. Drager, A. M. Broekhoven, M. G. Langenhuijsen, M. M. A. C.: Spectrophotometric determination of clonogenic capacity of leukemic cells in a semisolid microtiter culture

- system. *Experimental Hematology* **21**, 573 (1993).
- 21) Janjic, D. and Wollheim, C. B.: Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* **35**, 482 (1992).
- 22) Decio, L. E. and Stellan, S.: The Partial protective effect of branched chain amino acids against streptozotocin-Induced cytotoxicity to mouse pancreatic islets in vitro. *Pharmacology & Toxicology* **61**, 320 (1987).