

MONOLAYER CULTURES OF PANCREATIC TISSUE. IV. INVESTIGATIONS OF INSULIN SECRETION AND THE INFLUENCE OF HETEROLOGOUS INSULIN

INGEBORG HILWIG

MACCHI and BLAUSTEIN¹³ and HILWIG *et al.*⁶ reported insulin secretion in monolayer cultures of pancreatic tissue from hamsters, rats and humans; HILWIG and VRBANEC⁷ showed that glucose and caffeine raise the amount of insulin released by cultured rat and pig pancreatic cells.

This paper reports: the dependence of insulin secretion on the age of the cells and on the frequency with which the nutrient medium is changed; the relationship between the insulin content of the cells grown in vitro and the level of insulin secretion; the effect of dilution of the samples on the quantity of insulin released and the influence of heterologous insulin on insulin secretion.

MATERIALS AND METHODS

We used pancreatic tissue from male rats weighing 40 g which had not been starved before removal of the tissue, pancreata of 18-day-old fetal rats, and pancreata of 1- to 3-day-old pigs. The animals were killed by decapitation; the tissue was removed immediately under sterile conditions, placed in Hank's salt solution and further processed directly.

COLTURE MONOSTRATIFICATE DI TESSUTO PANCREATICO. IV. RICERCHE SULLA SECREZIONE INSULINICA ED INFLUENZA DI QUELLA ETEROLOGA. MACCHI e BLAUSTEIN¹³ e HILWIG e Coll.⁶ hanno descritto la secrezione insulinica in colture monostratificate di tessuto pancreatico umano, di criceto e di ratto; HILWIG e VRBANEC⁷ hanno dimostrato che il glucosio e la caffeina provocano aumento della quantità di insulina liberata da colture di cellule pancreatiche di ratto e di maiale.

Nel presente lavoro viene riferito circa i seguenti punti: la dipendenza della secrezione insulinica dall'età delle cellule e dalla frequenza con cui il mezzo nutritivo viene cambiato; i rapporti tra contenuto in insulina delle cellule coltivate *in vitro* e livello della secrezione insulinica; l'effetto della diluizione dei campioni sulla quantità di ormone liberato; l'influenza esercitata dall'insulina eterologa sulla secrezione ormonale.

MATERIALI E METODI

Abbiamo impiegato: tessuto pancreatico ottenuto da ratti maschi del peso di 40 g, non tenuti a digiuno prima della rimozione del tessuto stesso; pancreas fetale di ratti di 18 giorni; pancreas di maiali di 1-3 giorni di età. Gli animali venivano uccisi mediante decapitazione; il tessuto era rimosso immediatamente in condizioni di sterilità, posto in soluzione salina di Hank e utilizzato quindi direttamente per le prove.

Key-words: Heterologous insulin; Insulin release; Pancreatic tissue; Tissue culture.

Data di arrivo in Redazione 22-12-1971.

Acta diabet. lat. 9, 577, 1972.

The tissue was prepared according to HILWIG *et al.*⁶ by fractionated treatment with enzymes (trypsin and collagenase: MOSKALEWSKI¹⁷); the tissue was thus almost completely separated into individual cells. After 20 to 45 min of enzyme treatment and thorough mixing, the remaining bits of tissue were allowed to settle for 1 min, only the supernatant being used.

The cells were grown in 180 ml square flasks or Leighton tubes. Each experiment consisted of three flasks or six tubes, each seeded with 0.2 to 0.4 million cells/ml (counted in a haemocytometer). The experiments were carried out with the monolayer after removing the cell debris at the first of change medium. The culture medium (10 ml/flask, 1 ml/tube) consisted of TCM 199 and 10% fetal calf serum supplemented with 3 mg/ml glucose (total glucose concentration 4 mg/ml).

The glucose concentration was augmented to increase the cell growth. During the experiments with heterologous insulin the glucose concentration amounted to 1 mg/ml. In the initial stage, i.e. for the first three days in vitro, 100 U/ml penicillin and 25 µg/ml streptomycin were added. The nutrient medium was changed 3, 5, 7, 10 and 12 days thereafter. Long-term experiments in flasks were started on the first day in vitro. For sampling, between changes of medium, 0.5 ml was removed from each flask. Short-term experiments were carried out on the 5th day. For sampling we removed 6 tubes and continued the experiment with parallel tubes. Each figure shows the result of one representative example of 3-5 experiments. Each point of one figure is the average of three measurements of parallel samples.

Experiments with non-insulin-producing cells were carried out with embryonic rat fibroblasts (monolayers of primary cultures). The tissue was mechanically reduced to small pieces and dissociated almost completely into individual cells with 0.25% trypsin. In addition we used the permanent cell lines strain L (mouse fibroblasts, Dr. Earle) and LLC-MK₂ (monkey kidney cells, Microbiological Associates, Inc.). These cells have been growing as monolayer cultures in our laboratory for many years. The culture conditions corresponded to the method for pancreatic cells. The experiments were carried out on the 3rd day of culturing, i.e. 3 days after transfer.

Preparation of cell extracts - Cells were disrupted with a Belco tissue grinder and total protein was precipitated with trichloroacetic acid (5%). Insulin was dissolved in

Il tessuto veniva preparato, secondo la metodica descritta da HILWIG e Coll.⁶, mediante trattamento frazionato con enzimi (tripsina e collagenasi: MOSKALEWSKI¹⁷); in tal modo, esso veniva separato quasi completamente in singole cellule. Dopo 20-45 min di trattamento enzimatico e di miscelazione, i frammenti di tessuto residuati erano lasciati decantare per 1 min, venendo utilizzato solamente il soprannatante.

Le cellule venivano poste in coltura in matracci quadrati o in tubi di Leighton da 180 ml. Per ogni prova si impiegavano 3 matracci o 6 cilindri, ognuno dei quali insemato con 0,2-0,4 milioni di cellule/ml (contate in un ematocitometro). Gli esperimenti erano eseguiti in monostrato, dopo che al primo cambio del mezzo di incubazione erano stati allontanati i detriti cellulari. Il mezzo di coltura (10 ml per matraccio, 1 ml per cilindro) era costituito da TCM 199 e siero di feto di vitello al 10%, addizionato con 3 mg/ml di glucosio (concentrazione totale di glucosio: 4 mg/ml).

La concentrazione del glucosio veniva aumentata al fine di stimolare l'accrescimento delle cellule. Durante le prove con insulina eterologa, la concentrazione di glucosio ammontava a 1 mg/ml. Nella fase iniziale, cioè nei primi tre giorni *in vitro*, si aggiungevano 100 U/ml di penicillina e 25 µg/ml di streptomicina. Il mezzo nutritivo veniva cambiato dopo 3, 5, 7, 10 e 12 giorni. Gli esperimenti a lungo termine avevano inizio nello stesso giorno in cui le cellule erano state poste *in vitro*. Campioni di 0,5 ml venivano prelevati da ogni matraccio tra un cambio e l'altro del mezzo. Gli esperimenti a breve termine avevano invece inizio al 5° giorno. Quali campioni venivano prelevati 6 tubi, continuando gli esperimenti con i restanti; ogni cifra indica il risultato di un esempio rappresentativo di 3-5 esperimenti. Ogni numero rappresenta la media di tre misurazioni effettuate su campioni paralleli.

Esperimenti con cellule non insulino-secerenti sono stati eseguiti con fibroblasti embrionali di ratto (colture primarie monostratificate). Il tessuto veniva ridotto meccanicamente in piccoli pezzi e dissociato quasi completamente in cellule singole per mezzo di tripsina allo 0,25%. In aggiunta abbiamo usato le linee cellulari permanenti ceppo L (fibroblasti di topo, Dr. Earle) e LLC-MK₂ (cellule renali di scimmia, Microbiological Associates Inc.). Queste cellule crescono da molti anni nel nostro laboratorio come colture monostratificate. Le condizioni di coltura erano le medesime che per le cellule pancreatiche. Gli esperimenti venivano eseguiti al 3° giorno di coltura, cioè 3 giorni dopo il trasferimento.

Preparazione degli estratti cellulari - Le cellule venivano smembrate con un macinatore Bellco e le proteine totali precipitate con acido tricloroacetico (5%). L'insulina ve-

hydrochloric acid/alcohol (1.5 ml 12 M HCl and 100 ml 70 % ethyl alcohol) and processed further according to the method described by MURRELL¹⁸. From the experiments each time 3 flasks were removed and extracted.

Determination of protein - The cells were washed three times with Hank's salt solution to remove all components of the nutrient medium; the cell sediment was taken up in 0.2 ml distilled water and after the addition of an equal amount of 98% sulphuric acid, processed further according to the method of MOORE and STEIN¹⁶ for assaying protein.

Determination of insulin - Insulin was determined by immunoassay; using a method based on that of MEADE and KLITGAARD¹⁵ and KERP et al.⁹. After antigen-antibody reaction, the free insulin was adsorbed on cellulose while the antibody-bound insulin remained in solution.

RESULTS

The insulin release of pig pancreatic cells grown as monolayers was higher than the insulin secretion of 'special cells' * (figs 1a and 1b). The amount of insulin released decreased with increasing age of the cells, the insulin secretion of pig pancreatic cells declining more rapidly than that of rat pancreatic cells. When 'special cells' were cultured through two passages, the amount of insulin released and the amount remaining in the cells after the transfer to the second bottle declined relatively sharply (the cells were removed with a 0.25% trypsin solution). When embryonic rat pancreatic cells were used as starting tissue, insulin secretion was similar to that of pancreatic cells of rats weighing 40 g.

Studies of insulin released 24 hrs after each change of nutrient medium revealed a generally continuous increase in the amount of insulin in the nutrient solution of both rat and pig cell cul-

niva disciolta in acido cloridrico/alcool (1,5 ml di HCl 12 M e 100 ml di alcool etilico al 70 %) e trattata quindi secondo il metodo descritto da MURRELL¹⁸. Ogni volta venivano prelevati ed estratti i contenuti di 3 matracci.

Determinazione delle proteine - Le cellule erano lavate tre volte con soluzione salina di Hank per allontanare tutti i costituenti del mezzo nutritivo; il sedimento cellulare veniva raccolto con 0,2 ml di acqua distillata e, dopo aggiunta di una uguale quantità di acido solforico al 98 %, trattato secondo il metodo di MOORE e STEIN¹⁶ per la determinazione delle proteine.

Determinazione dell'insulina - L'insulina veniva determinata radioimmunologicamente, con l'impiego di un metodo basato su quelli di MEADE e KLITGAARD¹⁵ e di KERP e Coll.⁹. Dopo la reazione tra l'antigene e l'anticorpo, l'insulina libera veniva adsorbita su cellulosa, mentre quella legata all'anticorpo rimaneva in soluzione.

RISULTATI

La liberazione di insulina da parte delle cellule pancreatiche di maiale in coltura monostratificata era più elevata rispetto a quella delle « cellule speciali » (figg. 1a e 1b). La quantità di insulina liberata diminuiva con l'aumentare dell'età delle cellule, e ciò più rapidamente per le cellule pancreatiche di maiale che per quelle di ratto. Quando le « cellule speciali » venivano coltivate attraverso due passaggi, la quantità di insulina liberata e quella che rimaneva nelle cellule dopo il trasferimento nel secondo flacone diminuivano in maniera relativamente marcata (le cellule venivano allontanate per mezzo di una soluzione di tripsina allo 0,25 %). Quando come tessuto di partenza venivano usate cellule pancreatiche embrionali di ratto, la secrezione insulinica era simile a quella di cellule pancreatiche di ratti del peso di 40 g.

Lo studio della quantità di insulina liberata 24 h dopo ogni rinnovo del mezzo nutritivo ha messo in evidenza nelle colture cellulari, sia di ratto che di maiale, aumento per lo più continuo

* The type of cells cultured from rat pancreas (HILWIG et al.⁶).

* Tipo di cellule di pancreas di ratto in coltura (HILWIG e Coll.⁶).

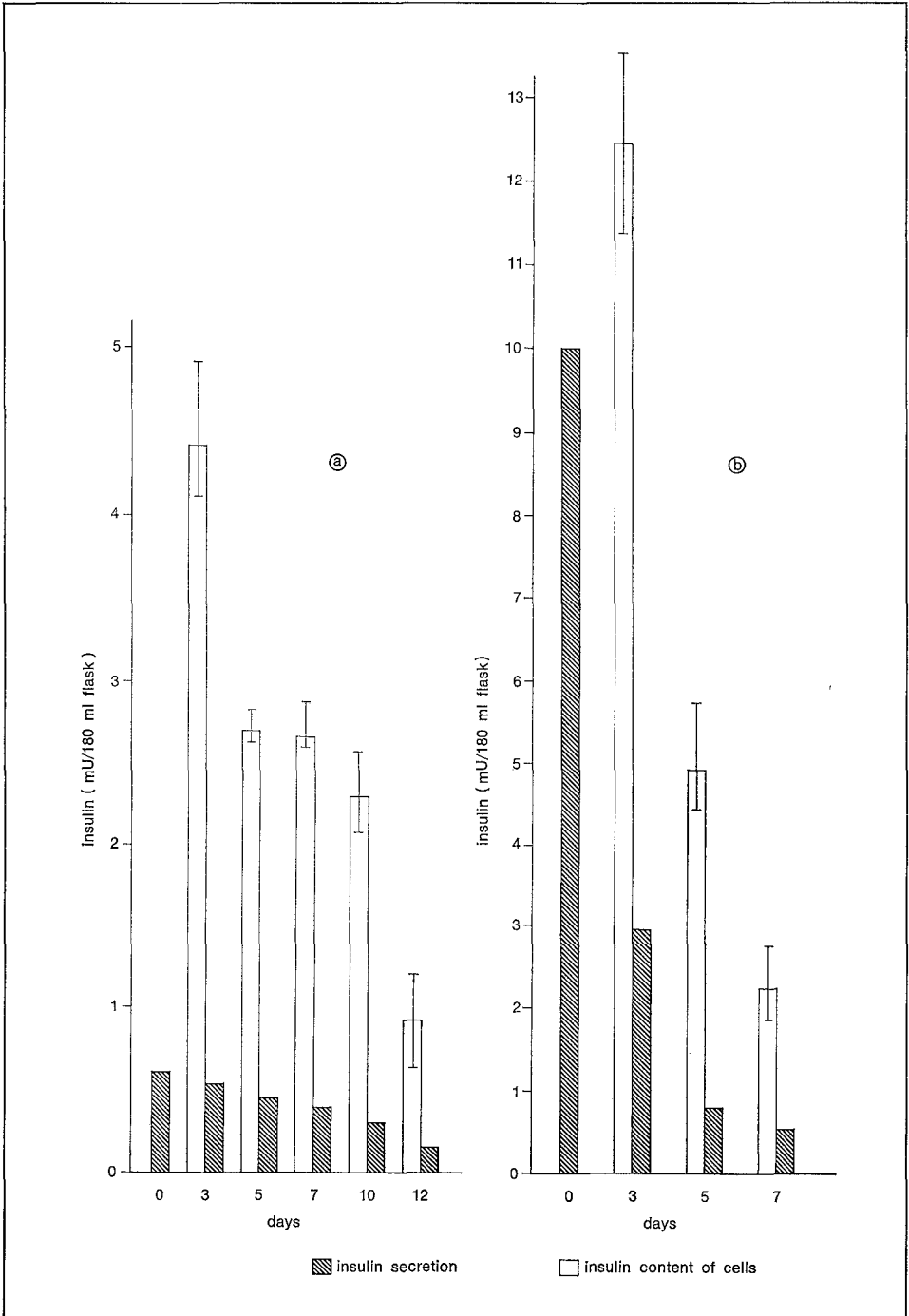


Fig. 1 - Insulin secretion and insulin content of cells cultured *in vitro* for several days: a) rat 'special cells'; b) pig pancreatic cells (the scale is half that of a).

Secrezione insulinica e contenuto insulinico delle cellule coltivate *in vitro* per parecchi giorni: a) «cellule speciali» di ratto; b) cellule pancreatiche di maiale (la scala è la metà di a).

tures. In other experiments, however, most of the insulin was already released in the first 2 hrs after the medium had been changed (fig. 2). The fluctuations of the measured values were especially large during these first 2 hrs after the change of medium (sampled at 15 to 30 min intervals). The insulin content remaining in the cell extracts did not change substantially during the later course of the experiment.

An intervening change of culture medium influenced the amount of insulin released. Changing the culture medium twice within 6 hrs resulted in higher

dell'ormone contenuto nella soluzione nutritiva. In altri esperimenti, tuttavia, la maggior parte dell'insulina veniva liberata già nelle prime 2 h successive al cambio del mezzo (fig. 2). Ampie fluttuazioni dei valori riscontrati si avevano soprattutto durante queste prime 2 h (campioni venivano prelevati ad intervalli di 15-30 min), mentre il restante contenuto in insulina degli estratti cellulari non subiva sostanziali modificazioni nell'ulteriore corso dell'esperimento.

Il cambio del mezzo di coltura influenzava la quantità di insulina liberata. Quando questo veniva rinnovato due volte in 6 h, la secrezione dell'or-

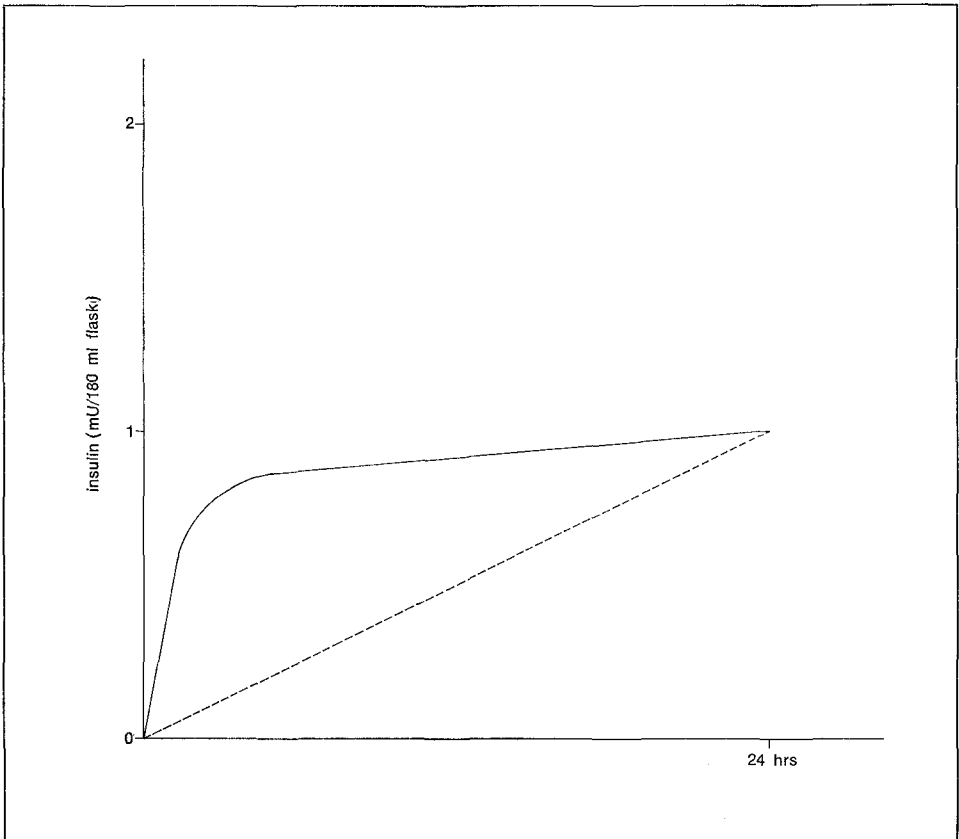


Fig. 2 - Schematic representation of insulin secretion as a function of time. I. Largest release in the first 2 hrs. II. Continuous release.

Rappresentazione schematica della secrezione insulinica in funzione del tempo. I. Liberazione più forte nelle prime 2 h. II. Liberazione continua.

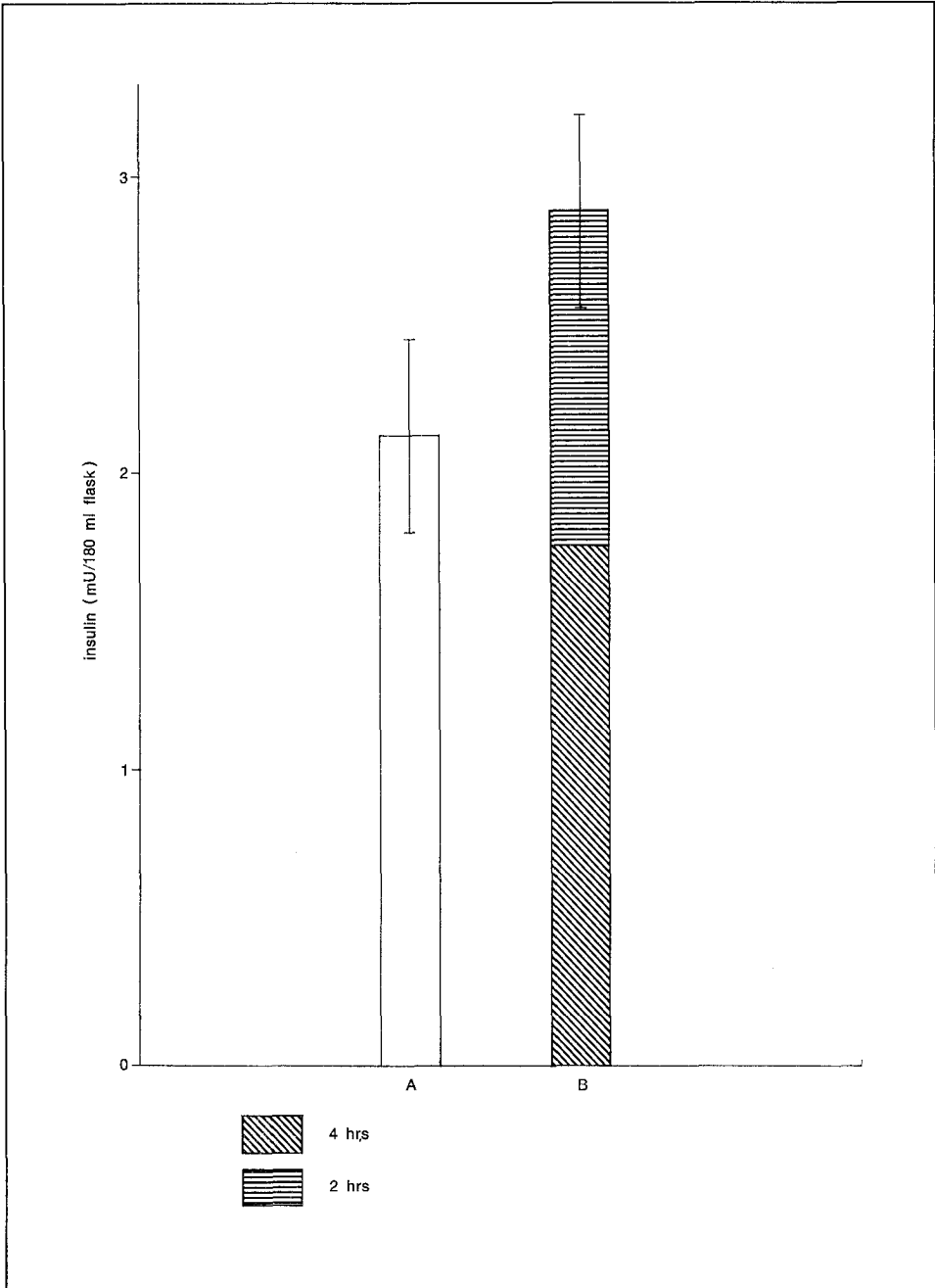


Fig. 3 - Influence of two changes of culture medium within 6 hrs on insulin secretion. (Pig pancreatic cells cultured for five days *in vitro*). A: Insulin release in 6 hrs without a change of medium; B: insulin release in 6 hrs with an intervening change of medium after 4 hrs.

Influenza del cambiamento del mezzo di coltura due volte in 6 h sulla secrezione insulinica. (Cellule pancreatiche di maiale coltivate per cinque giorni *in vitro*); A: liberazione di insulina in 6 h senza cambiamento del mezzo; B: liberazione di insulina in 6 h con cambiamento del mezzo dopo 4 h.

insulin secretion than was found without of change medium (fig. 3).

The results of protein determination in cell extracts during in vitro cultivation of 'special cells' and pig pancreatic cells suggested that only about 15-20 % of the seeded cells grew. The amount of protein in pig pancreatic cells in vitro remained about the same from the 3rd to the 7th day; in 'special cells' it showed a distinct increase.

In order to investigate the insulin content of cell extracts it was necessary in some cases to dilute the sample with buffer solution, because the insulin content of the original sample did not lie within the measurable range. When this was done, the amount of insulin increased with increasing dilution. We observed the same effect when we diluted the culture medium into which rat pancreatic cells had released their insulin (fig. 4). However, dilution of extracts from pig pancreatic cells and their respective nutrient solutions gave more ambiguous results (slight increase in insulin content and a wide scatter of measured values).

When heterologous insulin (60 μ U/ml) was added to insulin releasing cells throughout the entire period of culture (7 days) in amounts within the range of control cell insulin secretion, the measured insulin levels did not reach the so-called 'theoretical values' (the amount of extracellular insulin added and the amount released by control cells) (fig. 5). When the amount of heterologous insulin was increased 2 to 3-fold, the measured insulin levels not only lay below the theoretical levels, but even below the levels of the added insulin. Similar results (but not so pronounced) we found in experiments of 24-h duration. The heterologous insulin (100 μ U/ml) was added to 5-day old cultures when changing the nutrient

medium risultava maggiore che non in assenza di cambiamenti (fig. 3).

I risultati delle determinazioni delle proteine negli estratti cellulari durante la coltura *in vitro* di « cellule speciali » e di cellule pancreatiche di maiale indicano che si aveva accrescimento di solo il 15-20 % circa delle cellule seminate. Nelle cellule pancreatiche di maiale *in vitro*, la quantità di proteine rimaneva pressappoco la stessa dal 3° al 7° giorno, mentre nelle « cellule speciali » era dimostrabile un netto aumento.

Per determinare la quantità di insulina degli estratti cellulari, si è dovuto ricorrere in qualche caso alla diluizione del campione con soluzione tampone, essendo il contenuto in ormone del campione originale al di fuori dell'ambito dei valori misurabili. Quando veniva operata la diluizione, la quantità di insulina aumentava con l'aumentare della diluizione stessa. Lo stesso effetto è stato osservato quando si diluiva il mezzo di coltura nel quale le cellule pancreatiche di ratto avevano liberato la loro insulina (fig. 4). Tuttavia, con la diluizione degli estratti di cellule pancreatiche di maiale e delle loro rispettive soluzioni nutritive i risultati erano meno chiari (leggero aumento del contenuto insulinico e notevole dispersione dei valori misurati).

Quando alle cellule insulino-secerenti veniva aggiunta, durante l'intero periodo di coltura (7 giorni), insulina eterologa (60 μ U/ml) in quantità compresa nell'ambito della secrezione insulinica delle cellule di controllo, i livelli di ormone misurati non raggiungevano i cosiddetti « valori teorici » (quantità di insulina extracellulare aggiunta più quantità liberata dalle cellule di controllo) (fig. 5). Quando la quantità di insulina eterologa veniva aumentata di 2-3 volte, i livelli ormonali misurati non soltanto si trovavano al disotto di quelli teorici, ma persino al disotto di quelli dell'insulina aggiunta. Risultati simili (seppure non così evidenti) sono stati ottenuti negli esperimenti della durata di 24 h, nei quali l'insulina etero-

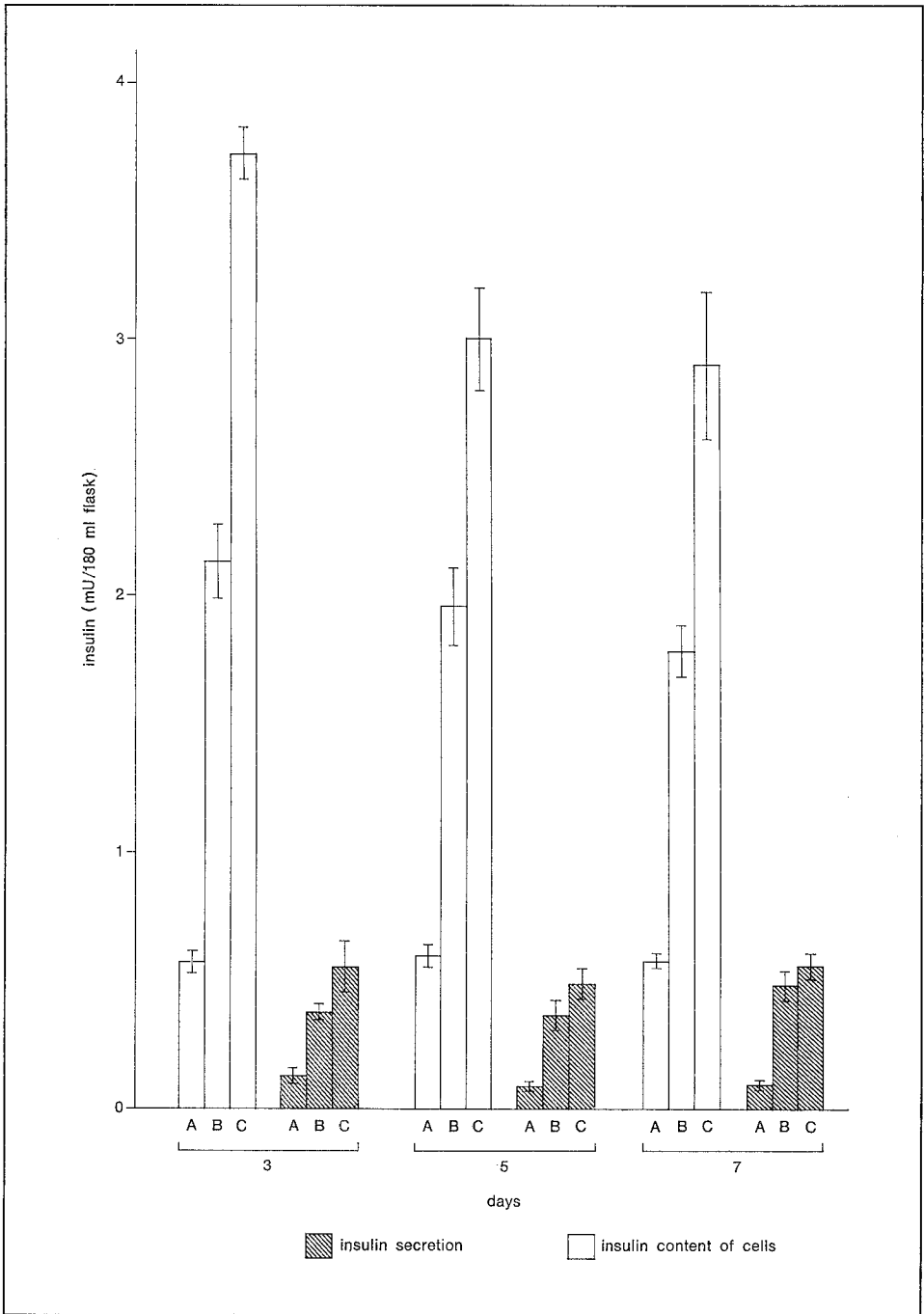


Fig. 4 - Increase of insulin content caused by diluting the samples of cell extract and the nutrient solution of 'special cells' cultured in vitro. A: undiluted sample; B: diluted 1/5; C: diluted 1/10. Aumento del contenuto insulinico dovuto alla diluizione dei campioni dell'estratto cellulare ed alla soluzione delle « cellule speciali » coltivate *in vitro*. A: campione non diluito; B: diluito 1/5; C: diluito 1/10.

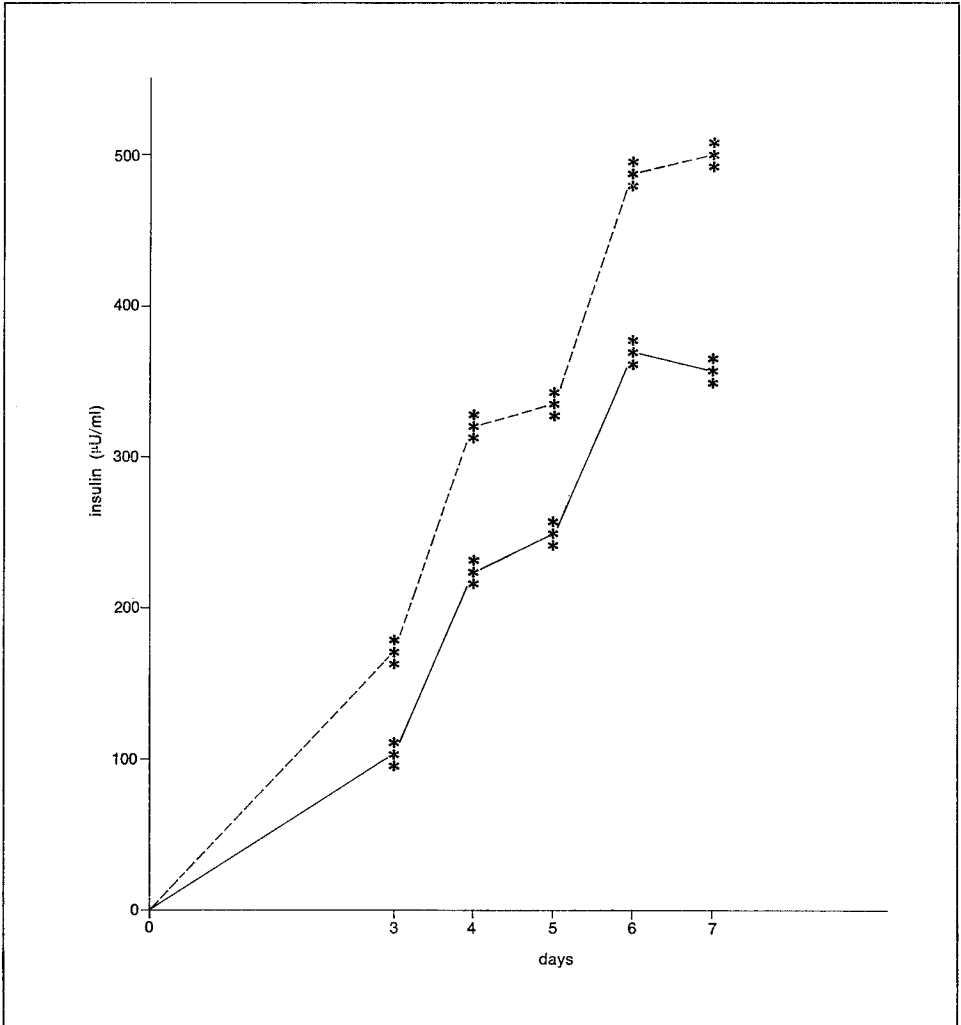


Fig. 5 - Effect on insulin secretion of adding heterologous insulin (added during initial phase and when changing nutrient medium) over the entire period of culture (7 days).

Effetto dell'aggiunta di insulina eterologa (nella fase iniziale e al momento del rinnovo del mezzo nutritivo) sulla secrezione insulinica nell'intero periodo di coltura (7 giorni).

medium. The insulin level measured 24 hrs later was below the 'theoretical value' (fig. 6).

Investigations of the insulin consumption by non-insulin-producing cells cultured *in vitro* were carried out with primary cultures (rat fibroblasts) and permanent cell lines (strain L and LLC-

loga (100 µU/ml) veniva aggiunta a colture di 5 giorni al momento del rinnovo del mezzo nutritivo. I livelli insulinici misurati 24 h più tardi erano inferiori al « valore teorico » (fig. 6).

Ricerche sul consumo di insulina da parte di cellule non insulino-secerenti coltivate *in vitro* sono state eseguite con l'impiego di colture primarie (fibroblasti di ratto) e di linee cellulari perma-

MK₂). The amount of insulin consumed by primary cultures depended on the duration of enzyme treatment used to dissociate the tissue into cells and on their more or less vigorous growth. Cultures with a good growth rate consumed up to 70 % of the added insulin, while slow-growing cultures required only about 20 %. Absolute consumption rose slightly with increasing insulin concentration (fig. 7). Permanent cell lines (strain L and LLC-MK₂) with high growth rates consumed 30 to 70 % of the added insulin within 24 hrs.

The insulin loss after 24-h incubation in nutrient medium (without cells) could amount to as much as

amenti (ceppo L e LLC-MK₂). La quantità di ormone consumato dalle colture primarie dipendeva dalla durata del trattamento enzimatico attuato per ottenere la dissociazione del tessuto negli elementi cellulari costitutivi e dalla loro crescita più o meno vigorosa. Le colture con buona velocità di accrescimento consumavano fino al 70 % dell'insulina aggiunta, mentre quelle a lenta crescita ne richiedevano soltanto il 20 % circa. Il consumo totale aumentava lentamente con l'aumentare della concentrazione di insulina (fig. 7). Le linee cellulari permanenti (ceppo L e LLC-MK₂) con elevata velocità di crescita consumavano il 30-70 % dell'insulina entro 24 h.

La perdita di insulina dopo 24 h di incubazione in mezzo nutritivo (privo di cellule) potrebbe ammontare a circa

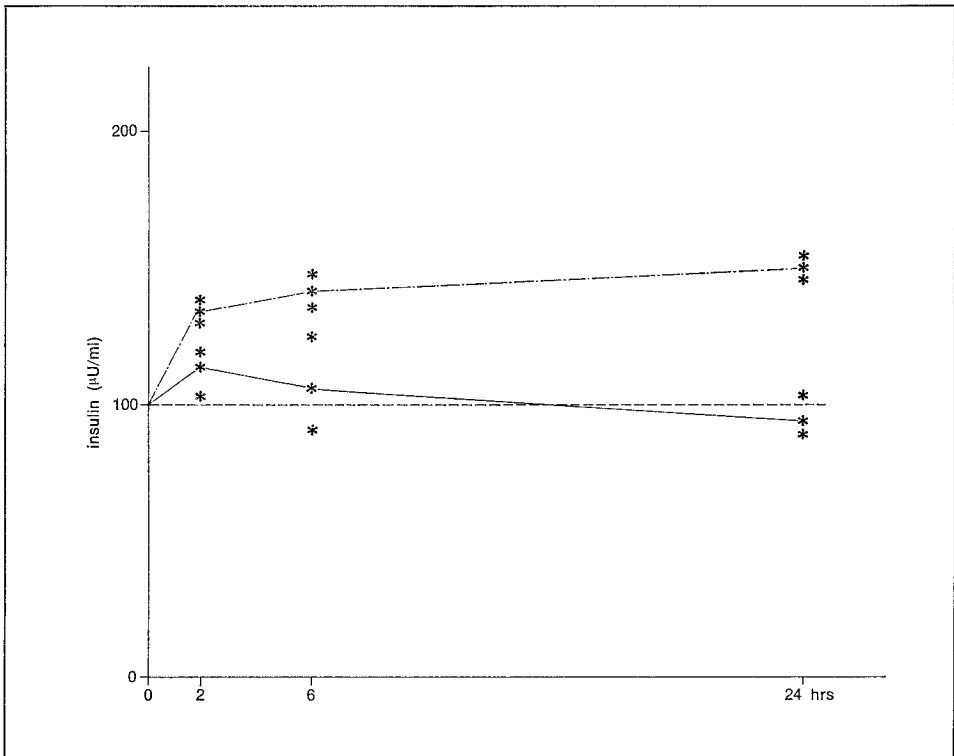


Fig. 6 - Effect on insulin secretion of adding heterologous insulin (added when changing nutrient medium) to 5-day-old 'special cells' for 24 hrs.

Effetto sulla secrezione insulinica dell'aggiunta di insulina eterologa (al momento del rinnovo del mezzo nutritivo) a « cellule speciali » di 5 giorni per 24 h.

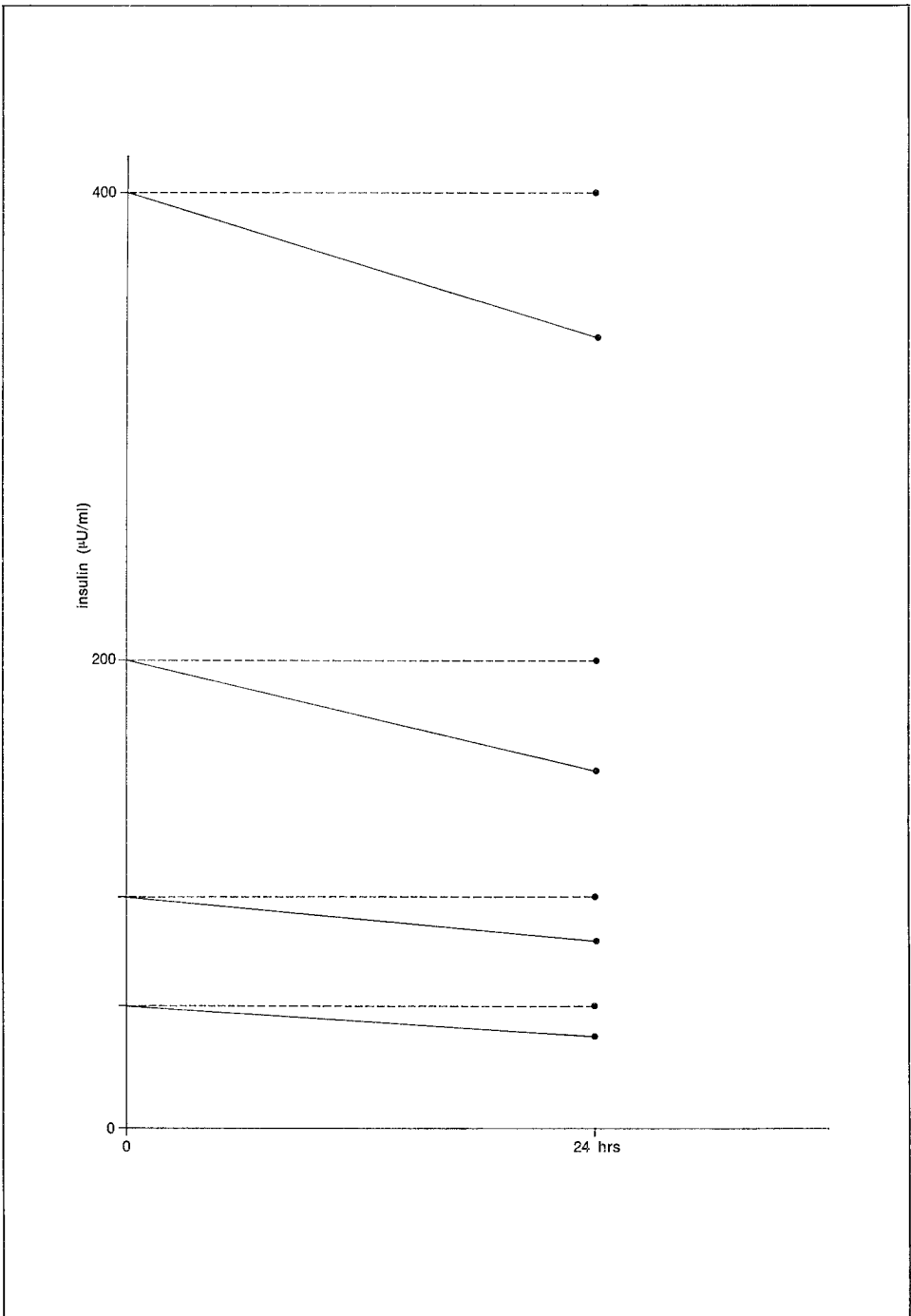


Fig. 7 - Insulin consumption of rat fibroblasts (primary cultures) during the growth phase (24 hrs) as a function of the amount of insulin added.

Consumo di insulina dei fibroblasti di ratto (colture primarie) durante la fase di crescita (24 h), in funzione della quantità di insulina aggiunta.

20 %. To what extent this decomposition of insulin has to be taken into account in growing culture preparations is unknown.

DISCUSSION

As a supplement to our earlier investigations (HILWIG et al.⁶) this paper contains the results of experiments with pig pancreatic cells which release larger quantities of insulin in to the culture medium than 'special cells' (rat pancreatic cells). Differences in insulin secretion between cultures of 'special cells' and pig pancreatic cells may be related to the type of cell in question, or they may have been artifactual, due to the antibody (a pig insulin antibody from the guinea pig) used which may have been less sensitive to rat insulin. Parallel measurements of 'special cell' culture media with different lots of antibody did yield differences in insulin levels.

The ratio of the amount of insulin in the cell extract to the amount released into the culture medium is similar for the two cell types from the 3rd day in vitro, i.e. low insulin content in the extracts is accompanied by high insulin secretion. At no time during culture was this high insulin secretion matched by a corresponding decline in the amount of insulin in the cell extracts, when the preparation of cell extracts yielded quantitative amounts of insulin. This result indicated that insulin is produced from a precursor or de novo.

After each change of culture medium (at intervals of 72 hrs or less) both 'special cells' and pig pancreatic cells reacted by secreting very large amounts of insulin. This can be explained by the concentration gradient between cell and culture medium (which contained no insulin at the time of addition; the insulin content of the nutrient medium with 10 % fetal calf serum was gener-

il 20 %. Non si sa ancora fino a che punto si debba tener conto di questa decomposizione dell'insulina nelle colture in accrescimento.

DISCUSSIONE

Ad integrazione delle nostre prime ricerche (HILWIG e Coll.⁶), nel presente lavoro vengono riportati i risultati di esperimenti condotti su cellule pancreatiche di maiale, le quali liberano nel mezzo di coltura quantità di insulina superiori rispetto alle « cellule speciali » (cellule pancreatiche di ratto). Le differenze tra le colture di « cellule speciali » e quelle di cellule pancreatiche di maiale, per quanto riguarda la secrezione insulinica, possono essere messe in relazione con il tipo cellulare o con artefatti legati agli anticorpi usati (anticorpi di cavia anti-insulina di maiale), i quali potrebbero essere meno sensibili all'insulina di ratto. Misurazioni parallele eseguite nei mezzi di coltura di « cellule speciali » con differenti lotti di anticorpi hanno messo in evidenza differenze nei livelli di insulina.

Il rapporto tra quantità di insulina nell'estratto cellulare e quantità liberata nel mezzo è simile per i due tipi di cellule, a partire dal 3° giorno dal trasferimento in coltura, e cioè ad un basso contenuto negli estratti corrisponde una elevata secrezione di ormone. In nessun momento durante la coltura questa notevole secrezione si accompagnava a corrispondente diminuzione del contenuto in insulina degli estratti cellulari, quando questi ultimi producevano quantità misurabili di ormone. Ciò indica che l'insulina viene prodotta *de novo* o da un precursore.

Dopo ogni cambiamento del mezzo di coltura (ad intervalli di 72 h o meno), sia le « cellule speciali » che le cellule pancreatiche di maiale reagiscono secernendo grandi quantità di insulina. Ciò può essere spiegato dal gradiente di concentrazione tra cellula e mezzo di coltura (che al momento dell'aggiunta non conteneva insulina; nel mezzo nutritivo contenente siero di feto di vitel-

ally less than 10 $\mu\text{U}/\text{ml}$) or by the fresh supply of raw materials for protein synthesis. The fact that random trials with Hank's salt solution containing 1% albumin did not produce an increase in insulin secretion indicates that the concentration gradient does not influence the level of insulin production unless nutrients are supplied at the same time.

The measured increases in insulin values that we obtained upon dilution of culture media and 'special cell' extracts may indicate the presence of insulin aggregates which dissociate upon dilution. According to LAWRENCE and KIRSTEINS¹¹ the dilution effect may indicate the presence of proinsulin. They found that increasing dilution of serum from a patient with islet adenoma was accompanied by increasing insulin levels. They obtained the same results by adding proinsulin to normal sera and they believe that proinsulin is responsible for this dilution effect. Provided the dilution effect actually indicates the presence of proinsulin, we assume that 'special cells' possess only a limited ability to store proinsulin/insulin, since the amount of these substances in the cell extract fluctuated only a little despite variations in the amount released (from the 3rd to the 7th day *in vitro*). On the other hand, it is possible that some metabolic change which occurs during culture *in vitro* causes the 'special cells' to lose some of their ability to degrade proinsulin to insulin (blockage or absence of proteolytic enzymes).

In contrast, dilution of samples from pig pancreatic cell cultures was not generally followed by an increase of insulin content, from which one might conclude that in these cells degradation of proinsulin to insulin is affected. There

lo al 10%, il contenuto in ormone era generalmente inferiore a 10 $\mu\text{U}/\text{ml}$) o dal nuovo apporto di materiale grezzo per la sintesi di proteine. Il fatto che in esperimenti randomizzati con soluzione salina di Hank contenente l'1% di albumina non si avesse alcun aumento della secrezione insulinica indica che il gradiente di concentrazione non influenza la produzione dell'ormone, a meno che non vengano contemporaneamente fornite sostanze nutritive.

Gli aumenti dei valori dell'insulina, da noi ottenuti con la diluizione dei mezzi di coltura e degli estratti delle « cellule speciali », possono essere indicativi della presenza di aggregati di insulina che si dissociano con la diluizione. Secondo LAWRENCE e KIRSTEINS¹¹, l'effetto della diluizione può indicare la presenza di proinsulina. Questi AA. hanno osservato che la diluizione crescente del siero di un paziente portatore di adenoma insulare si accompagnava a progressivo aumento dei livelli di insulina. Gli stessi risultati venivano ottenuti per l'aggiunta a sieri normali di proinsulina, da essi ritenuta pertanto responsabile di questo effetto della diluizione. Se l'effetto della diluizione sta effettivamente ad indicare la presenza di proinsulina, noi riteniamo che le « cellule speciali » posseggano soltanto in misura limitata la capacità di immagazzinare proinsulina/insulina, dal momento che la quantità di queste sostanze nell'estratto cellulare si modificava di poco, nonostante le variazioni della quantità liberata (dal 3° al 7° giorno di coltura). D'altro canto, è possibile che alcune alterazioni metaboliche che intervengono nel corso della coltura *in vitro* provochino la perdita, da parte delle « cellule speciali », di parte della loro capacità di degradare la proinsulina ad insulina (blocco od assenza di enzimi proteolitici).

Al contrario, la diluizione di campioni provenienti da colture di cellule pancreatiche di maiale non è generalmente seguita da aumento del contenuto insulinico, per cui si potrebbe concludere che in queste cellule venga influenzata

are also morphological differences between the *in vitro* pancreatic cells of the two animal species. Whereas the rat pancreatic cells are transformed into 'special cells' (HILWIG *et al.*⁶), the pig pancreatic cells retain the form they first had when placed *in vitro* (unpublished experiments).

To exclude the possibility that the substances released from our pancreatic cell cultures are merely metabolic products which behave immunologically like insulin, we cultured rat fibroblasts with added insulin (50-500 μ U/ml). Dilution of these culture media did not produced an increase in insulin content.

These permanent cell lines and primary cultures consume insulin during their growing periods. The rate of insulin consumption depends on their more or less vigorous growth. A corresponding insulin consumption must also be assumed in the case of pancreatic cells *in vitro*. This suggests that the amount of insulin actually released by these cells may be higher than the values measured in the nutrient medium, as a result of combined insulin secretion and insulin consumption. The addition of heterologous insulin to the medium disturbs this equilibrium.

The assessment of the effect of added extracellular (porcine) insulin on the insulin release of 'special cells' was based on the so-called theoretical insulin levels [the amount of extracellular insulin added plus the amount released by control (untreated) cells]. If the levels measured in 'special cell' culture media do not attain these 'theoretical values' insulin secretion must be inhibited, provided the cells consume insulin at a nearly constant rate. Concerning the mechanism of this feedback regulation, SODOYEZ *et al.*¹⁹ write: 'Insulin decreased the level of cAMP in the B-cells by regulating the activity of phosphodiesterase'. Our results support the observations of HELLMAN⁵, FRERICHS

la degradazione della proinsulina ad insulina. Tra le cellule pancreatiche *in vitro* delle due specie animali esistono anche differenze morfologiche. Mentre le cellule di ratto si trasformano in « cellule speciali » (HILWIG e Coll.⁶), quelle di maiale conservano la forma che avevano all'inizio (ricerche inedite).

Per escludere la possibilità che le sostanze liberate dalle nostre colture di cellule pancreatiche altro non fossero che prodotti metabolici dotati di un comportamento immunologico simile a quello dell'insulina, abbiamo coltivato fibroblasti di ratto con aggiunta di insulina (50-500 μ U/ml); la diluizione di questi mezzi di coltura non determinava alcun aumento del contenuto in ormone.

Queste linee cellulari permanenti e colture primarie consumano insulina durante i periodi di accrescimento; l'entità del consumo insulinico dipende dalla crescita più o meno vigorosa. Si deve ammettere che un corrispondente consumo di insulina si verifichi anche nel caso di cellule pancreatiche *in vitro*. Ciò suggerisce che la quantità di insulina effettivamente liberata da queste cellule possa essere maggiore di quanto non esprimano i valori misurati nel mezzo nutritivo, che rappresentano la risultante della secrezione e del consumo. L'aggiunta al mezzo di insulina eterologa altera questo equilibrio.

L'accertamento dell'effetto dell'aggiunta di insulina extracellulare (porcina) sulla liberazione di ormone da parte delle « cellule speciali » si basa sui cosiddetti livelli insulinici teorici (quantità di insulina extracellulare aggiunta più quantità liberata dalle cellule di controllo non trattate). Se i livelli misurati nel mezzo di coltura delle « cellule speciali » non raggiungono questi « valori teorici », la secrezione insulinica deve essere inibita, a condizione che le cellule consumino insulina ad un ritmo quasi costante. A proposito di questo meccanismo di regolazione *feedback*, SODOYEZ e Coll.¹⁹ scrivono: « L'insulina diminuiva i livelli di AMP ciclico nelle cellule B, regolando l'attività del-

*et al.*², LOUBATIÈRES¹², BODER *et al.*¹, KIZER and BRESSLER¹⁰, IVERSEN and MILES⁸, HAHN and MICHAEL⁴ and are in contrast with those of GRODSKY *et al.*³ and MALAISSE *et al.*¹⁴, who did not observe an effect on insulin release after adding extracellular insulin. All these workers used different experimental methods (perfused pancreas, isolated islets and pancreatic sections of various animal species). The concentration of added insulin varied over a wide range (50 μ U/ml to 4 mU/ml). These differences in method explain the variations in experimental results.

We were unable to determine absolute inhibitory concentrations. We assume that they depend on the growth rate or on the metabolic condition of the cells. When the cells' own insulin secretion rate is high, inhibition does not occur until the concentration of heterologous insulin reaches a correspondingly high level.

CONCLUSIONS

Rat and pig pancreatic cells cultured in vitro release varying quantities of immunologically measurable insulin into the nutrient medium. The insulin content of the nutrient medium is a function of the insulin released and the insulin consumed by these cells. The insulin content of the cell extracts remains nearly constant during this time, indicating insulin synthesis.

Every change of nutrient medium stimulates insulin release. The addition of heterologous insulin to the nutrient medium disturbs the correlation between insulin release and insulin consumption. Assuming that the 'special cells' consume insulin at a constant rate, the added heterologous insulin inhibits insulin release to an increasing

la fosfodiesterasi». I nostri risultati concordano con le osservazioni di HELLMAN⁵, FRERICHS e Coll.², LOUBATIÈRES¹², BODER e Coll.¹, KIZER e BRESSLER¹⁰, IVERSEN e MILES⁸, HAHN e MICHAEL⁴, mentre sono in contrasto con quelle di GRODSKY e Coll.³ e di MALAISSE e Coll.¹⁴, i quali non hanno osservato, dopo aggiunta di insulina extracellulare, alcun effetto sulla liberazione dell'ormone. Tutti questi AA. hanno impiegato differenti metodi sperimentali (pancreas perfuso, isole pancreatiche isolate, sezioni pancreatiche di diverse specie animali). La concentrazione dell'insulina aggiunta variava in un vasto ambito (da 50 μ U/ml a 4 mU/ml). Queste differenze metodologiche spiegano le variazioni nei risultati sperimentali.

Non siamo riusciti a determinare le concentrazioni inibitrici assolute e riteniamo che esse dipendano dalla velocità di accrescimento o dallo stato metabolico delle cellule. Quando la secrezione insulinica propria delle cellule è elevata, l'inibizione non si verifica fino a quando la concentrazione di ormone eterologo non raggiunge livelli corrispondenti elevati.

CONCLUSIONI

Le cellule pancreatiche di ratto e di maiale coltivate *in vitro* liberano nel mezzo nutritivo quantità variabili di insulina, misurabili immunologicamente. Il contenuto in insulina del mezzo nutritivo è una funzione dell'ormone liberato e di quello consumato da queste cellule. Durante questo periodo, il contenuto in insulina degli estratti cellulari rimane quasi costante, e ciò esprime la sintesi dell'ormone.

Ogni cambio del mezzo nutritivo stimola la liberazione di insulina. L'aggiunta di ormone eterologo al mezzo nutritivo altera il rapporto tra liberazione e consumo di insulina. Ammettendo che le « cellule speciali » consumino insulina ad un ritmo costante, l'insulina eterologa aggiunta inibisce la liberazione dell'ormone in misura proporzionale

degree with increasing duration of treatment and insulin concentration.

Apart from organ cultures of islets of Langerhans (MURRELL¹⁸, VECCHIO²⁰), monolayer cultures of insulin-producing cells supply the only model which allows experiments to continue not only for hours but even for days. Moreover, with this model it is possible to conduct morphological analyses during the course of the experiment.

alla durata del trattamento e alla concentrazione insulinica.

A parte le organo-culture di cellule di Langerhans (MURRELL¹⁸, VECCHIO²⁰), le colture monostratificate di cellule insulinoprodottrici rappresentano il solo modello che permette di eseguire esperimenti della durata non soltanto di ore, ma anche di giorni. Inoltre, con questo modello è possibile praticare indagini morfologiche nel corso dell'esperimento.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Heptner and his associate, Miss Seber, for carrying out the numerous determinations of insulin.

I would like to thank Mrs. Ines Hehle, Miss Heidi von Kalinowski and Miss Edith Leschinski for the excellent assistance they provided.

RIASSUNTO

Oggetto del presente lavoro è la secrezione insulinica da parte di colture monostratificate di tessuto pancreatico di ratti adulti e di maiali neonati. La quantità di ormone liberata diminuisce con l'aumentare dell'età delle cellule in accrescimento *in vitro*. Il contenuto in insulina del mezzo nutritivo è una funzione dell'ormone secreto e di quello metabolizzato dalle cellule. La quantità di insulina liberata durante il periodo della crescita *in vitro* dipende dalla frequenza con cui il mezzo nutritivo viene rinnovato. L'aggiunta di insulina eterologa al mezzo di coltura influenza — cioè inibisce — la liberazione insulinica, a condizione che le cellule consumino l'ormone ad un ritmo costante. Secondo la nostra opinione, le concentrazioni inibitrici dipendono dallo stato metabolico delle cellule *in vitro*.

RÉSUMÉ

Cette étude a pour objet d'étudier la sécrétion insulinique par des cultures monostratifiées de tissu pancréatique chez des rats adultes et des porcs nouveau-nés. La quantité d'hormone dégagée diminue à mesure qu'augmente l'âge des cellules croissant *in vitro*. La teneur en insuline dans le milieu nutritif est fonction de l'hormone secrétée et de l'hormone métabolisée par les cellules. La quantité d'insuline libérée pendant la croissance *in vitro* tient à la fréquence avec laquelle le milieu nutritif est renouvelé. L'addition d'insuline hétérologue au milieu de culture influence — inhibe — le dégagement de l'insuline, à la condition que les cellules utilisent l'hormone à un rythme constant. A notre avis, les concentrations inhibitoires dépendent de l'état métabolique des cellules *in vitro*.

RESUMEN

El objeto del presente trabajo es el estudio de la secreción insulínica por parte de cultivos monoestratificados de tejido pancreático de ratas adultas y de suinos recién nacidos. La cantidad de hormón liberado disminuye con el aumento de la edad de las células en desarrollo *in vitro*. El contenido de insulina del medio nutritivo es una función del hormón segregado y del metabolizado por las células. La cantidad de insulina liberada durante el período de crecimiento *in vitro* depende de la frecuencia con que se renueva el medio nutritivo. La agregación de insulina heteróloga respecto al medio de cultivo influencia — es decir, inhibe — la liberación insulínica, a condición de que las células vayan consumiendo el hormón a un ritmo constante. Según nuestra opinión las concentraciones inhibitorias dependen del estado metabólico de las células *in vitro*.

ZUSAMMENFASSUNG

Objekt der gegenwärtigen Untersuchung ist die Insulinsekretion seitens *Monolayer*-Kulturen aus Pankreasgewebe von erwachsenen Ratten und neugeborenen Schweinen. Die Menge an freigesetztem Hormon nimmt mit zunehmendem Alter der *in vitro* wachsenden Zellen ab. Der Insulingehalt des Nährmittels steht in Bezug zum sezernierten und zu dem von den Zellen metabolisierten Hormon. Die freigesetzte Insulinmenge während der Wachstumsphase *in vitro* hängt von der Frequenz ab, mit der das Nährmittel erneuert wird. Der Zusatz von heterologem Insulin zum Kulturmittel beeinflusst — d.h. hemmt — die Insulinfreisetzung unter der Bedingung dass die Zellen das Hormon mit konstantem Rhythmus verbrauchen. Nach unserer Meinung hängen die hemmenden Konzentrationen vom metabolischen Zustand der Zellen *in vitro* ab.

SUMMARY

This article deals with the insulin secretion of monolayer cultures of pancreatic tissue of adult rats and newborn pigs. The amount of insulin released diminishes with increasing age of the cells growing *in vitro*. The insulin content of the nutrient medium is a function of the insulin released and the insulin metabolised by the cells. The amount of insulin yielded during the growth period *in vitro* depends on the frequency with which the nutrient medium is changed. Adding heterologous insulin to the culture medium influences, i.e. inhibits, insulin release, provided the cells consume insulin at a constant rate. The inhibitory concentration (we assume) depends on the metabolic condition of the cells *in vitro*.

REFERENCES

- 1) BODER G.B., ROOT M. A., CHANCE R. E., JOHNSON I. S.: Extended Production of Insulin by Isolated Rabbit Pancreatic Islets: Evidence for Biosynthesis of Insulin - Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 131, 507, 1969.
- 2) FRERICHS H., CREUTZFELDT C., CREUTZFELDT W.: Inhibitors of Insulin Secretion - In: LEVINE R., PFEIFFER E. F. (Eds): Mechanism and Regulation of Insulin Secretion. Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1968 - Acta diabet. lat. 5 (Suppl. 1), 105, 1968.
- 3) GRODSKY G. M., CURRY C. L., BENNETT L. L., RODRIGO J. J.: Factors Influencing Different Rates of Insulin Release in Vitro - In: LEVINE R., PFEIFFER E. F. (Eds): Mechanism and Regulation of Insulin Secretion. Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1968 - Acta diabet. lat. 5 (Suppl. 1), 140, 1968.
- 4) HAHN H. J., MICHAEL R.: Inhibition of Insulin Release by Endogenous Insulin in Vitro - Hormone metab. Res. 2, 119, 1970.
- 5) HELLMAN B.: Histochemical Observations of the β -cells during Insulin Secretion - In: LEVINE R., PFEIFFER E. F. (Eds): Mechanism and Regulation of Insulin Secretion. Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1968 - Acta diabet. lat. 5 (Suppl. 1), 446, 1968.
- 6) HILWIG I., SCHUSTER S., HEPTNER W., WASIELEWSKI E. V.: Über das Wachstum der Pankreaszellen von Säugetieren als Monolayer Cultures. I. Züchtungsmethode, Morphologie und Insulingehalt - Z. Zellforsch. 90, 333, 1968.
- 7) HILWIG I., VRBANEC S.: Über das Wachstum der Pankreaszellen von Säugetieren als Monolayer Cultures. III. Beeinflussung der Insulinsekretion durch Coffein und Glucose - Z. Zellforsch. 103, 410, 1970.
- 8) IVERSEN J., MILES D. W.: Evidence for a Feed-Back Inhibition by Insulin in Physiological Concentrations of Insulin Secretion in the Isolated Perfused Canine Pancreas - 7th Congr. Int. Diabetes Fed., Buenos Aires 1970. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1970; p. 11, abstract no. 24.
- 9) KERP L., STEINHILBER S., KASEMIR H.: Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption - Klin. Wschr. 44, 560, 1966.
- 10) KIZER J. S., BRESSLER R.: Drugs and the Mechanism of Insulin Secretion - In: GARRATINI S. (Ed.): Advances in Pharmacology and Chemotherapy Academic Press, New York, 1969; vol. 7, p. 91.
- 11) LAWRENCE A. M., KIRSTEINS L.: The Effect of Proinsulin on the Immunoassay of Insulin and its Possible Relation to States of Hyperinsulinemia - Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 131, 1142, 1969.
- 12) LOUBATIÈRES A.: Stimulators and Inhibitors of Insulin Secretion, Physiological and Pharmacological Interferences, Synergisms and Antagonisms - In: LEVINE R., PFEIFFER E. F. (Eds): Mechanism and Regulation of Insulin Secretion. Casa Ed. « Il Ponte », Milano, 1968 - Acta diabet. lat. 5 (Suppl. 1), 220, 1968.

- 13) MACCHI I. A., BLAUSTEIN E. H.: Cytostructure and Endocrine Function of Monolayer Cultures of Neonatal Hamster Pancreas - *Endocrinology* 84, 208, 1969.
- 14) MALAISSE W. J., MALAISSE-LAGAE F., LACY P. E., WRIGHT P. H.: Insulin Secretion by Isolated Islets in Presence of Glucose, Insulin and Anti-Insulin Serum - *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 124, 497, 1967.
- 15) MEADE R. C., KLITGAARD H. M.: A Simple Method for Immunoassay of Human Serum Insulin - *J. nucl. Med.* 3, 407, 1962.
- 16) MOORE S., STEIN W. H.: A Modified Ninhydrin Reagent for the Photometric Determination of Amino Acids and Related Compounds - *J. biol. Chem.* 211, 907, 1954.
- 17) MOSKALEWSKI S.: Isolation and Culture of the Islets of Langerhans of the Guinea Pig - *Gen. comp. Endocr.* 5, 342, 1965.
- 18) MURRELL L. R.: Mammalian Pancreatic Islet Tissue in Organ Culture, I. Methods of Culture and in Vitro Histogenesis - *Exp. Cell Res.* 41, 350, 1966.
- 19) SODOYEZ J. C., SODOYEZ-GOFFAUX F., FOÀ P. P.: Feedback Regulation of Insulin Secretion by Insulin. Role of 3',5'-Cyclic AMP - In: FALKMER S., TÅLJEDAL I.-B., HELLMAN B. (Eds): *Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets* - Pergamon Press, Oxford, 1970; p. 445.
- 20) VECCHIO D.: Culture d'explants pancréatiques foetaux de rat: application à l'étude des cellules insulino-productrices du pancréas - Thèse no. 1418, Genève 1967.

Requests for reprints should be addressed to:

INGEBORG HILWIG
Farbwerke Hoechst AG
Gewebezüchtung H 811
 6230 Frankfurt/M. - Hoechst - Bundesrepublik Deutschland

Traduzione a cura di G. U.