



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

인슐린 유도 저혈당증이 생쥐 뇌의
신경변성 연관 단백질에 미치는 영향

Effects of Insulin-Induced Hypoglycemia on
Neurodegeneration-Associated Proteins
in the Mouse Brain

울산대학교 대학원

의과학과

김윤미

인슐린 유도 저혈당증이 생쥐 뇌의
신경변성 연관 단백질에 미치는 영향

지도교수 이 주 영

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2023 년 08 월

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 윤 미

김윤미의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 황 온 유 (인)

심사위원 황 정 진 (인)

심사위원 이 주 영 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2023 년 08 월

감사의 글

막연하게 연구원의 꿈을 가지고 서울에 올라온 저를 반갑게 맞아주시고, 연구원으로 성장할 기회를 제공해 주신 이주영 교수님께 감사의 뜻을 표합니다. 교수님의 지도로 많은 것을 배우고 성장할 수 있었으며, 그 과정에서 저는 교수님의 존중과 배려를 느꼈습니다. 교수님께서 저의 의견과 생각을 늘 존중해 주신 덕에 자신감을 갖고 새로운 아이디어를 제시하고 논의할 수 있었습니다. 정말 감사드립니다.

또한, 논문 수정 과정 동안 세밀하게 검사해 주시고, 더 나은 논문이 될 수 있도록 마지막까지 신경 써주신 황은유 교수님께 감사의 말씀을 전합니다. 역시 논문 수정에 힘써주시고, 심사 이후에도 연구 방법에 대해 가르쳐 주시고 궁금증을 해결해 주신 황정진 교수님께 감사드립니다.

그리고 실험실 생활 동안 도움을 요청할 때면 흔쾌히 도와주고, 언제나 옆에서 힘이 돼주었던 최수연에게 감사를 전합니다. 덕분에 저의 석사과정은 재밌고 행복한 기억으로 남을 수 있었습니다.

마지막으로 연구원으로 새로운 도전을 하는 것에 대해 걱정하시면서도, 저를 믿고 지지해 주신 부모님께 진심으로 감사드립니다. 부모님의 믿음에 보답하기 위해 끊임없이 발전해 나가는 자랑스러운 딸이 되겠습니다. 그리고 본가를 오갈 때 군말 없이 마중 나와주고, 내심 걱정과 응원해 주는 오빠에게 감사합니다.

이외에도 많은 사람의 도움으로 학위를 성공적으로 마무리할 수 있었습니다. 학위과정은 저에게 값진 경험이었고, 이 경험을 바탕으로 더 나은 연구원으로 성장해 나가겠습니다. 응원해 주신 모든 분께 감사드립니다.

국문 요약

저혈당증(hypoglycemia)은 혈중 포도당 농도(level of blood glucose) 55 mg/dL 미만, 악성 저혈당증(severe hypoglycemia)은 40 mg/dL 미만으로 정의한다. 악성 저혈당증은 간질발작(epileptic seizures)과 혼수(coma) 증상을 동반하며 과민성, 인지기능 장애, 국소적인 신경 기능 결함 등을 유발할 수 있고, 바로 포도당을 공급하지 않으면 사망 할 수 있다. 또한, 뇌조직이나 신경세포에서 산화 스트레스(oxidative stress), 염증반응(inflammation), 미토콘드리아 기능 이상(mitochondrial dysfunction) 등을 유발하여 신경변성(neurodegeneration)을 일으켜 신경 기능에 영향을 끼칠 수 있다.

이 연구에서는 악성 저혈당증이 뇌의 신경변성 연관 단백질에 미치는 영향을 조사했다. 인슐린 유도 악성 저혈당증(insulin-induced severe hypoglycemia) 모델을 만들기 위해 C57BL/6 생쥐에 인슐린(insulin) 10 IU/kg을 복강 투여했다. 그 결과, 혈중 포도당 농도는 3시간 이내에 10 mg/dL 미만으로 떨어지고 유사 간질발작과 혼수가 나타났다. 이 생쥐의 뇌조직에 대한 TSQ [N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide] 염색으로 해마(hippocampus)의 태상섬유(mossy fiber)에서 시냅스 아연의 감소를, acid fuchsin 염색으로 대뇌피질(cortex)과 해마의 CA3 부위에서 신경세포 죽음(neuronal death)을 관찰했다. 신경세포 죽음은 신경활성, 에너지 대사, 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능, 염증반응 등의 이상으로 나타날 수 있어 이와 관련된 단백질 변화를 조사한 결과, 신경 활성, 시냅스 활성 관련 단백질과 에너지원 수송체 단백질 양이 감소했다. 이는 악성 저혈당증이 유발되면 신경세포와 시냅스 활성이 감소하고, 에너지 수송 이상으로 인한 에너지 대사 교란 가능성이 있음을 의미한다. 또한 미토콘드리아 기능 조절 단백질, 항산화 관련 단백질, 염증반응 관련 단백질의 변화를 통해, 악성 저혈당증은 미토콘드리아의 구조적 변화와 전자전달계에 영향을 줄 수 있으며 항산화 기능을 저하시키고 염증반응을 야기할 수 있

다고 생각된다.

따라서, 악성 저혈당증이 유발되면 뇌의 신경변성 연관 단백질의 양적 변화가 나타나고, 최종적으로 신경세포가 죽어 신경 기능의 이상을 일으키는 것으로 추정된다.

중심어: 저혈당증, 인슐린, 간질발작, 신경변성, 신경세포 죽음

차례

국문요약.....	i
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	4
1. 실험동물	
2. 악성 저혈당증 모델 제작 및 평가	
3. 혈당 측정	
4. 뇌조직 처리	
5. 단백질 추출	
6. 단백질 정량 및 western blot	
7. TSQ 염색	
8. Acid fuchsin 염색	
9. 통계	
III. 결과.....	8
1. 인슐린 유도 악성 저혈당증 평가	
2. 악성 저혈당증에 의한 신경 활성 억제 및 시냅스 아연 변화	
3. 악성 저혈당증에 의한 에너지원 수송체 단백질 변화	
4. 악성 저혈당증에 의한 항산화 연관 단백질 감소	
5. 악성 저혈당증에 의한 미토콘드리아 기능 조절 단백질 변화	
6. 악성 저혈당증에 의한 염증반응 단백질 증가	
IV. 고찰 및 결론.....	12
참고문헌.....	15
Abstract.....	21

그림 목차

Table 1.	Primary antibodies used for western blot assay.	23
Figure 1.	Protocol of insulin-induced severe hypoglycemia.	24
Figure 2.	Impact of insulin on the levels of blood glucose and behavior.	25
Figure 3.	Hippocampus and cortex pyramidal cells stained by TSQ and acid fuchsin.	26
Figure 4.	Reduction of neuronal and synaptic activity in severe hypoglycemia.	27
Figure 5.	Change in MCTs proteins in severe hypoglycemia.	28
Figure 6.	Change in GLUTs proteins in severe hypoglycemia.	29
Figure 7.	Change in MPCs proteins in severe hypoglycemia.	30
Figure 8.	Diagram depicting changes in levels of GLUTs, MCTs, MPCs in severe hypoglycemia.	31
Figure 9.	Decreased anti-oxidant capacity in severe hypoglycemia.	32
Figure 10.	Mitochondrial dysfunction and mitochondrial fission in severe hypoglycemia. .	33
Figure 11.	Increased inflammation severe hypoglycemia.	34

I. 서론

저혈당증(hypoglycemia)은 인슐린(insulin) 치료를 반복적으로 받는 당뇨병 환자들에게 종종 나타나는 부작용이다^[1]. 저혈당증은 혈중 포도당 농도 55 mg/dL 미만인 상태로 정도에 따라 과민성, 국소적 신경 결함 등을 일으킨다. 혈중 포도당 농도가 40 mg/dL 미만일 경우 악성 저혈당증(severe hypoglycemia)으로 분류하며^[2, 3], 간질발작(epileptic seizures)과 혼수(coma) 증상이 나타나고 심하거나 반복되면 신경세포 죽음을 초래해 인지 기능 장애를 유발할 수 있다^[4, 5]. 악성 저혈당증이 나타난 즉시 포도당을 공급하지 않으면 사망으로 이어질 수 있다^[3].

뇌는 포도당(glucose; Glu)을 기본적인 에너지원(primary energy source)으로 삼아 에너지 대사를 통해 ATP를 얻는다. 포도당은 포도당 수송체(glucose transporters; GLUTs)를 이용하여 세포 내부로 흡수되고 해당과정(glycolysis)을 거쳐 피루브산(pyruvate; Pyr)으로 전환된다. 이후, 미토콘드리아의 피루브산 수송체(mitochondrial pyruvate carriers; MPCs)를 통해 미토콘드리아로 들어가 TCA (Tricarboxylic acid) 회로와 전자전달계(electron transport chain; ETC)를 거쳐 ATP를 얻는다^[6]. 그러나 오래 굶거나 격렬한 운동으로 저혈당증이 나타나면 뇌는 포도당 대신 대체 에너지원(alternative energy source)으로 모노카복실산(monocarboxylate)에 의존해 에너지를 얻는다^[7, 8].

모노카복실산에는 젖산(lactate; Lac), 피루브산, 케톤체(ketone body) 등이 있고 포도당과는 다른 대사 경로로 ATP를 생성한다. 젖산은 혈액을 통해 흡수되거나, 성상세포-뉴런 젖산 셔틀(astrocyte-neuron lactate shuttle; ANLS)을 통해 신경세포(neurons)로 들어가 ATP 생산에 쓰인다^[9]. 즉, 혈액에서 GLUT1을 통해 성상세포(astrocytes)로 들어온 포도당은 피루브산을 거쳐 젖산으로 대사된 후, 모노카복실산 수송체(monocarboxylate transporters; MCTs)를 거쳐 신경세포로 전달된다. 이어 신경세포 내에서 젖산은 피루브산

으로 다시 전환된 후, MPCs를 통해 미토콘드리아 안으로 들어가 TCA 회로를 거쳐 전자 전달계를 통해 ATP를 얻는다^[10].

따라서 에너지원과 에너지 대사산물 수송에 관여하는 수송체 단백질은 크게 포도당 수송체와 모노카복실산 수송체로 구분되며, 뇌조직이나 신경세포에 다양하게 발현, 분포한다. 포도당 수송체는 14개의 단백질군으로 구성되며^[11], 뇌에서는 주로 GLUT1, GLUT3, GLUT4가 발현된다. GLUT1은 주로 혈관장벽(blood brain barrier; BBB)의 막과 혈관내피세포(endothelial cells), 성상세포에 위치하고, GLUT2, GLUT3, GLUT4는 신경세포에 위치한다^[12, 13, 14]. 모노카복실산 수송체는 14개의 단백질군으로 구성되며, 그 중 MCT1은 뇌의 혈관내피세포와 성상세포, 희돌기세포(oligodendrocytes)에서 발현되며, MCT2은 신경세포에서, MCT4는 해마(hippocampus; Hp)의 성상세포에서 발현된다(Fig. 8)^[15, 16]. MCT1, MCT2, MCT4, GLUT4는 장기 기억 형성과 인지 기능에 중요한 역할을 한다고 알려졌다^[17, 18, 19, 20].

최종적으로 ATP를 생산하는 미토콘드리아는 내막이 접힌 구조(cristae)로 ATP 합성에 유리하며^[21], 세포 생존에 필수적이다^[22]. 내막 구조는 융합(fusion)과 분열(fission)을 제어하는 여러 단백질에 의해 조절되고^[23], 미토콘드리아 역학(dynamics) 변화는 산화 스트레스 영향을 받는다^[24, 25]. 미토콘드리아 기능 이상(mitochondria dysfunction)이 나타나면 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되어 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하고, 염증복합체(inflammasome)에 의해 면역반응이 활성화되어 염증반응(inflammation)이 나타난다^[22, 26, 27]. 또한 전자전달계와 미토콘드리아 역학에 혼란을 주며, 결국 신경변성 및 질병을 유발한다^[28]. 선행연구에 의하면 악성 저혈당증이 유발되면 미토콘드리아의 세포호흡 과정에 영향을 끼쳐 에너지 대사 활성 변화가 나타난다^[29, 30]. 또한, 염증반응과 산화 스트레스가 증가하는 반면, 항산화 기능은 감소한다^[30, 31].

따라서 악성 저혈당증은 다양한 대사 변화, 뇌의 태상섬유(mossy fiber)의 시냅스 아연(synaptic zinc) 변화를 초래하고^[32], 신경세포 죽음 또는 여러 신경병증(neuropathology) 유발 신호 경로를 자극해 인지 기능 장애와 치매 발병의 위험을 높일 수 있다^[3, 33, 34].

이 연구에서는 12-16주령의 C57BL/6 생쥐로 인슐린 유도 악성 저혈당증 모델을 만들어 악성 저혈당증이 행동 변화와 에너지 대사, 항산화 기능, 미토콘드리아 기능 조절, 염증반응과 관련된 단백질의 양적 변화와 신경세포 죽음을 유발할 수 있는지 관찰했다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

12-16주령의 C57BL/6 생쥐(체중 23-25 g)를 사용했으며, 이 실험은 아산생명과학연구소의 동물실험실 관리 및 사용에 대한 지침 및 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다. 동물은 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 명암주기의 SPF (specific pathogen free) 시설에서 물과 먹이를 충분히 공급하며 사육했다.

2. 악성 저혈당증 모델 제작 및 평가

C57BL/6 생쥐를 대조군 그룹($n = 6$)과 인슐린 유도 악성 저혈당증 유도 그룹($n = 6$)으로 나누었다. 대조군은 1% HCl (Fluka Chemie GmbH, Switzerland; in 0.9% NaCl)을 복강 내에 투여하고, 악성 저혈당증 유도 그룹은 인슐린(Merck, USA; 10 IU/kg; in 1% HCl)을 투여했다^[35]. 인슐린 투여 6시간 후에 먹이를 주어 회복시켰다. 인슐린 투여 전 모든 군은 18시간 공복 상태를 유지하였고, 인슐린 투여 48시간 후 희생시킬 때까지 생쥐의 행동변화를 kainate 유도 간질발작 생쥐 모델 행동양상을 기준으로 하여 관찰했다(Fig. 1)^[35].

3. 혈당측정

인슐린 투여 24시간 전, 3시간 전에 각각 악성 저혈당증 유도 그룹과 대조군의 생쥐 꼬리 혈액을 채혈침으로 채혈한 후, 혈당측정기(SD Biosensor, Korea)를 이용하여 혈중 포도당 농도를 측정했다. 이후, 인슐린 투여 3시간, 24시간 및 48시간 후 혈중 포도당 농도를 측정했다.

4. 뇌조직 처리

인슐린 투여 48시간 후 경추 탈골하여 동물을 희생시켰고, 신속하게 뇌를 잘라서 좌뇌, 우뇌로 나눠 액체질소에 냉동시켰다. 좌뇌 조직은 면역 조직 화학적 분석을 위하여 동결절편기(cryostat; Leica Biosystems, Germany)를 이용해 두께 12 μm 의 시상면(sagittal) 절편을 얻었고, poly-L-lysine (Merck, USA) 코팅된 슬라이드에 붙여 -80°C 의 냉동고에 보관했다.

5. 단백질 추출

우뇌조직은 인산가수분해효소 억제제(phosphatase inhibitor; 1.0 mmol/L sodium orthovanadate, 5.0 mmol/L sodium fluoride, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate)와 PRO-PREP™ Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 1:20 비율로 혼합한 lysis buffer가 담긴 튜브에 담아 homogenizer (IKA works, Germany)로 균질화했다. 이후, 초음파 분쇄기(sonicator)로 파쇄하고 원심분리기(Eppendorf, Germany)를 이용하여 단백질을 분리, 추출하여 분석할 때까지 -80°C 냉동고에 얼려 보관했다.

6. 단백질 정량 및 western blot

추출한 단백질과 BCA protein assay kit (Thermofisher, USA)를 1:25 비율로 희석하여 BSA standard curve를 기준으로 정량했다. 웨스턴 블롯을 위해 단백질 샘플(18 μg)은 sample buffer [62.5 mM tris pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% mercaptoethanol, 50 mM dithiothreitol]에 용해시켜 5분간 끓인 후, 8-15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 분리하고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Cytiva, USA)으로 옮겼다. 비특이적 결합을 막

기 위해 blocking 용액[5% skim milk and 1% bovine serum albumin in TBS-T buffer (pH 7.4; 20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.01% Tween 20)]을 실온에서 1시간 동안 처리하고 1차 항체(Table. 1)와 밤새 반응시킨 후, anti-IgG-HRP (anti-immunoglobulin G-horseradish peroxidase) 2차 항체와 결합시켰다. 이후, ECL 용액(enhanced chemiluminescence solution; Bio-Rad, USA)과 반응시켜 분석용 이미징 장비(Davinch-K, Seoul, Korea)를 이용하여 검출했다. 정량을 위해 Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA)로 각 단백질 밴드의 음영 강도(optical density)를 측정했다.

7. TSQ 염색

시냅스 아연의 양적 변화를 보기 위해 뇌 조직절편을 0.9% NaCl에 적시고, 아연 특이적 형광 염료인 TSQ [N-(6-methoxy-8-quinoly)-p-toluenesulfonamide]를 덮어 어두운 곳에 90초 동안 두었다. 0.9% NaCl로 세척하고 커버글라스를 덮어 UV-2A filter (dichroic mirror, 400 nm; excitation filter, 330–380 nm; barrier filter, 420 nm)를 장착한 형광현미경(ECLIPSE 80i; fluorescence microscope with)으로 관찰했다.

8. Acid fuchsin 염색

세포죽음을 관찰하기 위해 조직 절편을 0.1% acid fuchsin (Merck, USA; in 25 % glacial acetic acid)로 덮어 30초간 염색했다. 이후, 3차 증류수, 70% 에탄올, 100% 에탄올 순으로 세척하고 Histo-Clear (National Diagnostics, USA)에 5분 동안 담겼다. 이어서 Mounting Medium (Vector Laboratories, USA)을 50 μ l 떨어트리고 커버글라스를 덮어 광학현미경(ECLPSE 80i)으로 관찰했다.

9. 통계

데이터는 Prism (GraphPad, USA)을 이용하여 two-tailed unpaired t test, 또는 one-way analysis of variance (ANOVA) with Student-Newman-Keuls *post hoc* test 분석법으로 비교 분석했다. 데이터는 최소 3번 이상의 독립적인 실험에서 구해진 평균값 \pm 표준오차(mean \pm SEM)로 표현하였고, $p < 0.05$ 일 때 비교 그룹 간 유의성이 있는 것으로 판단했다.

III. 결과

1. 인슐린 유도 악성 저혈당증 모델 평가

대조군은 1% HCl, 악성 저혈당증 유도 그룹은 인슐린(10 IU/kg)을 C57BL/6 생쥐에 복강 투여하고^[36], 6시간 후에 먹이를 주어 회복시켰다. 악성 저혈당증이 유발되었는지 검토하기 위해 인슐린 투여 3시간, 24, 48시간 후 혈중 포도당 농도를 측정했다. 공복 전 혈중 포도당 농도 180-220 mg/dL와 비교했을 때, 인슐린 투여 3시간 후 농도는 악성 저혈당증 유도 그룹의 모든 개체에서 10 mg/dL 미만의 수치로 혈당기지에서 측정되지 않았다($p < 0.001$). 그리고 인슐린 투여 24시간 후 농도는 160-180 mg/dL ($p > 0.05$), 48시간 후 농도는 200-220 mg/dL ($p > 0.05$)로 먹이공급 후 점진적으로 회복했다(Fig. 2B). 또한 대조군의 혈중 포도당 농도는 공복 전 농도 160-200 mg/dL와 비교 시, 공복 후에 100-130 mg/dL ($p < 0.05$)으로 감소했지만 공복 후와 1% HCl 투여 3시간 후 농도 간의 차이는 없었다($p > 0.05$). 그리고 먹이 공급 후 점차 회복하여 투여 48시간 후에는 공복 전 농도 수준으로 회복했다(Fig. 2B). 반면에 체중은 대조군과 악성 저혈당증 유도 그룹 모두 먹이 공급 여부로 인해 약간의 변화가 관찰됐지만 약물 투여에 따른 변화는 나타나지 않았다($p > 0.05$)(Fig. 2C).

인슐린 투여 후 악성 저혈당증 동반 증상이 나타나는지 행동 변화를 관찰했다. 인슐린 투여 30분 후 반응 저하(hyporesponsiveness)가 나타나고 1시간 후 꼬리경직(tail extension), 경련(convulsions), 쇼크(shock) 등이 일어났으며 2시간 이후에는 유사 간질발작 증상과 혼수 증상이 지속되었다(Fig. 2A)^[35]. 그러나 먹이 공급 후 24시간 이내에 모두 회복되어 정상과 차이 없이 행동했다.

결과적으로, 인슐린 투여 후 혈중 포도당 농도가 10 mg/dL 미만으로 감소하고, 멍하니 한 곳 쳐다보기, 전신 강직, 혼수 등 사람에서 볼 수 있는 악성 저혈당증 동반 증상과

유사한 증상이 관찰되어 악성 저혈당증 모델이 제대로 구현됐다고 판단했다.

2. 악성 저혈당증에 의한 신경 활성 억제 및 시냅스 아연 변화

악성 저혈당증 모델 생쥐의 뇌조직을 TSQ와 acid fuchsin으로 염색하여 분석했다. TSQ 염색으로 해마 태상섬유의 시냅스 아연의 양이 감소한 것을 보았고(Fig. 3A), acid fuchsin 염색으로 심각한 유사 간질발작 증상 이후 혼수상태에 빠진 일부 개체의 뇌조직에서 대뇌피질(cortex; CTx)과 해마의 CA3 부위에서 신경세포의 죽음을 관찰했다(Fig. 3B). 또한 신경세포의 양을 가늠해볼 수 있는 neuronal nuclear (NeuN), 시냅스 활성화에 관여하는 sirtuin 1 (SIRT1), 시냅스의 안정성과 신경전달 과정을 조절하는 synaptophysin (SYP), postsynaptic density protein 95 (PSD-95), 시냅스 소포 내부의 아연 이온을 수송하는 zinc transporter 3 (ZnT3) 단백질의 양적 변화가 있는지를 웨스턴 블롯을 통해 측정했다. 그 결과, PSD-95 ($p>0.05$)를 제외하고 NeuN ($p<0.001$), SYP ($p<0.001$), ZnT3 ($p<0.05$), SIRT1 ($p<0.001$)은 대조군에 비해 악성 저혈당증 유도 그룹에서 단백질 양이 유의하게 감소했다(Fig. 4).

3. 악성 저혈당증에 의한 에너지원 수송체 단백질 변화

악성 저혈당증으로 인한 에너지 대사 신호분자 관련 단백질 변화를 분석하기 위해 에너지원 수송에 관여하는 포도당 수송체(GLUTs), 모노카복실산 수송체(MCTs), 미토콘드리아 피루브산 수송체(MPCs)에 관해 웨스턴 블롯을 수행했다. 그 결과, 대조군에 비해 악성 저혈당증 유도 그룹에서 MCTs는 MCT1 ($p<0.05$), MCT2 ($p<0.05$), MCT4 ($p<0.05$) 모두 감소했다(Fig. 5). GLUTs는 GLUT1 ($p<0.05$), GLUT3 ($p<0.01$), GLUT4 ($p<0.001$)는 유의하게 감소한 반면, GLUT2 ($p>0.05$)는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 6).

또한, MPCs의 MPC2 ($p < 0.001$)는 단백질 양이 유의하게 감소했지만, MPC1 ($p > 0.05$)은 유의성이 없었다(Fig. 7).

4. 악성 저혈당증에 의한 항산화 기능 감소

뇌신경 항산화 관련 단백질인 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), glutathione peroxidase 4 (GPx4), superoxide dismutase 2 (SOD2)의 발현 변화로 악성 저혈당증이 뇌신경 조직의 항산화 기능에 미치는 영향을 조사했다. 그 결과, 대조군에 비해 악성 저혈당증 유도 그룹에서 GPx4 ($p < 0.05$)가 감소했고, 통계적 유의성은 없었으나 Nrf2 ($p > 0.05$), SOD2 ($p > 0.05$)의 단백질 양이 감소하는 경향이 나타나 항산화 기능이 저하된 것으로 추정했다(Fig. 9).

5. 악성 저혈당증에 의한 미토콘드리아 기능 이상

악성 저혈당증이 전자전달계를 구성하는 cytochrome C (Cyt C), 미토콘드리아 구조 변화 관련 단백질인 mitofusin 2 (MFN2), optic atrophy type 1 (OPA1), phospho-DRP 1 (p-DRP1)의 단백질 양적 변화에 미치는 영향을 조사했다. 분석 결과, 악성 저혈당증 유도 그룹에서 Cyt C ($p < 0.05$)의 단백질 양이 감소했다. 반면에 미토콘드리아 분열을 유발하는 p-DRP1 ($p > 0.05$)과 OPA1 ($p > 0.05$)의 short form 형태의 단백질 양이 증가하고, 유합을 유발하는 MFN2 ($p > 0.05$) 단백질 양은 감소하는 경향을 보였지만 각각 유의성은 없었다(Fig. 10).

6. 악성 저혈당증에 의한 염증반응

악성 저혈당증으로 인한 염증반응을 검토하기 위해 염증 관련 단백질 양 변화를

관찰했다. 성상세포의 양 변화를 볼 수 있는 glial fibrillary acidic protein (GFAP)와 염증 유발 복합체를 형성하는 NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)을 분석한 결과, NLRP3는 유의한 증가를 보이지 않았지만($p>0.05$) GFAP는 유의미하게 증가하여($p<0.05$) 염증반응이 증가한 것으로 추정했다(Fig. 11).

IV. 고찰 및 결론

악성 저혈당증은 인슐린 치료를 받는 당뇨병 환자들에게서 종종 나타나는 부작용이다. 급성 쇼크, 간질발작, 혼수 등을 유발하여 생명을 위협할 수 있으며, 후유 장애로 인지기능 장애, 치매 등 뇌 신경계 기능 이상을 야기한다^[3]. 이 연구는 12-16주령의 C57BL/6 생쥐를 대상으로 대조군과 악성 저혈당증 유도 그룹으로 나누어 실험했으며, 모델에 대한 유효성 평가, 악성 저혈당증으로 인한 신경세포 죽음과 에너지 대사, 산화 스트레스, 미토콘드리아의 기능, 염증반응 연관 단백질의 양적 변화를 조사했다.

인슐린 투여 3시간 후 혈중 포도당을 측정했을 때 10 mg/dL 미만의 수치를 보인 악성 저혈당증 유도 그룹에서는 강직, 경련, 발작, 혼수, 유사 간질발작 증상이 나타났다. 이는 사람에서 나타나는 악성 저혈당증 동반 신경계 증상과 유사하여 인슐린 유도 악성 저혈당 생쥐모델이 제대로 구현돼 이 연구에 유용함을 입증했다.

악성 저혈당증으로 인한 뇌 신경세포의 죽음은 태상섬유 시냅스 아연 방출과 연관이 있다^[32, 34, 37]. 이 연구에서는 악성 저혈당증이 나타났을 때, 태상섬유 시냅스 아연이 감소하고 신경세포가 죽는 현상을 관찰했다. 또한, 신경세포와 시냅스 활성화와 관련한 NeuN, SYP, ZnT3, SIRT1의 단백질 양이 감소한 것을 보았다. 따라서 악성 저혈당증에 의해 시냅스 구조 안정성이 떨어지고 신경 활성화와 시냅스 활성이 낮아질 수 있으며, 시냅스 아연의 양이 감소한 것은 ZnT3가 감소한 것과 연관이 있을 가능성이 있다고 생각된다.

뇌는 에너지원으로 포도당을 주로 사용하지만 저혈당증이 나타났을 때는 포도당 이외 모노카복실산을 대체 에너지원으로 사용하며^[38], 뇌의 포도당 농도는 혈중 포도당 농도 수치와 비례하여 혈중 포도당 농도 수치가 낮아지면 뇌의 포도당 양도 낮아진다^[39]. 이

연구에서 악성 저혈당증이 유도되었을 때, 뇌에서 낮아진 포도당 농도에 대한 에너지 대사 관련 단백질 양적 변화를 보기 위해 신경세포의 MCTs, GLUTs, MPCs 발현 양상을 관찰했고, 분석한 에너지원 수송체 대부분의 단백질 양이 감소했다. 이는 악성 저혈당증이 유발되면 에너지 대사 효율이 낮아지는 것과 연관이 있다고 생각된다^[40, 41]. 즉, 정상세포와 신경세포에 위치한 MCTs, GLUTs가 감소하면 세포 내로 에너지원 공급이 줄어들고, 이어서 MPCs의 감소로 에너지원이 미토콘드리아 안으로 잘 유입되지 못해 에너지 대사가 원활하지 못할 것으로 추정되며, 결국 ATP 합성이 감소되어 신경세포 생존과 활성화에 영향을 줄 가능성이 있다고 여겨진다(Fig. 8). 하지만 GLUT2는 주로 시상하부 신경세포에 위치하고 있어^[18], 다른 수송체와 달리 악성 저혈당증에 의한 해마의 신경변성에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

미토콘드리아는 최종적으로 에너지를 전달받아 ATP를 합성하고 세포생존에 관여한다^[22, 42]. 앞의 결과에 따르면, 악성 저혈당증이 일어나면 에너지 대사 관련 단백질이 감소한다. 이로 인해 미토콘드리아 기능에 어떠한 변화가 있는지 조사한 결과, 에너지 대사 전자전달계에 관여하는 Cyt C의 양이 줄어들고, 미토콘드리아 분열을 일으키는 단백질 양이 증가하는 경향을 보였다. 따라서, Cyt C 감소로 미토콘드리아의 전자전달계 과정이 저하되어 에너지 생성이 감소될 수 있으며, 미토콘드리아의 구조 변화를 일으켜 미토콘드리아 기능 이상을 야기할 가능성이 있다.

또한, 악성 저혈당증으로 유발된 혼수 증상과 미토콘드리아 기능 이상은 산화 스트레스 유발과 밀접한 관련이 있다^[31, 38]. 이 연구에서는 악성 저혈당증으로 인해 항산화 관련 단백질 양이 감소하는 경향을 보았다. 즉, 항산화 기능이 악성 저혈당증에 의해 증가하는 산화 스트레스 수준에 대응하지 못할 것으로 추정된다. 최근 연구 결과에 따르면, 철 의존성 세포사멸(ferroptosis)이 항산화 활성 억제와 연관되어^[43], 항산화 효소

GPx4, SOD2, Nrf2 발현이 줄어든다는 보고가 있다^[44, 45]. 따라서, 악성 저혈당증이 유발됐을 때 항산화 관련 단백질 양이 감소한 것은 악성 저혈당증이 신경세포에 철 의존성 세포사멸을 자극했을 가능성을 내포할 수도 있다.

끝으로 신경염증반응이 악성 저혈당증에서 유도되는지 분석해 본 결과, 염증반응을 촉진하는 성상세포에 존재하는 GFAP가 증가하고^[46, 47], 염증유발 복합체 관련 단백질 NLRP3는 증가하는 양상을 보였다^[48]. 이를 통해 염증반응이 증가할 것으로 예상하지만, 이 연구에서는 염증반응과 관련하여 분석한 단백질이 적어 추후 더 많은 연구가 필요하다.

종합하면, 이 연구에서는 악성 저혈당증으로 인한 신경활성, 시냅스 활성의 억제, 뇌의 에너지 수송 과정의 변화 가능성을 관찰했다. 또한 뇌에서 항산화 기능, 미토콘드리아의 역할, 기능 변화, 염증반응과 연관된 단백질의 양적 변화를 발견했다. 즉, 악성 저혈당증은 이러한 변화들을 통해 최종적으로 증상과 신경세포 죽음을 유발하고, 이후 증상이 반복적으로 나타나거나, 오래 지속될 경우 퇴행성 신경변성과 뇌신경계 구조, 기능에 영향을 끼치는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Heller SR., *et al.* Risk of hypoglycaemia in types 1 and 2 diabetes: effects of treatment modalities and their duration. (2007). *Diabetologia*, 50(6), 1140-1147. doi:10.1007/s00125-007-0599-y
2. Heller SR., *et al.* Glucose Concentrations of Less Than 3.0 mmol/L (54 mg/dL) Should Be Reported in Clinical Trials: A Joint Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. (2017). *Diabetes Care*, 40(1), 155-157. doi:10.2337/dc16-2215
3. Languren, G., *et al.* (2013). Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int*, 63(4), 331-343. doi:10.1016/j.neuint.2013.06.018
4. Suh, S. W., *et al.* (2007). Hypoglycemia, brain energetics, and hypoglycemic neuronal death. *Glia*, 55(12), 1280-1286. doi:10.1002/glia.20440
5. Auer, R. N. (2004). Hypoglycemic brain damage. *Forensic Sci Int*, 146(2-3), 105-110. doi:10.1016/j.forsciint.2004.08.001
6. Sokoloff, L. (1973). Metabolism of ketone bodies by the brain. *Annu Rev Med*, 24, 271-280. doi:10.1146/annurev.me.24.020173.001415
7. Herzog, R. I., *et al.* (2013). Lactate preserves neuronal metabolism and function following antecedent recurrent hypoglycemia. *J Clin Invest*, 123(5), 1988-1998. doi:10.1172/jci65105
8. Veneman, T., *et al.* (1994). Effect of hyperketonemia and hyperlacticacidemia on symptoms, cognitive dysfunction, and counterregulatory hormone responses during

- hypoglycemia in normal humans. *Diabetes*, 43(11), 1311-1317.
doi:10.2337/diab.43.11.1311
9. Pellerin, L., *et al.* (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev Neurosci*, 20(4-5), 291-299. doi:10.1159/000017324
10. D'Souza, P., *et al.* (2022). Commentary: Lactate, the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle, and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery*, 90(6), e167-e169. doi:10.1227/neu.00000000000001951
11. Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 121-138. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001
12. Maher, F., *et al.* (1991). Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol Cell Neurosci*, 2(4), 351-360. doi:10.1016/1044-7431(91)90066-w
13. Takata, K., *et al.* (1997). Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int Rev Cytol*, 172, 1-53. doi:10.1016/s0074-7696(08)62357-8
14. El Messari, S., *et al.* (1998). Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, 399(4), 492-512. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19981005)399:4<492::aid-cne4>3.0.co;2-x
15. Pierre, K., & Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem*, 94(1), 1-14. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03168.x

16. Rinholm, J. E., *et al.* (2011). Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *J Neurosci*, *31*(2), 538-548. doi:10.1523/jneurosci.3516-10.2011
17. Lamy, C. M., *et al.* (2014). Hypoglycemia-activated GLUT2 neurons of the nucleus tractus solitarius stimulate vagal activity and glucagon secretion. *Cell Metab*, *19*(3), 527-538. doi:10.1016/j.cmet.2014.02.003
18. Labouèbe, G., *et al.* (2016). Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. *Nat Neurosci*, *19*(8), 999-1002. doi:10.1038/nn.4331
19. Suzuki, A., *et al.* (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, *144*(5), 810-823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018
20. Labouèbe, G., *et al.* (2018). GLUT2-Expressing Neurons as Glucose Sensors in the Brain: Electrophysiological Analysis. *Methods Mol Biol*, *1713*, 255-267. doi:10.1007/978-1-4939-7507-5_19
21. Heinemeyer, J., *et al.* (2007). A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem*, *282*(16), 12240-12248. doi:10.1074/jbc.M610545200
22. Johnson, J., *et al.* (2021). Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys*, *702*, 108698. doi:10.1016/j.abb.2020.108698
23. Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, *1763*(5-6), 542-548. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.006

24. Meyer, J. N., *et al.* (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, 391, 42-53. doi:10.1016/j.tox.2017.07.019
25. Imbriani, P., *et al.* (2022). Oxidative stress and synaptic dysfunction in rodent models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 173, 105851. doi:10.1016/j.nbd.2022.105851
26. Teleanu, D. M., *et al.* (2022). An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 23(11). doi:10.3390/ijms23115938
27. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. doi:10.1042/bj20081386
28. van der Blik, A. M., *et al.* (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6). doi:10.1101/cshperspect.a011072
29. Telushkin, P. K., *et al.* (2005). Glycolysis and oxidation enzyme activity in rat brain during insulin-induced hypoglycemia against the background of alloxan-induced diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med*, 140(6), 695-697. doi:10.1007/s10517-006-0057-8
30. Kahal, H., *et al.* (2020). Effect of induced hypoglycemia on inflammation and oxidative stress in type 2 diabetes and control subjects. *Sci Rep*, 10(1), 4750. doi:10.1038/s41598-020-61531-z
31. Cardoso, S., *et al.* (2010). Cortical and hippocampal mitochondria bioenergetics and oxidative status during hyperglycemia and/or insulin-induced hypoglycemia. *Biochim Biophys Acta*, 1802(11), 942-951. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.001
32. Suh, S. W., *et al.* (2004). Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death. *Neurobiol Dis*, 16(3), 538-545. doi:10.1016/j.nbd.2004.04.017

33. Whitmer, R. A., *et al.* (2009). Hypoglycemic episodes and risk of dementia in older patients with type 2 diabetes mellitus. *Jama*, 301(15), 1565-1572. doi:10.1001/jama.2009.460
34. Mohseni, S. (2014). Neurologic damage in hypoglycemia. *Handb Clin Neurol*, 126, 513-532. doi:10.1016/B978-0-444-53480-4.00036-9
35. Cho, E., *et al.* (2012). Neuroprotection by urokinase plasminogen activator in the hippocampus. *Neurobiol Dis*, 46(1), 215-224. doi:10.1016/j.nbd.2012.01.010
36. Choi, B. Y., *et al.* (2013). Pyruvate administration reduces recurrent/moderate hypoglycemia-induced cortical neuron death in diabetic rats. *PLoS One*, 8(11), e81523. doi:10.1371/journal.pone.0081523
37. Pivovarova, N. B., *et al.* (2014). The interactive roles of zinc and calcium in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *J Neurochem*, 128(4), 592-602. doi:10.1111/jnc.12489
38. Languren, G., *et al.* (2019). Recurrent moderate hypoglycemia exacerbates oxidative damage and neuronal death leading to cognitive dysfunction after the hypoglycemic coma. *J Cereb Blood Flow Metab*, 39(5), 808-821. doi:10.1177/0271678x17733640
39. Gruetter, R., *et al.* (1998). Steady-state cerebral glucose concentrations and transport in the human brain. *J Neurochem*, 70(1), 397-408. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70010397.x
40. Bryan, R. M., Jr., *et al.* (1986). Regional cerebral glucose utilization during insulin-induced hypoglycemia in unanesthetized rats. *J Neurochem*, 46(6), 1904-1911. doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb08512.x

41. Pelligrino, D. A., *et al.* (1990). Brain glucose utilization and transport and cortical function in chronic vs. acute hypoglycemia. *Am J Physiol*, 259(5 Pt 1), E729-735. doi:10.1152/ajpendo.1990.259.5.E729
42. Kho, A. R., *et al.* (2019). The Effects of Sodium Dichloroacetate on Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Death Following Hypoglycemia-Induced Injury. *Cells*, 8(5). doi:10.3390/cells8050405
43. Li, J., *et al.* (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, 11(2), 88. doi:10.1038/s41419-020-2298-2
44. Dodson, M., *et al.* (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol*, 23, 101107. doi:10.1016/j.redox.2019.101107
45. Chen, G. H., *et al.* (2022). Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis via the NRF2-ARE pathway. *Free Radic Biol Med*, 180, 95-107. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.012
46. Norden, D. M., *et al.* (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2), 300-316. doi:10.1002/glia.22930
47. Linnerbauer, M., *et al.* (2020). Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation. *Neuron*, 108(4), 608-622. doi:10.1016/j.neuron.2020.08.012
48. Sharma, B. R., & Kanneganti, T. D. (2021). NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol*, 22(5), 550-559. doi:10.1038/s41590-021-00886-5

Abstract

Hypoglycemia and severe hypoglycemia are defined as the plasma glucose concentration below 55 mg/dL, and 40 mg/dL respectively. Severe hypoglycemia is accompanied by epileptic seizures and coma, can cause hypersensitivity, cognitive impairment, and local neurological dysfunction, and can be fatal if not supplied with glucose immediately. It can also cause neurodegeneration by inducing oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction in the brain or neuronal cells, disrupting neuronal function.

In this study, changes in the levels of neurodegeneration-related proteins in the brain in severe hypoglycemia were investigated. Insulin (10 IU/kg) was injected intraperitoneally into C57BL/6 mice to produce a model of insulin-induced severe hypoglycemia. As a result, the levels of blood glucose fell to less than 10 mg/dL within 3 hours, with symptoms resembling epileptic seizures and coma. In these animals, TSQ [N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide] staining and acid fuchsin staining were used to confirm changes in synaptic zinc levels and neuronal death in brain tissues, respectively. Neuronal cell death was confirmed in the CA3 region of hippocampus and cortex, and a decrease in synaptic zinc was observed in the mossy fiber of hippocampus. Because neuronal cell death can result from abnormalities in neuronal activity, energy metabolism, oxidative stress, mitochondrial function, and inflammatory responses, changes in the levels of associated proteins were investigated. As a result, decreases in neuronal, synaptic-active related proteins, and energy source transporter proteins were observed. This suggests that severe hypoglycemia may lead to reduced neuronal and synaptic

activity, and there is a possibility of energy metabolism disruption. In addition, through changes in mitochondrial function-regulating proteins, antioxidant-related proteins, and inflammation-related proteins, severe hypoglycemia may also affect the structural changes in the mitochondria and the electron transport chain, impair the anti-oxidant function, and cause inflammation.

Thus, when triggered by severe hypoglycemia, changes in the levels of neurodegenerative-associated protein in the brain are assumed to result in neuronal cell death in the end.

Keywords: hypoglycemia, insulin, epileptic seizures, neurodegeneration, neuronal death

Table 1. Primary antibodies used for western blot assay.

Antibody	Dilutions	Supplier		Cat. No.
anti-neuronal nuclear (NeuN)	1:1000	Rockland	NY	200-301-X09
anti-sirtuin 1 (SIRT1)	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-17071
anti-zinc transporter 3 (ZnT3)	1:1000			
anti-synaptophysin (SYP)	1:5000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-9116
anti-postsynaptic density protein 95 (PSD-95)	1:1000	ThermoFisher	USA	51-6900
anti- MCT1	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-76687
anti-MCT2	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-76603
anti-MCT4	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-106683
anti-GLUT1	1:500	ThermoFisher	USA	MA5-11315
anti-GLUT2	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-77459
anti-GLUT3	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-99486
anti-GLUT4	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-19333
anti-BRP44L (MPC1)	1:1000	LSBio	USA	LS-C356186
anti-BRP44 (MPC2)	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-116939
anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP)	1:1000	Merck	Germany	MAB360
anti-glutathione peroxidase 4 (GPx4)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-166570
anti-superoxide dismutase 2 (SOD2)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-137254
anti-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)	1:1000	ThermoFisher	USA	PA5-88084
anti-cytochrome C (Cyt C)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-8385
anti-mitofusin 2 (MFN2)	1:1000	abcam	UK	ab56889
anti-phospho-DRP 1 (p-Drp1)	1:1000	ThermoFisher	USA	612606
anti-optic atrophy type 1 (OPA1)	1:1000	BD biosciences	USA	PA5-64821
anti-NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)	1:500	Novus biologicals	USA	NBP2-12446
	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-47778
anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	USA	sc-32233

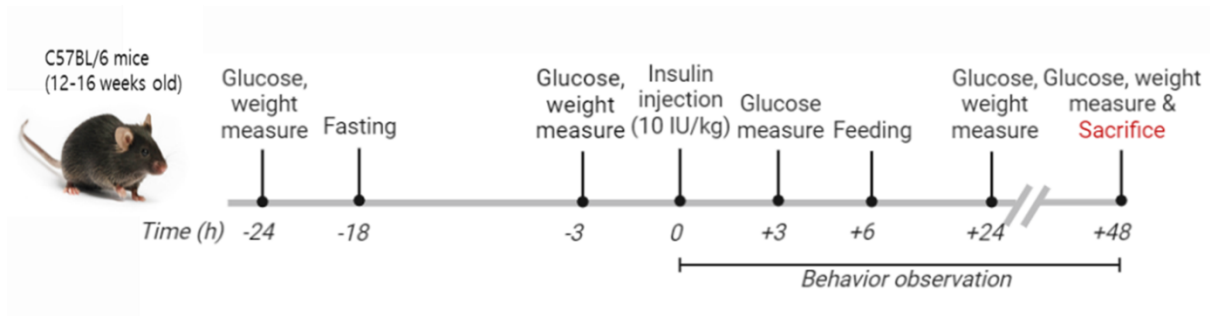


Figure 1. Protocol of insulin-induced severe hypoglycemia.

C57BL/6 mice aged 12-16 weeks were injected with 1% HCl in 0.9% NaCl for the control group (CTL) and with insulin (10 IU/kg) in 0.9% NaCl for the insulin-induced severe hypoglycemia group (INS) intraperitoneally. Both groups fasted for 18 hours before administration. The levels of blood glucose and weight were measured at the indicated time points. The mice's behavior was observed from the time of insulin injection to sacrifice.

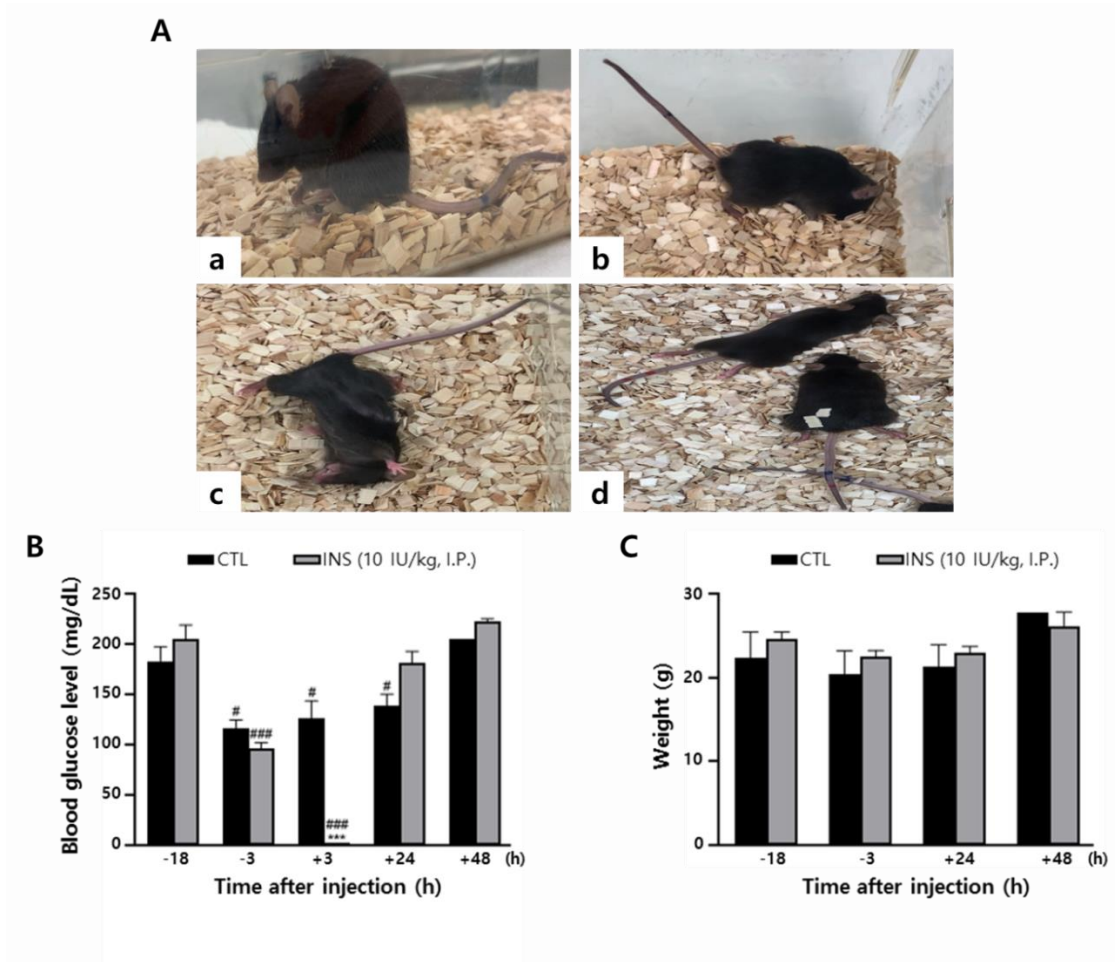


Figure 2. Impact of insulin on the levels of blood glucose and behavior.

We injected insulin (10 IU/kg) or 1% HCl intraperitoneally to C57BL/6 mice, and then assessed behavioral changes, the levels of blood glucose and weight. (A) The insulin administration cause behavioral patterns of (a) hypo-responsiveness, (b) digging, (c) convulsions, shock, and (d) coma. (B, C) Histogram show the difference in the levels of blood glucose and weight between the CTL and INS administration groups at the indicated time points. Differences within each group were determined with a one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls *post hoc* test (sharps), and differences between CTL and INS groups were determined with two-tailed unpaired *t* test (asterisks). Each data bar is the mean \pm SEM (***, ### $p < 0.001$, # $p < 0.05$).

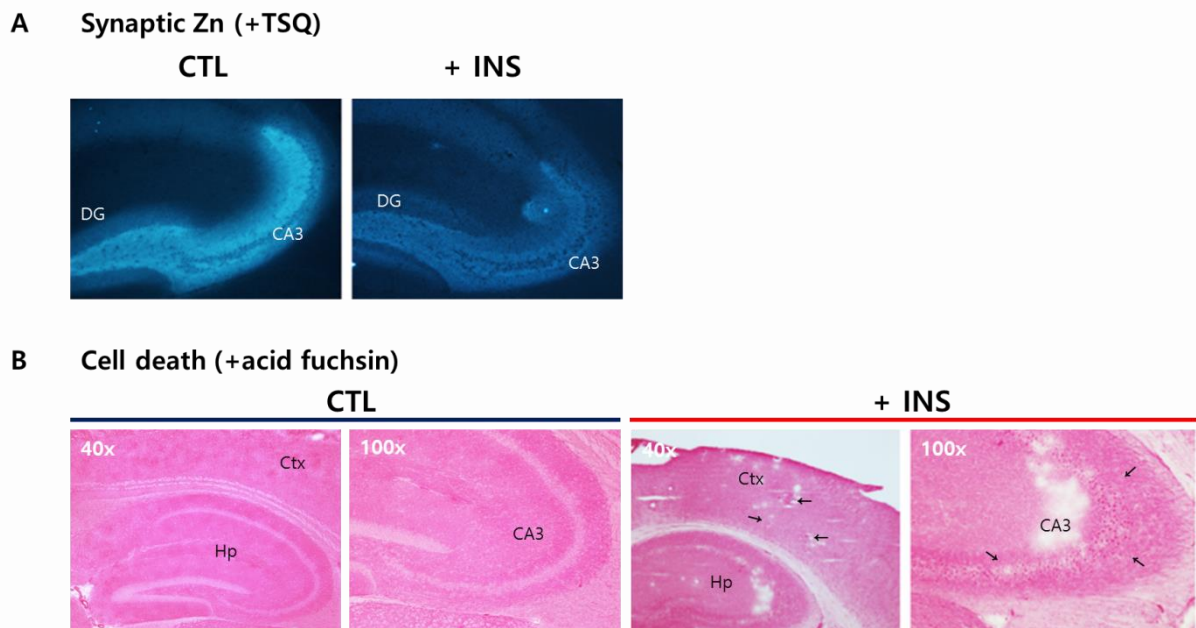


Figure 3. Hippocampus and cortex pyramidal cells stained with TSQ and acid fuchsin.

(A) Synaptic zinc in mossy fiber was assessed by TSQ staining (blue) and (B) acidophilic neuronal death (arrows) in the hippocampus and cortex was evaluated by acid fuchsin staining (pink). The brain sections are from C57BL/6 mice injected with either 1% HCl in 0.9% NaCl (CTL) or 10 IU/kg insulin (+INS). The brain sections of the insulin-injected group belong to the mice that showed severe hypoglycemia symptoms. TSQ = N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide; CTL = control; INS = insulin; DG = dentate gyrus; Ctx = cortex; Hp = hippocampus; CA3 = *cornu ammonis* 3

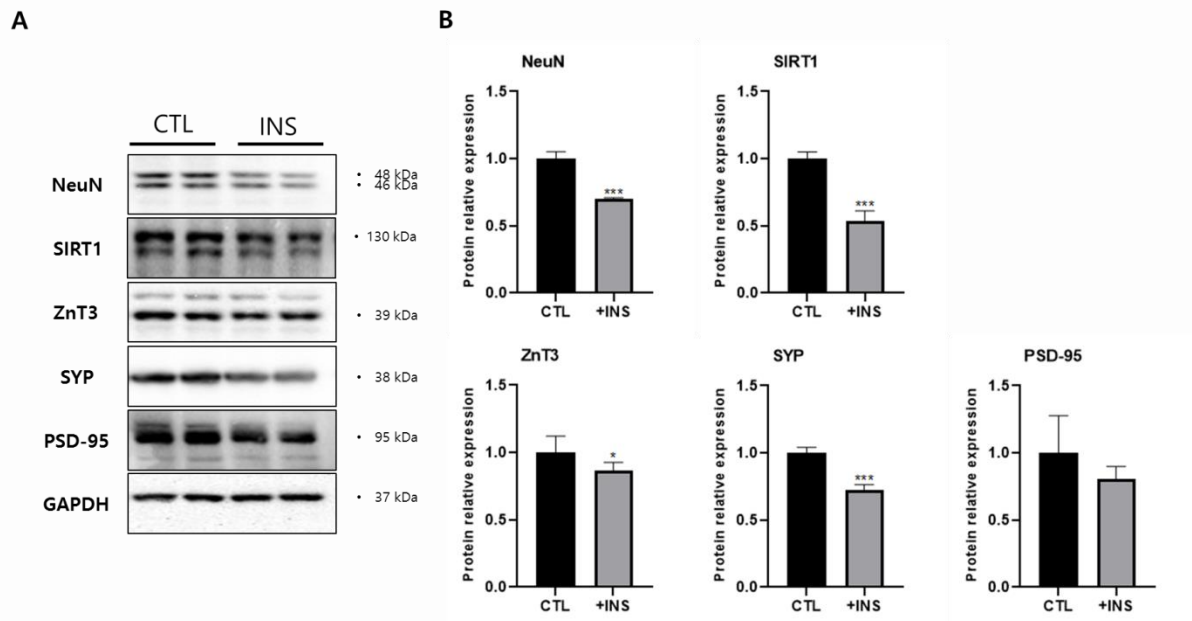
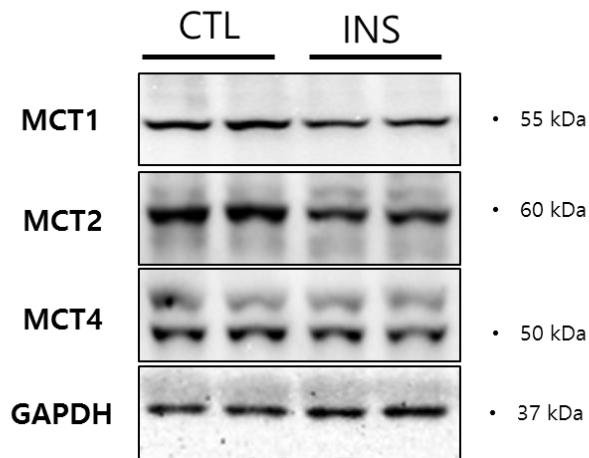


Figure 4. Reduction of neuronal and synaptic activity in severe hypoglycemia.

For western blot analysis, the brain tissues were obtained from the C57BL/6 mice injected insulin. Representative immunoblots (A) of NeuN, SIRT1, ZnT3, SYP show lowered levels of the protein by the insulin administration. But, PSD-95 was not statistically significant. (B) Immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM (* p <0.05, *** p <0.001).

A



B

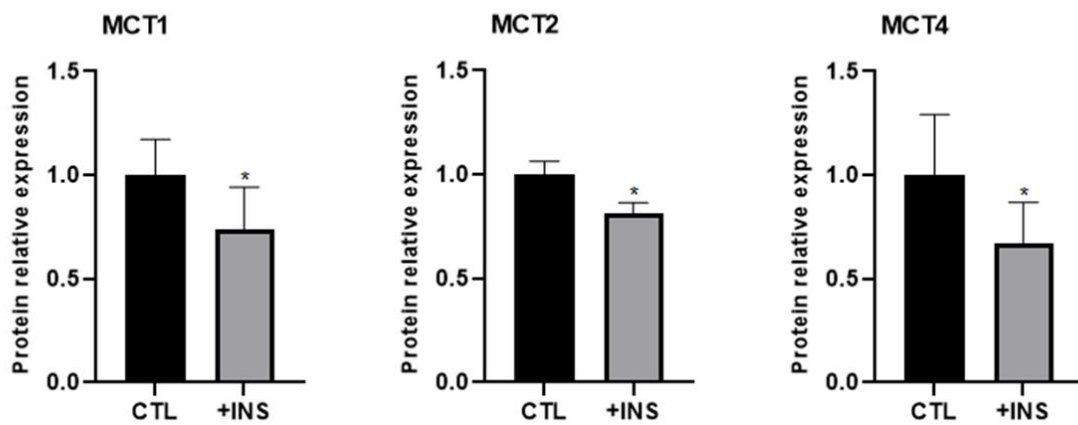


Figure 5. Change in MCTs proteins in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) displaying changes in the levels of MCT1, MCT2, and MCT4. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM ($*p < 0.05$).

A

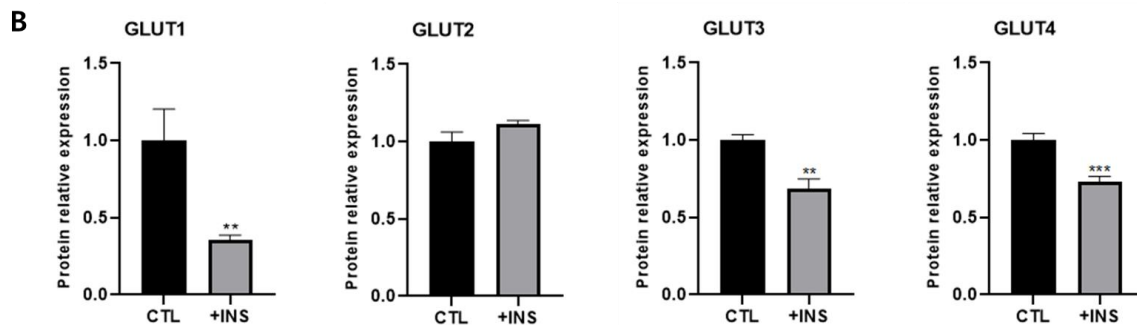
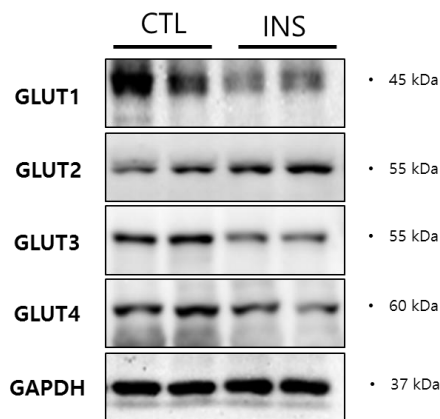
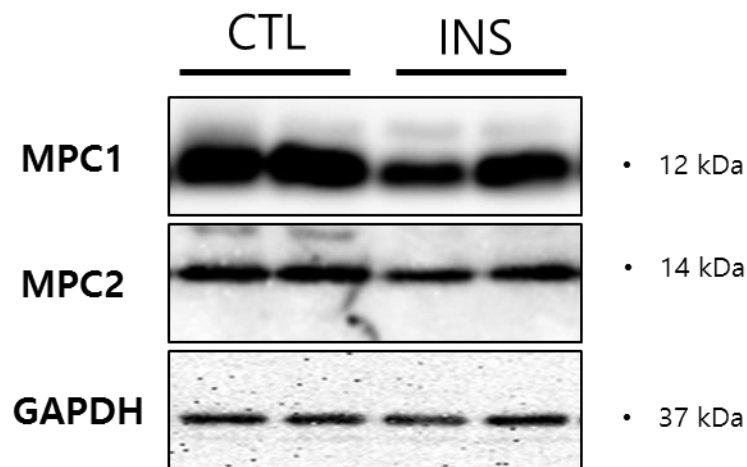


Figure 6. Change in GLUTs proteins in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) displaying changes in the levels of GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM (** p <0.01, *** p <0.001).

A



B

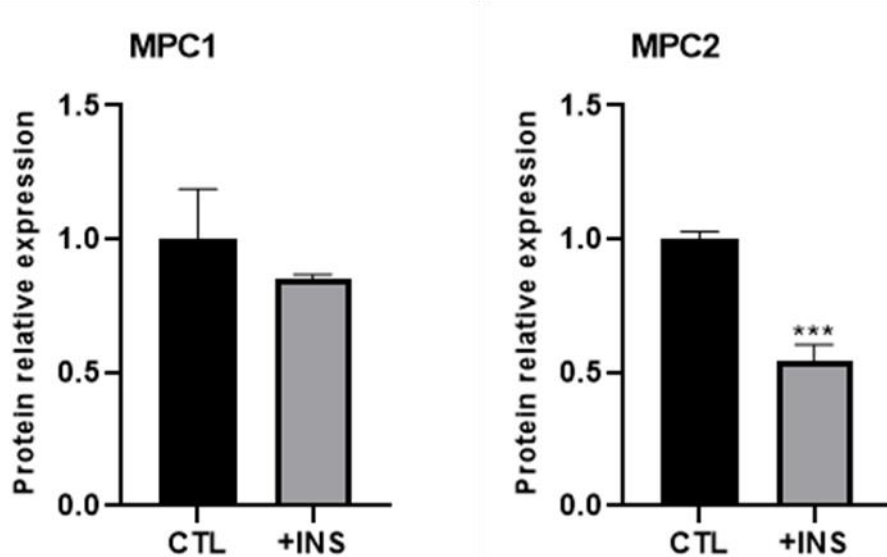


Figure 7. Change in MPCs proteins in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) displaying changes in the levels of MPC1 and MPC2. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM (***) $p < 0.001$).

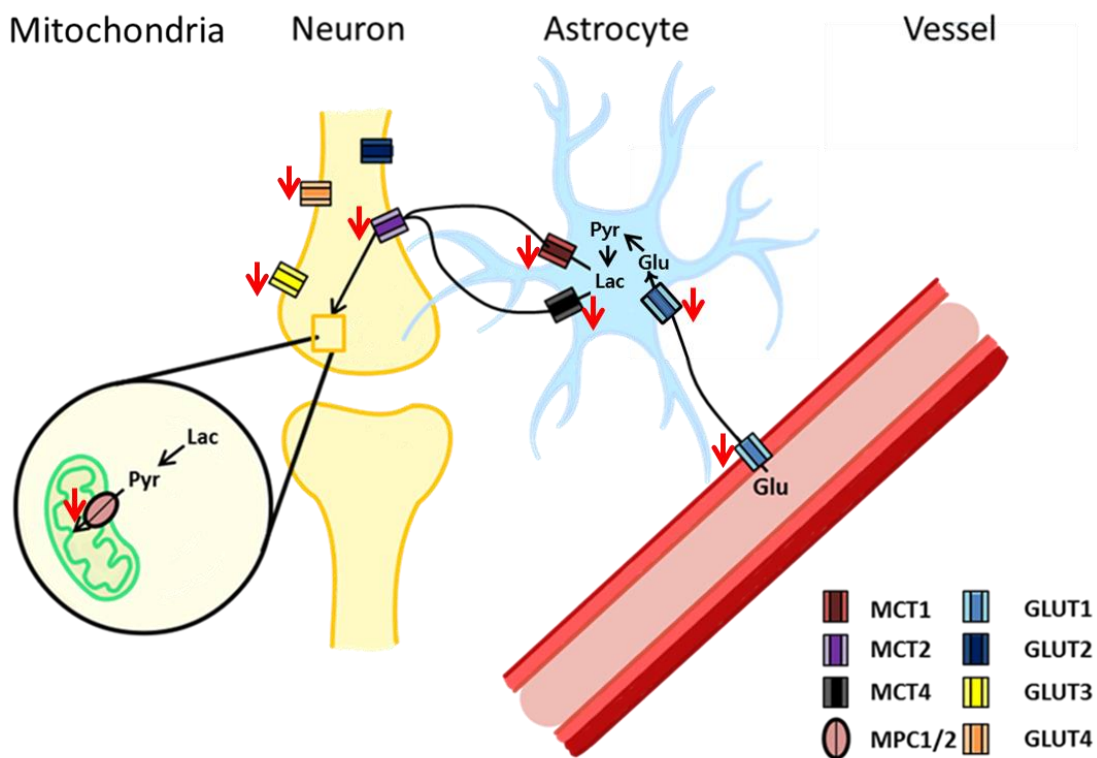


Figure 8. Diagram depicting changes in the levels of MCTs, GLUTs and MPCs in severe hypoglycemia.

Diagram shows general MCTs, GLUTs and MPCs localization and energy metabolism pathway in astrocyte-neuron lactate shuttle and depicts MCTs, GLUTs and MPCs protein levels change in severe hypoglycemia.

MCTs = monocarboxylate transporters; GLUTs = glucose transporters; MPCs = mitochondrial pyruvate carriers; Glu = glucose; Pyr = pyruvate; Lac = lactate

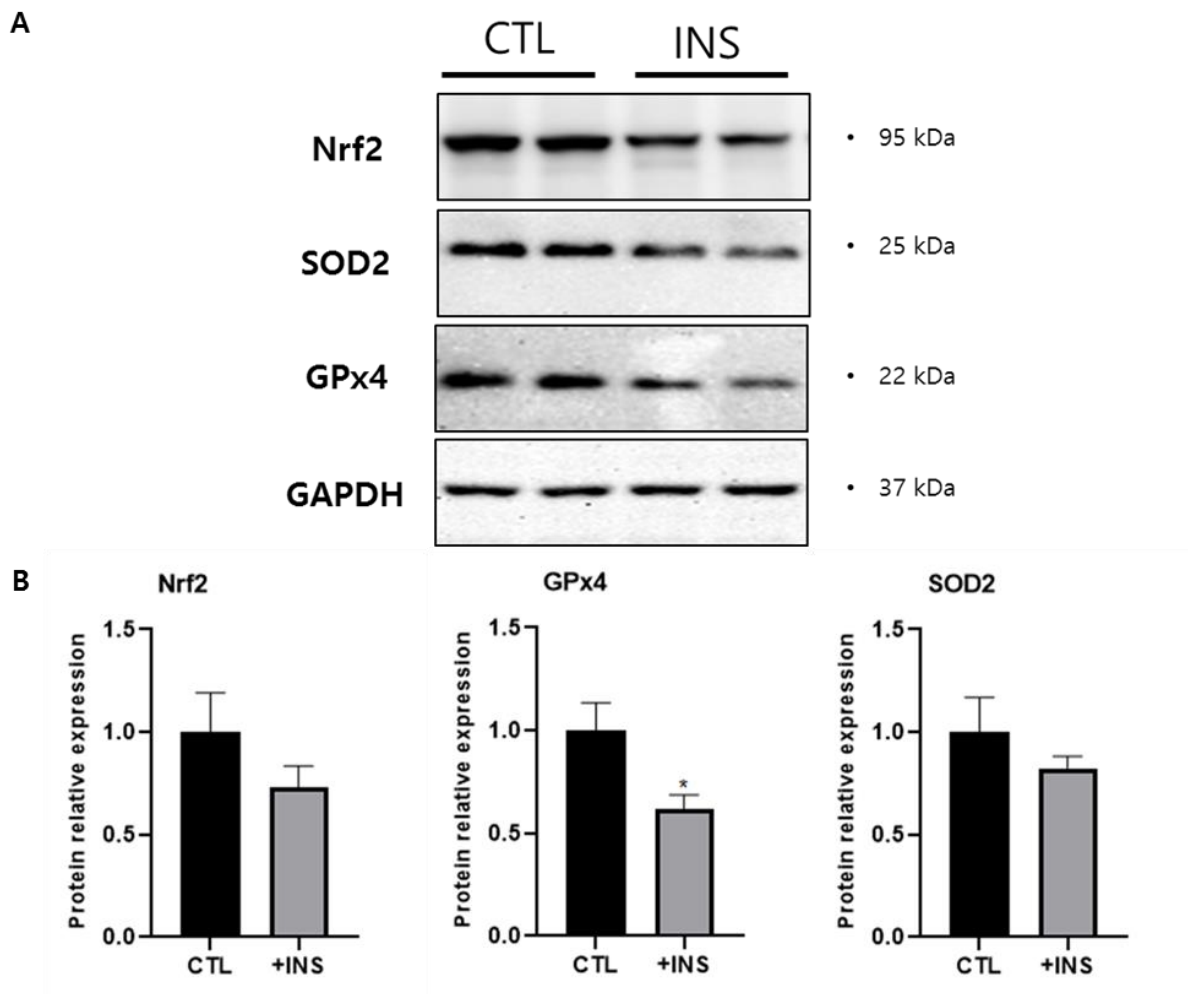


Figure 9. Decreased anti-oxidant capacity in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) graphs displaying changes in the levels of anti-oxidative protective proteins Nrf2, SOD2, and GPx4. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM ($*p < 0.05$).

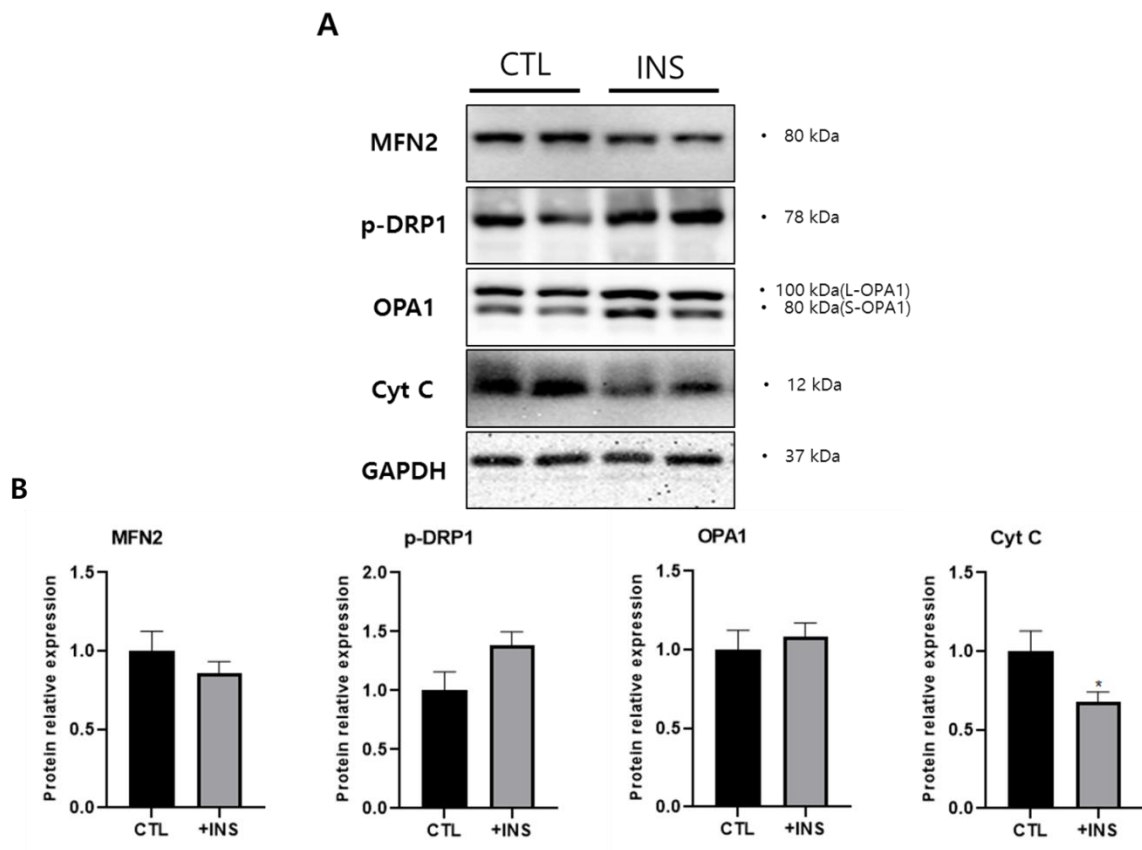


Figure 10. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial fission in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) displaying changes in the levels of mitochondria function-related proteins MFN2, p-DRP1, and OPA1. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars present the rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean \pm SEM (* p <0.05).

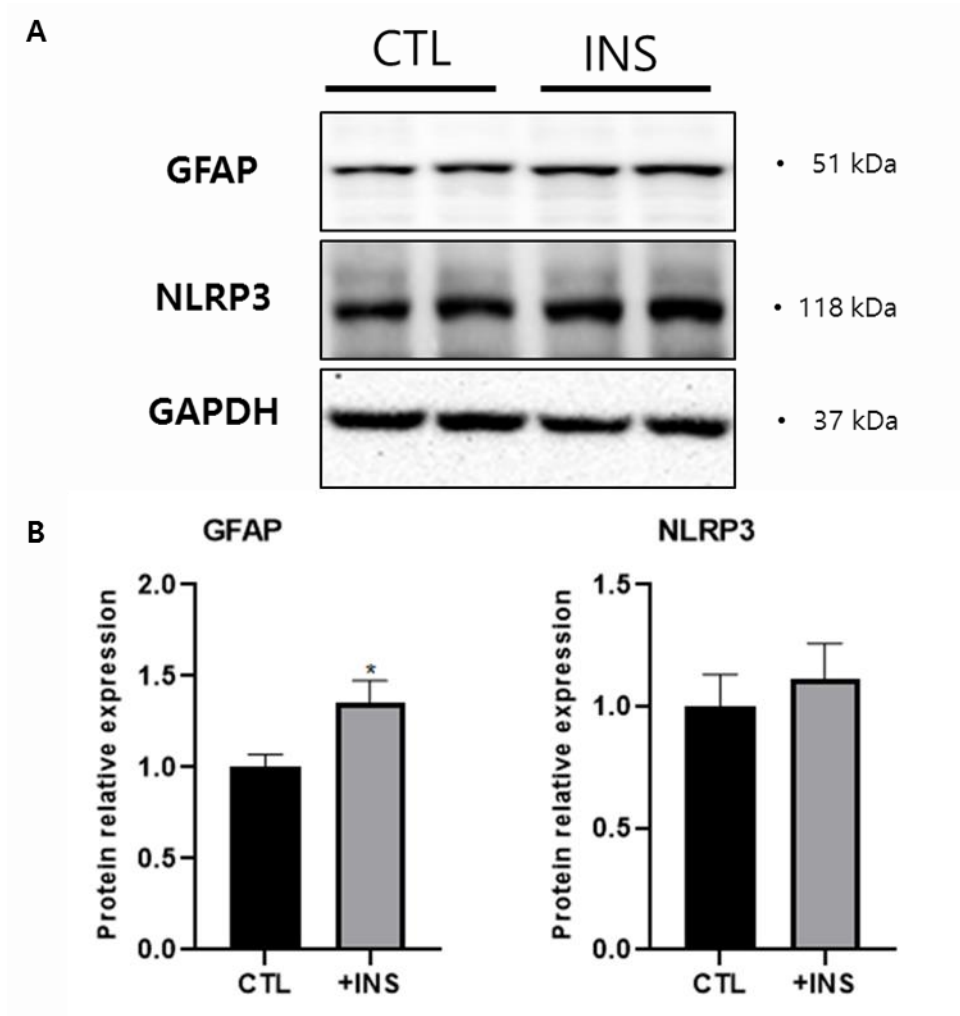


Figure 11. Increased inflammation in severe hypoglycemia.

Immunoblots (A) displaying changes in the levels of inflammation-related proteins GFAP, NLRP3. (B) The immunoreactive optical density obtained from triplicate immunoblots was normalized to that of GAPDH (n = 6 per group sacrificed 48 hours after the administration). Bars are presented as a rate relative to the control (= 1.0). Each data point is the mean ± SEM (**p*<0.05).