



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

알츠하이머병 생쥐 모델에서
반복적 저혈당증이 유발하는
산화적 신경세포 손상 연관 단백질 변화

Recurrent Hypoglycemia Alters Level of Neuronal
Death- and Oxidative Damage-Related Proteins
in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

울산대학교대학원
의과학과
최수연

알츠하이머병 생쥐 모델에서
반복적 저혈당증이 유발하는
산화적 신경세포 손상 연관 단백질의 변화

지도교수 이주영

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 02월

울산대학교 대학원
의과학과
최수연

최수연의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 정 성 윤 (인)

심사위원 탁 은 영 (인)

심사위원 이 주 영 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2024년 02월

국문 요약

인간의 수명이 증가하면서 고령으로 인한 대사증후군(metabolic syndrome)과 신경변성(neurodegeneration)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 당뇨병(diabetes)과 치매(dementia)의 가장 흔한 형태인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)이 대표적이다. 두 질환을 동시에 겪는 환자는 알츠하이머병의 특성인 인지기능 저하 때문에 혈당 조절에 어려움을 겪으며, 저혈당증(hypoglycemia)을 겪을 가능성이 높다. 저혈당증은 혈당이 54 mg/dL 이하인 상태를 말하며 오래 지속될 경우 비간질성 발작, 혼수, 경직 등을 야기하고 사망을 초래한다. 또한 미토콘드리아 기능 장애(mitochondrial dysfunction), 산화 스트레스(oxidative stress)의 증가로 인한 신경세포의 사멸(neuronal cell death)을 유도하며, 시냅스 소실(synaptic loss)을 일으켜 인지기능의 저하를 일으킨다.

이 연구에서는 3-4개월령의 알츠하이머병 동물모델에 인슐린을 격일로 투여해 반복적 저혈당증(recurrent hypoglycemia, RH)을 유도하여 신경세포 손상에 미치는 영향을 조사했다. 대조군은 알츠하이머병만 가진 모델, 실험군은 알츠하이머병과 함께 반복적 저혈당증을 겪는 모델로 설정하여 인슐린으로 심각한 수준의 저혈당증을 유도했다.

그 결과, 기존 알츠하이머병의 뇌보다 RH를 겪은 뇌에서 산화 스트레스(oxidative stress)와 신경세포 손상과 연관된 단백질이 증가하는 것을 확인했다. RH 후 western blot으로 뇌의 전체적인 단백질 양을 비교했을 때, 신경세포의 핵과 축삭(axon)을 구성하는 단백질이 감소하였으며 시냅스 소포(synaptic vesicle)와 시냅스 후 신경세포(post synaptic neuron)의 단백질 양이 감소했다. 또한 신경세포와 함께 뇌의 항상성 및 기능에 관여하는 성상세포(astrocyte)가 증가했다. 세포 자살(apoptosis)에 기여하는 단백질은 증가했으며, 세포 자살을 억제하는 단백질은 감소했다. 또한 지질 산화 스트레스(lipid oxidative stress), 산화 질소(nitric oxide, NO)의 생성에 기여하는 단백질과, 세포 스트레스 수준을 나타내는 인자가 증가하는 경향을 관찰했다. 그에 반해 산화 스트레스 수준을 감소시키는 항산화제(antioxidant)는 감소하는 경향을 보였다.

이러한 결과는 뇌의 반복적인 에너지 결핍이 항산화 기능을 억제하는 것과 더불어 산화 스트레스 수준을 높이며, 신경세포 손상을 초래하는 것을 나타낸다. 따라서 RH가 알츠하이머병의 진행을 가속할 수 있는 위험 요인이 될 수 있음을 시사한다. 전체적인

뇌의 단백질 수준 변화를 조사하여 얻은 본 연구의 결과는 관련 단백질들 간의 명확한 신호전달기전과 기능적 부전(functional symptoms) 연구에 중요한 정보로 활용될 것이며, 나아가 저혈당증으로 인한 인지기능 저하의 속도를 지연시키거나 예방하는 데에 기여할 것으로 기대된다.

중심단어: 알츠하이머병, 반복적 저혈당증, 신경세포 손상, 산화 스트레스

차례

국문 요약	i
I. 서론	1
II. 실험방법	3
1. 알츠하이머병 생쥐 모델	
2. 인슐린에 의한 RH 의 유도	
3. 혈당 측정을 통한 RH 모델의 평가	4
4. 조직처리와 단백질 추출	
5. Western blot	
6. 통계	
III. 결과	6
1. 인슐린 투여로 유발된 저혈당증	
2. 신경세포핵, 축삭 단백질과 시냅스 소포 단백질의 감소	
3. GFAP 의 증가	
4. Cyt C, Bax, cleaved Caspase-3 의 증가와 Bcl2 의 감소	7
5. 산화 스트레스 마커 및 세포 스트레스 표지 단백질 발현 증가	
6. 항산화제의 기능 감소.....	8
IV. 결론 및 고찰	9
참고문헌.....	11
Abstract.....	14

그림 목차

Table 1. Used primary antibody for western blot.....	15
Figure 1. Schematic diagram of INS injection.....	16
Figure 2. Blood glucose level and behavioral changes caused by hypoglycemia.....	17
Figure 3. Diminished protein level of neuronal and synaptic activity	18
Figure 4. Effect of RH on GFAP expression.....	19
Figure 5. Effect of RH on apoptosis-related proteins expression	20
Figure 6. Protein levels of 4-HNE, nNOS, HIF-1α, HSP70 after RH	21
Figure 7. Reduction of antioxidant after RH	22

I. 서론

알츠하이머병은 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disease)으로 뇌의 신경세포 사멸과 뇌 위축을 동반하며, 인지기능과 운동기능의 부전을 나타내는 치매의 가장 흔한 형태이다. 알츠하이머병의 발병 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나, 아밀로이드 베타(amyloid- β , A β) 단백질의 비정상적 응집이 신경 변성과 시냅스 소실을 유발한다는 A β cascade 가설이 가장 잘 알려져 있다.^[1] A β 단백질의 축적은 시냅스의 활성을 저하시키며, 신경염증(neuroinflammation), 산화 스트레스를 일으키는 신호 전달을 자극한다.^[2, 3]

알츠하이머병의 증상인 인지기능 저하를 가속화하는 요인에는 심혈관 질환과 대사증후군 등이 있으며, 저혈당증 같은 대사작용의 불균형 또한 영향을 준다.^[4-6] 저혈당증은 혈당이 54 mg/dL 이하인 상태를 말한다.^[7] 굶주림(starvation), 인슐린종(insulinoma), 성장호르몬 저하 등의 상황에서 발생하며, 특히 혈당 강하 치료를 받는 환자들에게 빈번하게 일어난다.^[8] 이는 심계항진, 손발 저림, 불안과 같은 자율신경계 증상과 어지러움, 혼돈 등 신경 포도당 결핍 증상을 일으키고 오래 지속될 경우 비간질성 발작(non-epileptic seizure), 혼수상태(coma)와 같은 뇌 기능 장애를 동반하며, 사망을 유발할 수 있다. 또한 신경세포의 사멸과 인지기능의 저하에 기여한다고 밝혀졌다.^[9, 10] 저혈당증이 일으키는 신경세포 사멸에 대하여 명확한 기전은 규명되지 않았으나, 포도당의 재관류(glucose reperfusion)에 의한 산화 스트레스와 미토콘드리아 기능 장애, 만성 신경염증(chronic neuroinflammation)이 언급된다.^[11, 12]

한번의 저혈당증을 겪은 환자는 선행 저혈당증이 일으킨 호르몬의 역 조절 반응(counterregulatory response)으로 지속적인 포도당 대사의 불균형이 일어나며, 자율신경 소실(hypoglycemia associated autonomic failure, HAAF)로 인한 RH를 겪을 가능성이 높다.^[13] RH는 중추신경계(central nervous system, CNS)의 포도당 분포 변경, 젖산(lactate)이나 글리코겐(glycogen)과 같은 대체 연료 사용, 포도당 감지 신경세포(glucose sensing neuron)의 민감도 감소와 같은 대사적 스트레스를 동반한다.^[14, 15] 또한 미토콘드리아 항상성을 악화시켜 시냅스 소실을 유발해 인지저하를 일으키며,^[16] 산화-환원의 불균형을 초래하여 해마(hippocampus)의 항산화제(antioxidant) 활성 감소와 세포 사멸 단백질인 caspase-9의 증가를 유발한다.^[17]

알츠하이머병과 당뇨병의 동시 유병 환자가 증가하는 가운데, 당뇨병의 부작용인 저혈당증이 알츠하이머병 환자에게 미치는 영향에 대한 기초 연구가 필수적이다. 알츠하이머병이 동반하는 대사불균형과 인지기능의 저하는 저혈당증의 빈도와 중증도를 증가시키며,^[18-20] 저혈당증을 겪은 알츠하이머병 환자는 그렇지 않은 환자보다 사망률이 높고, 치매의 위험이 증가한다.^[21, 22]

알츠하이머병과 저혈당증은 대사 장애와 산화 스트레스의 증가, 염증, 시냅스 소실과 같은 병리학적 이상을 공유하며, 공통적인 세포 및 신호 전달 경로에 혼란을 나타낸다.^[23, 24] 그 중 산화 스트레스는 다른 장기에 비해 항산화능이 약한 뇌에 치명적이다.^[25, 26] 정상적인 농도의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포의 분화와 이동, 증식 등을 조절하지만, 높은 수준의 ROS는 산화 스트레스를 증가시키고 신경 변성에 동반되는 세포 자살 신호를 자극한다.^[27, 28] RH는 반복적인 포도당의 재관류와 미토콘드리아의 기능 장애를 유발해 산화 스트레스의 수준을 높인다. 이러한 점을 고려할 때, RH가 일으키는 산화환원의 불균형이 알츠하이머병과 같은 퇴행성 신경질환의 병증을 악화시킬 것으로 예상된다.

본 실험에서는 3-4개월령의 알츠하이머병 생쥐 모델에서 반복적으로 저혈당증이 유도되었을 때, 기존 알츠하이머 모델과 비교하여 산화 스트레스 조절과 신경세포의 사멸에 관여하는 단백질의 양적 변화를 연구했다.

II. 실험방법

1. 알츠하이머병 생쥐 모델

실험동물로는 3-4개월령의 C57BL/6 생쥐를 암수 구분없이 사용했으며 알츠하이머병 생쥐 모델로는 5xFAD (Tg 6799) 생쥐 모델을 사용했다. 5xFAD 생쥐 모델은 A β 단백질로 인한 조기 발현형 가족성 알츠하이머병(early onset familial Alzheimer's disease)을 유발하는 아밀로이드 전구 단백질(human amyloid precursor protein, h APP)과 프리세닐린(presenilin 1, PSEN1)을 발현한다. human APP (Swedish mutation: K670N, M671L; Florida mutation: I716V; London mutation: V717I)와 PSEN1 (M146L, L286V), 총 다섯 개의 변이를 발현하며, 1.5개월 이후 신경 내의 A β 단백질의 축적을 보인다. 2개월째에 신경 외 A β 단백질의 축적과 신경교증(gliosis)이 발생하고 4개월째에 시냅스의 소실, 신경세포의 사멸, 인지저하가 일어난다. 이와 같이 빠른 병증의 진행이 약물의 투여에도 민감하게 반응하여, RH 유도 후 변화를 관찰하기 용이할 것으로 판단했다.

본 실험에서는 3-4개월령의 생쥐에 약 한 달 동안 약물을 투여해 4-5개월령의 생쥐를 분석했다. 생쥐의 꼬리 DNA를 이용한 PCR (polymerase chain reaction)로 유전형(genotype)을 분석한 후, 야생형(wild type, WT)과 5xFAD 생쥐를 구분하여 사용했다. 생쥐는 아산생명과학연구소의 SPF (specific pathogen free) 구역에서 12시간 light-dark cycle 조건으로 사육했으며, 실험환경에 일주일 간 적응시킨 후 실험을 진행했다.

2. 인슐린에 의한 RH의 유도

실험모델은 총 3군으로, vehicle treated WT mice (WT+V), vehicle treated 5xFAD mice (5xFAD+V), insulin treated 5xFAD mice (5xFAD+INS)로 나누어 평가했다. 형질전환에 따른 변화는 WT+V 그룹과 5xFAD+V 그룹을 비교하여 확인했으며, RH에 대한 변화는 5xFAD+V 그룹과 5xFAD+INS 그룹을 비교하여 평가하였다. 인슐린은 1% HCl (Fluka Chemie GmbH, Switzerland)에 녹인 후 10 IU/kg 가 되도록 0.9% 생리식염수에 희석하여 투여했으며, vehicle은 1% HCl을 같은 희석비율이 되도록 제작하여 사용했다.

투여 절차로 18시간 금식 후 인슐린을 복강 내 주사했다. 3시간 동안 행동양상을

관찰한 후, 먹이를 급여하여 약 24시간 동안 자유롭게 먹도록 하여 회복된 것을 확인했다. 그 후 다시 18시간 금식하고 동일한 용량과 방법으로 주사하는 것을 반복하여 총 13번의 RH를 유도했다. 주사 후 3시간의 행동관찰로 증상을 기록하였으며, 생쥐는 13번째 주사 후 경추탈골법으로 희생되었다.

3. 혈당 측정을 통한 RH 모델의 평가

RH 모델의 평가로 인슐린 투여 이후 나타나는 행동양상을 관찰하였다. 또한 1, 3, 5, 7, 10, 13회차 투여에서 공복 상태(fasting), 투여 3시간 후(injection), 회복(recovery) 시점에 혈중 포도당 농도를 측정함으로써 저혈당증이 유도된 것을 확인했다. 혈당은 동물의 꼬리 정맥에서 1 µl 채혈하여 혈당측정기(SD Biosensor, Korea)로 측정하였다.

4. 조직처리와 단백질 추출

RH의 유도가 끝난 후 생쥐는 경추탈골하여 희생되었다. 뇌조직은 harvest 후 즉시 액체 질소에서 동결하여 -80 °C에 보관되었다. 그 후 lysis buffer [protein extraction solution (Intron, Korea) + protease inhibitor K]에 넣어 각 1분 30초 동안 homogenizing 하고 2분 30초 동안 sonication하여 -80 °C에서 보관하였다.

5. Western blot

1:25의 비율로 희석한 단백질을 BCA (bicinchoninic acid) protein assay kit (ThermoFisher, USA)으로 정량 하였고, loading Buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM, dithiothreitol, 2 % SDS, 0.1 % bromophenol blue, 10 % glycerol)에 단백질이 각 18 µg 이 되도록 희석하여 100 °C에서 5분 동안 처리한 뒤 loading했다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용해 8-15% 젤에서 분리 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Cytiva, USA)으로 transfer했다. Blocking solution [1 % BSA, 5 % skim milk in 1XTBS-T (Tris-Buffered Saline Tween-20)]에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 각 Table. 1에 표시된 비율로 희석하여 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 1XTBS-T로 3번 수세 후 anti-IgG-HRP (anti-immunoglobulin G-horseradish peroxidase)를 1:10000의 비율로 실온에서 1시간 반응시켰다. 그리고 1XTBS-T로 수세 후 ECL 용액 (Enhanced Chemiluminescence Solution; Bio-Rad, USA)과 반응시켜 imaging 장비 (Davinch-K, Korea)로 검출하였다.

6. 통계

먼저 western blot의 결과는 Image J (National Institutes of Health, USA)를 이용해 각 단백질 밴드의 음영 강도(optical density)를 측정했으며, 통계를 위해 Prism 9 (GraphPad, USA)을 사용했다. WT+V과 5xFAD+V, 5xFAD+V 와 5xFAD+INS 그룹을 각각 two-tailed unpaired *t* test 로 분석했으며, WT+V과 5xFAD+V 그룹 간의 유의성은 *, 5xFAD+V 그룹과 5xFAD+INS 그룹의 유의성은 #으로 표시하였다. 데이터는 3번의 독립적인 실험으로 구해진 평균값 ± 표준오차 (mean ± SEM)로 표시하였고, $p < 0.05$ 일 때 유의한 것으로 간주했다. 혈중 포도당 농도의 통계에 Prism 9을 사용했으며, 동일 시간대의 그룹 간 차이를 two-tailed unpaired *t* test로 검토했다.

III. 결과

1. 인슐린 투여로 유발된 저혈당증

생쥐의 정상 혈당은 150~180 mg/dL ($p>0.05$)로 측정되었으며, 18시간의 공복 후 혈당은 70~110 mg/dL ($p>0.05$)로 측정되었다(Fig 2B). 인슐린 투여 후 행동양상을 관찰한 결과, 1시간 이내로 모든 생쥐가 경직(stiffness), 뒤집힘(convulsion), 튀어 오름(jumping), 소리자극에 과반응하는 행동을 보였다(Fig 2A). 투여 후 3시간 쯤에 모든 동물의 포도당 농도가 9 mg/dL 이하로 감소했으며($p<0.001$) 대부분의 동물에서 혼수(coma) 증상을 보였고, 이와 같은 상태가 6시간 이상 유지되었다(Fig 2). 위와 같은 증상은 반복적인 투여에서 매회 관찰되었으며 감소한 혈당과 함께 저혈당증이 유도되었음을 증명한다. 인슐린을 투여하고 6시간 후 먹이를 주어 하룻밤 동안 회복시켰을 때 모든 생쥐의 혈당이 정상으로 돌아간 것을 확인했다.

2. 신경세포핵, 축삭 단백질과 시냅스 소포 단백질의 감소

Western blot을 통해 RH를 유도한 모델에서 신경세포의 핵 단백질인 neuronal nuclear (NeuN)과 신경섬유의 축삭(axon)을 이루는 microtubule-associated protein 2 (MAP2)의 감소를 관찰하였다(Fig. 3). NeuN은 5xFAD+V 모델에서 감소했으며($p<0.01$), 5xFAD+V와 비교하여 5xFAD+INS 모델에서 감소했다($p<0.01$). MAP2 역시 5xFAD+V 모델에서 감소($p<0.05$) 했으며, 5xFAD+V와 비교하여 5xFAD+INS 모델에서 감소했다. ($p<0.01$) 또한 시냅스 소포 단백질 synaptophysin (SYP)과 시냅스 후 신경세포에 반응하는 postsynaptic density protein (PSD95) 단백질의 양을 관찰했다. WT+V 와 비교하여 5xFAD+V 모델에서 SYP ($p>0.05$), PSD95 ($p>0.05$)이 줄어드는 경향을 보였으며, 5xFAD+INS 모델에서 SYP ($p<0.01$)는 약간의 감소를 보였고 PSD95 ($p<0.05$)가 감소했다. 이는 신경세포를 이루는 핵과 축삭에 단백질 수준의 변성(degradation)이 발생하였으며, 신경전달을 위한 시냅스의 활성이 저해되었음을 의미한다.

3. GFAP의 증가

성상세포의 표지 단백질인 GFAP 항체를 이용해 RH가 일으키는 성상세포의 증식 여부를 확인했다(Fig. 4).^[29] 그 결과 5xFAD+V 모델에서 GFAP가 증가 하는 경향을 보여($p>0.05$) 기존의 알츠하이머병 모델에서 성상세포가 증가한 것을 확인했고,^[30] RH

모델에서 유의미하게 증가하는 것을 관찰했다($p < 0.05$).

4. Cyt C, Bax, cleaved Caspase-3의 증가와 Bcl2의 감소

저혈당증에서 유발되는 세포 사멸의 유형 중 세포 자살의 가능성을 관찰하기 위해 세포 자살 신호전달에 관여하는 cytochrome C (Cyt C), B-cell lymphoma protein 2 (Bcl2), Bcl2-associated X (Bax), cleaved Caspase-3의 변화를 측정했다(Fig. 5). 먼저, 세포 자살을 억제하는 anti-apoptotic 단백질 Bcl2가 RH 모델에서 감소했다($p < 0.01$). 반면 미토콘드리아의 절편을 유도해 세포 자살을 촉진하는 pro-apoptotic 단백질 Bax는 유의성은 없었으나 증가하는 경향을 보였다($p > 0.05$). 또한 미토콘드리아에서 발현하여 세포 자살을 유도하는 Cyt C는 RH 모델에서 크게 증가하였다($p < 0.05$). 또한 Caspase-3는 활성화 시 DNA 손상을 초래하여 세포 자살을 유발한다. cleaved Caspase-3로 활성화된 Caspase-3의 양을 측정하였으며, RH 이후 증가하는 것을 확인했다($p < 0.05$). 5xFAD+V는 WT+V와 비교하여 Cyt C ($p > 0.05$), Bcl2 ($p > 0.05$), Bax ($p > 0.05$)가 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었으며, cleaved Caspase-3 ($p < 0.05$)가 증가한 것을 확인했다. 위와 같은 결과는 반복적 저혈당증이 일으키는 지속적인 대사 스트레스로 인해 세포 자살의 가능성이 증가한 것을 나타낸다.

5. 산화 스트레스 마커 및 세포 스트레스 표지 단백질 발현 증가

5xFAD에서 RH 유도 시 산화 스트레스 증가에 기여하는 인자의 변화를 확인하기 위해 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), neuronal nitric oxide synthesis (nNOS)의 양을 측정했다(Fig. 6). 선행연구에서 두 인자 모두 알츠하이머병의 진행에 영향을 주는 것을 확인했다.^[31, 32] 4-HNE는 지질 산화에 관여하여 대사산물의 변형과 해마 신경세포의 변성을 일으킨다.^[33, 34] 이는 5xFAD+V에서 증가하였으며($p < 0.05$), 5xFAD+INS에서는 증가하는 경향을 보였으나($p > 0.05$) 유의미하지 않았다. 신경세포에 주로 분포하는 nNOS는 ROS 중 하나인 산화 질소의 합성에 관여하는 효소로, 5xFAD+INS 모델에서 유의미하게 증가하는 것을 관찰했다($p < 0.05$). Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)는 항산화제의 고갈로 인한 산화 스트레스 상황에서 신경세포의 사멸을 촉진시킬 수 있으며^[35] RH 모델에서 증가했다($p < 0.05$). Heat shock protein 70 (HSP70)은 신경세포의 각종 스트레스에 의한 반응을 측정하는 지표로 이용되며, 특히 산화 스트레스에 민감하게 반응하는 단백질이다.^[36] RH 후 증가하는 경향을 보였으나 유의미하지 않았다($p > 0.05$).

Fig. 6과 같은 결과는 RH가 산화 스트레스의 증가에 기여하는 것을 보여준다. 이후 세포 사멸의 가능성을 보이지만 조사한 단백질이 한정되어 추후 보충된 연구가 필요하다.

6. 항산화제의 기능 감소

항산화제는 생물학적 기전에서 산화 스트레스를 감소시키는 화합물을 말하며, 초과산화이온(superoxide), 과산화수소(hydrogen peroxide)를 환원해 유리 라디칼(free radical)이 일으키는 산화 스트레스를 중화한다. Western blot으로 뇌신경세포에 존재하는 항산화제인 glutathione peroxidase 4 (GPx4), superoxide dismutase 2 (SOD2), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 단백질의 수준을 관찰했다(Fig. 7). 실험 결과 지질 과산화(lipid peroxidation)를 지질 알콜(lipid alcohol)로 환원시켜 세포 내 지질 과산화의 축적을 억제하는 GPx4가 5xFAD+V ($p<0.01$), 5xFAD+INS ($p<0.01$)모델에서 순차적으로 감소했다. SOD2는 5xFAD+V에서 감소했으며($p<0.05$) 5xFAD+INS에서 감소하는 경향을 보였다($p>0.05$). Nrf2 역시 통계적 유의성은 없었으나 감소하는 경향이 나타났다($p>0.05$). 이는 반복되는 대사적 스트레스로 인해 항산화제의 생성과 활성이 저해될 수 있음을 나타낸다.

IV. 결론 및 고찰

알츠하이머병은 비정상적 단백질 응집으로 인해 뇌조직의 섬유화(fibrosis), 신경염증에 관여하는 신경아교세포의 증가, ROS에 의한 산화 스트레스 증가가 나타난다.^[37] 저혈당증과 같은 대사적 스트레스를 겪을 때도 미토콘드리아 기능 부전에 의한 산화 스트레스의 증가와 세포 사멸이 나타난다.^[38] 이 연구에서는 알츠하이머병 동물모델에 반복적으로 저혈당증을 유도하여 알츠하이머병의 진행에 영향을 미치는 단백질 수준을 조사했다. 분석방법으로 western blot을 이용했으며, 단백질의 양적 변화를 중심으로 분석했다.

그 결과 신경세포핵 단백질 NeuN과 축삭을 이루는 단백질 MAP2가 동시에 감소했다. 시냅스 활성의 표지인 SYP, PSD95 또한 줄어들었다. 이는 RH 후 신경세포의 손상을 일으키며, 시냅스 활성이 저하된 것을 나타낸다. 반면 성상세포를 나타내는 GFAP는 RH 후 높은 수준으로 증가했다. 성상세포는 항상성의 유지와 염증 조절에 중요한 역할을 하며, 인근 신경세포의 사멸과 세포 손상과 같은 질병 상황에 증식한다.^[39]

또한 세포 자살을 촉진하는 단백질 Cyt C, cleaved Caspase-3가 증가했고, 같은 역할의 Bax는 증가하는 경향을 보였다. 반면에 세포 자살을 억제하는 Bcl2는 감소했다. Bcl2와 Bax 단백질은 미토콘드리아의 기능조절과 Cyt C의 방출에 중요하게 작용한다. 촉진된 Cyt C의 방출이 Caspase-3 단백질을 활성화하고, 이는 연쇄 반응으로 DNA의 손상을 일으켜 세포 자살을 유도한다. 이로써 RH 후 신경세포가 손상되는 과정에 세포 자살의 기전이 관여할 뿐만 아니라, 미토콘드리아의 항상성이 저하될 수 있음을 의미한다.

산화질소의 생산에 기여하는 nNOS가 증가하는 경향을 보였으며, 지질 산화 스트레스를 유발하는 4-HNE가 증가했다. 직접적으로 ROS의 수준을 측정하진 않았으나, 관여 단백질의 증가가 ROS를 증가시켜 산화 스트레스를 유발했을 것으로 생각된다. HSP70을 산화 스트레스의 표지로 사용하였으며, 증가하는 경향을 보였다. 반면 항산화제인 GPx4는 감소했으며, SOD2, Nrf2 또한 감소하는 경향을 보여 뇌의 전체적인 항산화 능력이 줄어든 것을 관찰했다. 또한 항산화제의 감소를 동반한 신경세포의 사멸을 촉진하는 HIF-1 α 의 발현이 증가하여 신경 변성에 영향을 줄 수 있는 요인이

증가한 것을 확인했다.

위 결과는 발현된 단백질의 양으로 기존 알츠하이머병의 뇌보다 RH를 겪은 뇌의 산화 스트레스 수준과 신경세포 손상 단백질이 증가하는 것을 보여준다. 반복적으로 혈당을 저하시켜 포도당 결핍을 유도했을 때 항산화제가 감소하고, ROS를 생성하는 인자가 증가하여 산화 스트레스가 유발된다. 또한 증식한 정상세포는 사이토카인(cytokine) 인자, ROS의 생성을 촉진하여 신경세포의 산화환원 상태를 불균형 하게 한다.^[40] 이는 증가한 산화 스트레스 수준과 더불어 신경세포 사멸 신호를 자극하고, 최종적으로 RH가 신경세포의 소실로 인한 치매 증상을 가속화할 것으로 사료된다.

저혈당증은 당뇨병 환자의 치매 역학을 조사하는 데에 중요한 요인으로, 그 부작용 때문에 당뇨병 치료를 강화하지 못하기도 한다. 인지기능 저하를 동반한 동물모델에서 저혈당증의 작용기전을 파악하는 것은 더 나은 치료전략과 예방에 도움이 될 것으로 생각된다. 추후 연구의 보완을 위해 염증반응, 산화 스트레스 관련 인자의 추가적인 연구와 단백질의 양적 변화로써 판단할 수 없는 신호전달기전을 파악하기 위한 조직학적 평가가 필요하다. 또한 정상 쥐에서 RH 후 인지기능의 저하에 대한 보고가 있으나,^[41] 알츠하이머병 모델에서는 확인된 바가 없다. RH를 유도한 알츠하이머병 모델과 기존 알츠하이머병 모델을 비교하여 인지기능 저하 정도를 평가하기 위한 적절한 행동실험이 요구된다.

참고문헌

1. Simon AM, Frechilla D, del Rio J. [Perspectives on the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol*. 2010;50(11):667-675.
2. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000;21(3):383-421.
3. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(1):134-147.
4. Rhee SY. Hypoglycemia and Dementia. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2017;32(2):195-199.
5. Poddar MK, Banerjee S, Chakraborty A, Dutta D. Metabolic disorder in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis*. 2021;36(5):781-813.
6. Bidzan L. Cardiovascular factors in dementia. *Psychiatr Pol*. 2022;56(5):991-1001.
7. Agiostratidou G, Anhalt H, Ball D, Blonde L, Gourgari E, Harriman KN, et al. Standardizing Clinically Meaningful Outcome Measures Beyond HbA(1c) for Type 1 Diabetes: A Consensus Report of the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Association of Diabetes Educators, the American Diabetes Association, the Endocrine Society, JDRF International, The Leona M. and Harry B. Helmsley Charitable Trust, the Pediatric Endocrine Society, and the T1D Exchange. *Diabetes Care*. 2017;40(12):1622-1630.
8. Donnelly LA, Morris AD, Frier BM, Ellis JD, Donnan PT, Durrant R, et al. Frequency and predictors of hypoglycaemia in Type 1 and insulin-treated Type 2 diabetes: a population-based study. *Diabet Med*. 2005;22(6):749-755.
9. Mohseni S. Neurologic damage in hypoglycemia. *Handb Clin Neurol*. 2014;126:513-532.
10. Suh SW, Hamby AM, Gum ET, Shin BS, Won SJ, Sheline CT, et al. Sequential release of nitric oxide, zinc, and superoxide in hypoglycemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(10):1697-1706.
11. Moreira PI. Alzheimer's disease and diabetes: an integrative view of the role of mitochondria, oxidative stress, and insulin. *J Alzheimers Dis*. 2012;30 Suppl 2:S199-215.
12. Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest*. 2007;117(4):910-918.
13. Cryer PE. Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1470-1473.
14. Wieggers EC, Rooijackers HM, Tack CJ, Heerschap A, de Galan BE, van der Graaf M. Brain Lactate Concentration Falls in Response to Hypoglycemia in Patients With Type 1 Diabetes and Impaired Awareness of Hypoglycemia. *Diabetes*. 2016;65(6):1601-1605.
15. Song Z, Routh VH. Recurrent hypoglycemia reduces the glucose sensitivity of glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus nucleus. *Am J Physiol Regul Integr*

- Comp Physiol. 2006;291(5):R1283-1287.
16. Zhou Y, Huang L, Zheng W, An J, Zhan Z, Wang L, et al. Recurrent nonsevere hypoglycemia exacerbates imbalance of mitochondrial homeostasis leading to synapse injury and cognitive deficit in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;315(5):E973-E986.
 17. Cardoso S, Santos RX, Correia SC, Carvalho C, Santos MS, Baldeiras I, et al. Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol Dis.* 2013;49:1-12.
 18. Mattishent K, Loke YK. Bi-directional interaction between hypoglycaemia and cognitive impairment in elderly patients treated with glucose-lowering agents: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab.* 2016;18(2):135-141.
 19. Yoo HJ. Management of Diabetes Mellitus in Demented Patients. *J Korean Diabetes.* 2012;13(3):145-147.
 20. Abdelhafiz AH, Rodriguez-Manas L, Morley JE, Sinclair AJ. Hypoglycemia in older people - a less well recognized risk factor for frailty. *Aging Dis.* 2015;6(2):156-167.
 21. Han E, Han KD, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Ko SH, et al. Severe Hypoglycemia Increases Dementia Risk and Related Mortality: A Nationwide, Population-based Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(5):e1976-e1986.
 22. Whitmer RA, Karter AJ, Yaffe K, Quesenberry CP, Jr., Selby JV. Hypoglycemic episodes and risk of dementia in older patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2009;301(15):1565-1572.
 23. Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, et al. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* 2012;1441:64-78.
 24. Čater M, Hölter SM. A Pathophysiological Intersection of Diabetes and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19).
 25. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* 2018;15:490-503.
 26. Guglielmotto M, Tamagno E, Danni O. Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *ScientificWorldJournal.* 2009;9:781-791.
 27. Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, HA AL, Bashatwah RM. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J Med.* 2018;50(3):193-201.
 28. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2014;42 Suppl 3:S125-152.
 29. Jurga AM, Paleczna M, Kadluczka J, Kuter KZ. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules.* 2021;11(9).

30. De Sousa RAL. Reactive gliosis in Alzheimer's disease: a crucial role for cognitive impairment and memory loss. *Metab Brain Dis.* 2022;37(4):851-857.
31. Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(8):924-929.
32. Thorns V, Hansen L, Masliah E. nNOS expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1998;150(1):14-20.
33. Markesbery WR, Lovell MA. Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1998;19(1):33-36.
34. Hardas SS, Sultana R, Clark AM, Beckett TL, Szweda LI, Murphy MP, et al. Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain. *Redox Biol.* 2013;1(1):80-85.
35. Aminova LR, Chavez JC, Lee J, Ryu H, Kung A, Lamanna JC, et al. Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line. *J Biol Chem.* 2005;280(5):3996-4003.
36. Sulzbacher MM, Ludwig MS, Heck TG. Oxidative stress and decreased tissue HSP70 are involved in the genesis of sepsis: HSP70 as a therapeutic target. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2020;32(4):585-591.
37. Song T, Song X, Zhu C, Patrick R, Skurla M, Santangelo I, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. *Ageing Res Rev.* 2021;72:101503.
38. Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochem Int.* 2013;63(4):331-343.
39. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;7(2):a020420.
40. Heneka MT, Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):189-211.
41. McNay EC, Sherwin RS. Effect of recurrent hypoglycemia on spatial cognition and cognitive metabolism in normal and diabetic rats. *Diabetes.* 2004;53(2):418-425.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) patients are more likely to experience hypoglycemia than people who do not have AD, due to cognitive impairment, a characteristic of Alzheimer's disease, and difficulty in blood sugar control. Hypoglycemia is a condition in which blood sugar is below 54 mg/dL, and if it persists for a long time, it can cause non-convulsive seizures, coma, and rigidity, and lead to death. It also induces neuronal cell death due to mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress, and causes synaptic loss, leading to cognitive decline. This study investigated the effects of recurrent hypoglycemia (RH) on neuronal damage by administering insulin to 3-4-month-old Alzheimer's disease animal models every other day. The control group was a model with Alzheimer's disease only, and the experimental group was a model with Alzheimer's disease and recurrent hypoglycemia, in which severe hypoglycemia was induced by insulin.

As a result, it was confirmed that the brain that experienced RH had increased oxidative stress and proteins associated with neuronal damage compared to the brain of existing Alzheimer's disease. When the overall protein levels in the brain were compared after RH by western blot, the proteins that make up the nucleus and axon of neurons decreased, and the protein levels of synaptic vesicles and postsynaptic neurons decreased. Reactive astrocytes, which have pathological characteristics and are involved in the homeostasis and function of the brain along with neurons, increased. Proteins that contribute to apoptosis increased, and proteins that inhibit apoptosis decreased. In addition, proteins that contribute to lipid oxidative stress and the production of nitric oxide (NO), and factors that indicate the external stress level of neurons were increased. On the other hand, antioxidants that reduce the level of oxidative stress decreased.

These results suggest that repeated energy deficiency in the brain increases the level of oxidative stress in addition to suppressing antioxidant function, leading to neuronal damage. RH also contributes to gliosis, one of the symptoms of Alzheimer's disease. Therefore, it suggests that RH can be a risk factor for accelerating the progression of Alzheimer's disease. The results of this study, which were obtained by investigating the changes in the protein levels of the whole brain, will be used as important information for research on the clear signaling pathways between related proteins and functional symptoms. It is also expected to contribute to delaying or preventing the progression of cognitive decline caused by hypoglycemia.

Keyword: Alzheimer's Disease (AD), Recurrent Hypoglycemia (RH), Neuronal damage

Abbreviation	Full name	Dilution	Cat. no	Company	Country
NeuN (FOX3)	Neuronal nuclear protein	1:1000	200-301-X09	Rockland	USA
MAP2	Microtubule associated protein 2	1:500	4542	Cell signaling	USA
SYP	Synaptophysin	1:5000	SC-9116	Santa cruz	USA
PSD95	Postsynaptic density 95	1:1000	51-6900	thermo	USA
β -actin	Beta actin	1:1000	SC-47778	Santa cruz	USA
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	1:1000	MAB360	MILLIPORE	USA
4-HNE	4-Hydroxynonenal	1:500	BS-6313R	bioass	USA
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	1:500	MAB1536	R&D SYSTEM	USA
HSP70	Heat shock protein 70	1:500	ADI-SPA-810	Enzo	USA
GPx4	glutathione peroxidase 4	1:500	sc-166570	Santa Cruz	USA
SOD2	Superoxide dismutase 2	1:500	sc-137254	Santa cruz	USA
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	1:1000	PA5-88084	Thermo	USA
Cyt C	Cytochrome C	1:1000	sc-8385	Santa Cruz	USA
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2 protein.	1:500	sc-7382	Santa Cruz	USA
Bax	Bcl2 Associated X	1:1000	sc-7480	Santa Cruz	USA
	Cleaved Caspase-3	1:1000	9661S	Cell Signaling	USA

Table 1. Used primary antibody for western blot

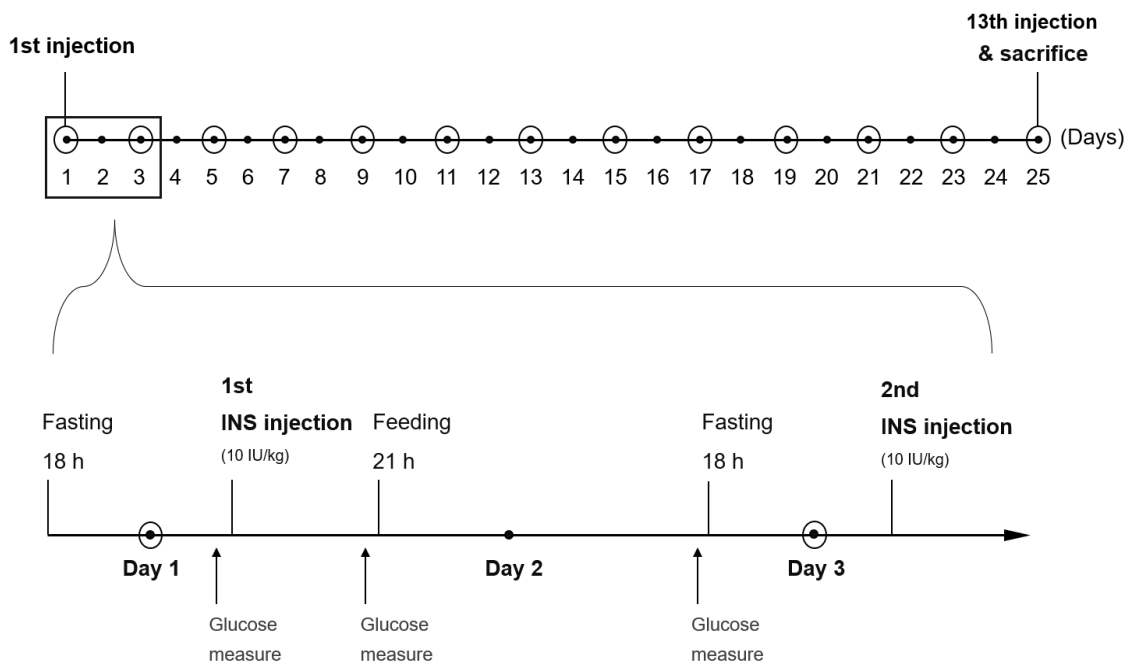


Figure 1. Schematic diagram of INS injection

Mice were fasted for 18 hours, then injected with 10 IU/kg insulin intraperitoneally. Behavior was observed for 3 hours, then mice were allowed to eat freely for ~21 hours to recover. This cycle was repeated for a total of 13 RH episodes. The mice were sacrificed after the 13th injection.

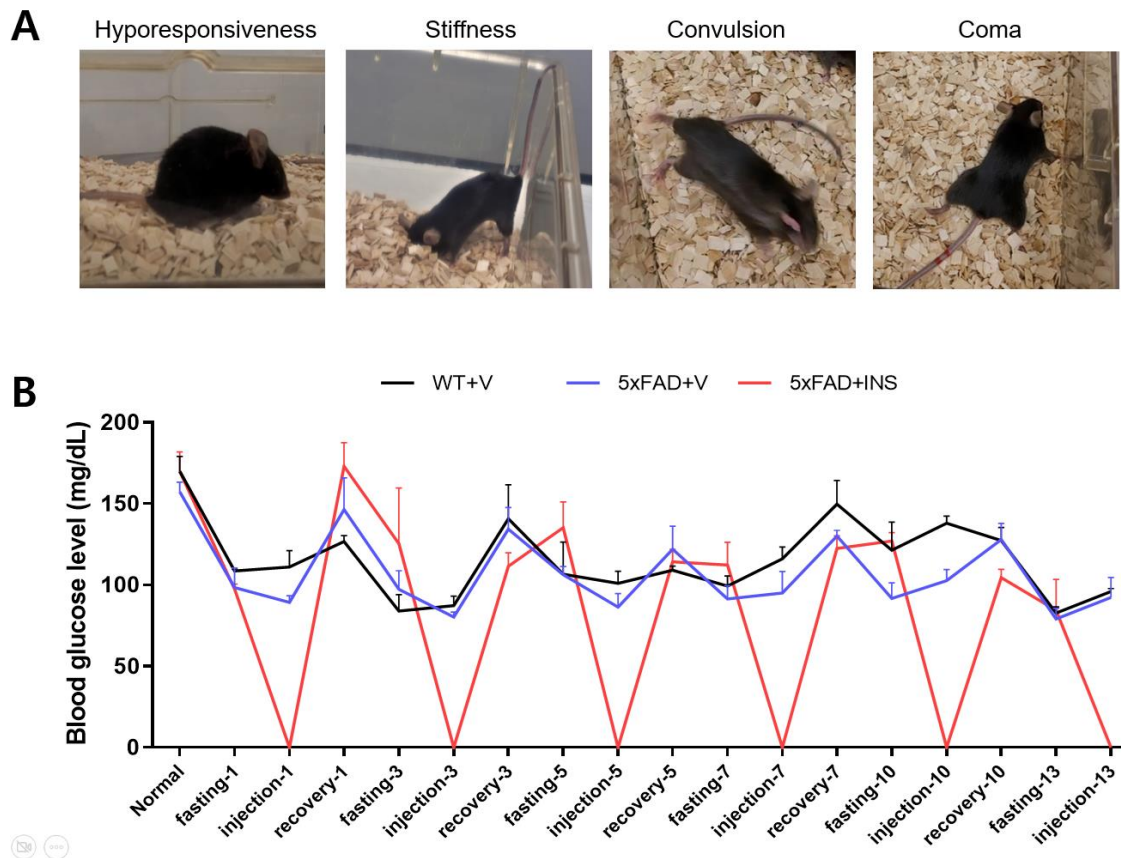


Figure 2. Blood glucose level and behavioral changes caused by hypoglycemia

(A) The four images show the behavior of Alzheimer's disease mice after induction of hypoglycemia. The behavior was observed with the naked eye. The symptoms began within 30 minutes of induction and were characterized by rigidity and convulsions, followed by a coma that extended for more than 6 hours. (B) The above line chart shows descent of INS treated group's blood glucose level. X-axis means situation in each injection number-the number. Y-axis means blood glucose levels (mg/dL) of mouse. All animals showed a decrease in blood glucose levels to below 9 mg/dL after injection ($p < 0.001$), indicating hypoglycemia. Data are presented as mean \pm SEM.

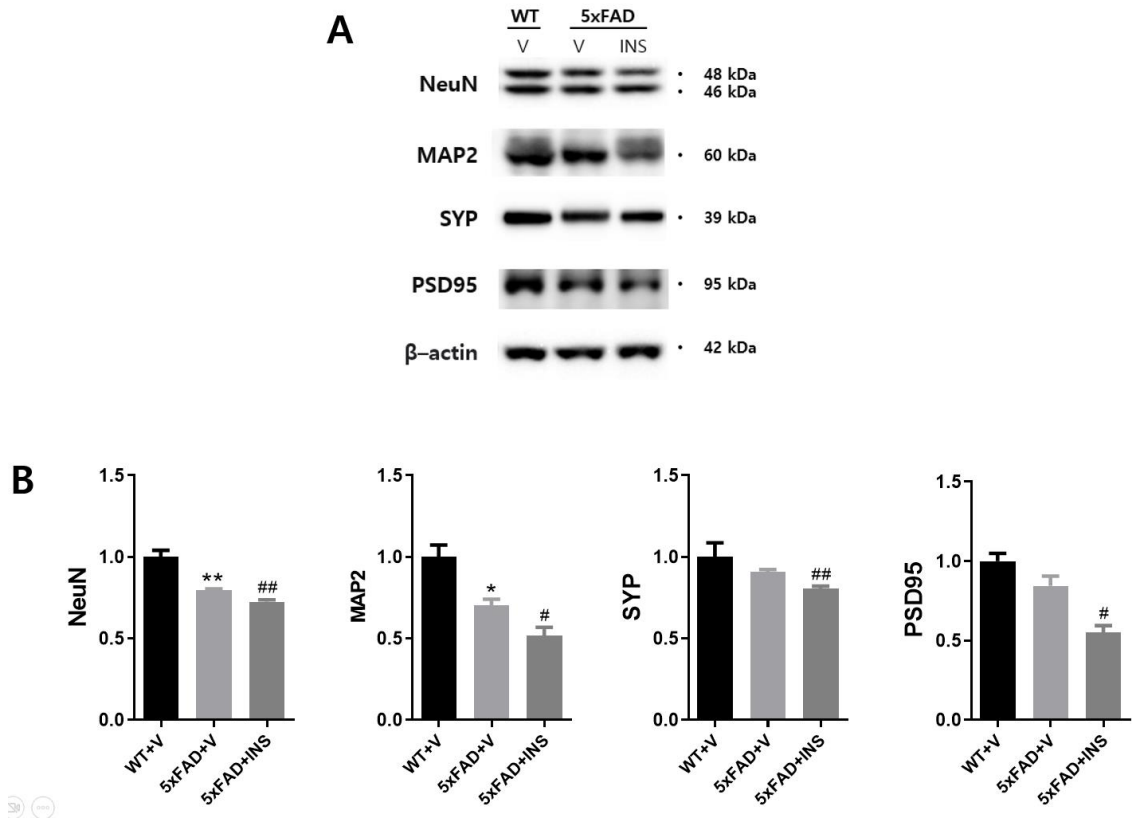


Figure 3. Diminished protein level of neuronal and synaptic activity

(A) Changed level of NeuN, MAP2, SYP, PSD95 and β -actin in whole brain lysate of WT+V, 5xFAD+V and 5xFAD+INS mouse model by western blot. (B) The optical density of NeuN, MAP2, SYP and PSD95 in western blot result. Graph shows that slightly decreased level of NeuN, MAP2, SYP and PSD95 protein in 5xFAD+INS compared with 5xFAD+V. All results are triplicated and normalized with a loading control. The bar graphs in (B) represent the mean \pm SEM values (* $/$ # $p < 0.05$, ** $/$ ## $p < 0.01$).

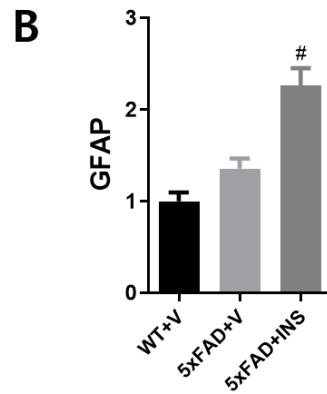
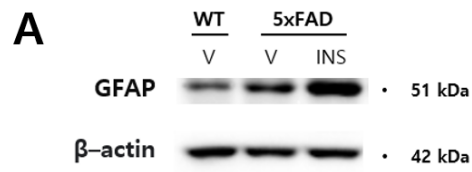


Figure 4. Effect of RH on GFAP expression

(A) Image shows GFAP expression level in whole brain lysate of WT+V, 5xFAD+V and 5xFAD+INS mouse model by western blot. (B) The optical density of GFAP in western blot result. Graph shows that GFAP level after RH increased by nearly two compared with prior to. All results are triplicated and normalized with a loading control. The bar graphs in (B) represent the mean \pm SEM values ($\#p < 0.05$).

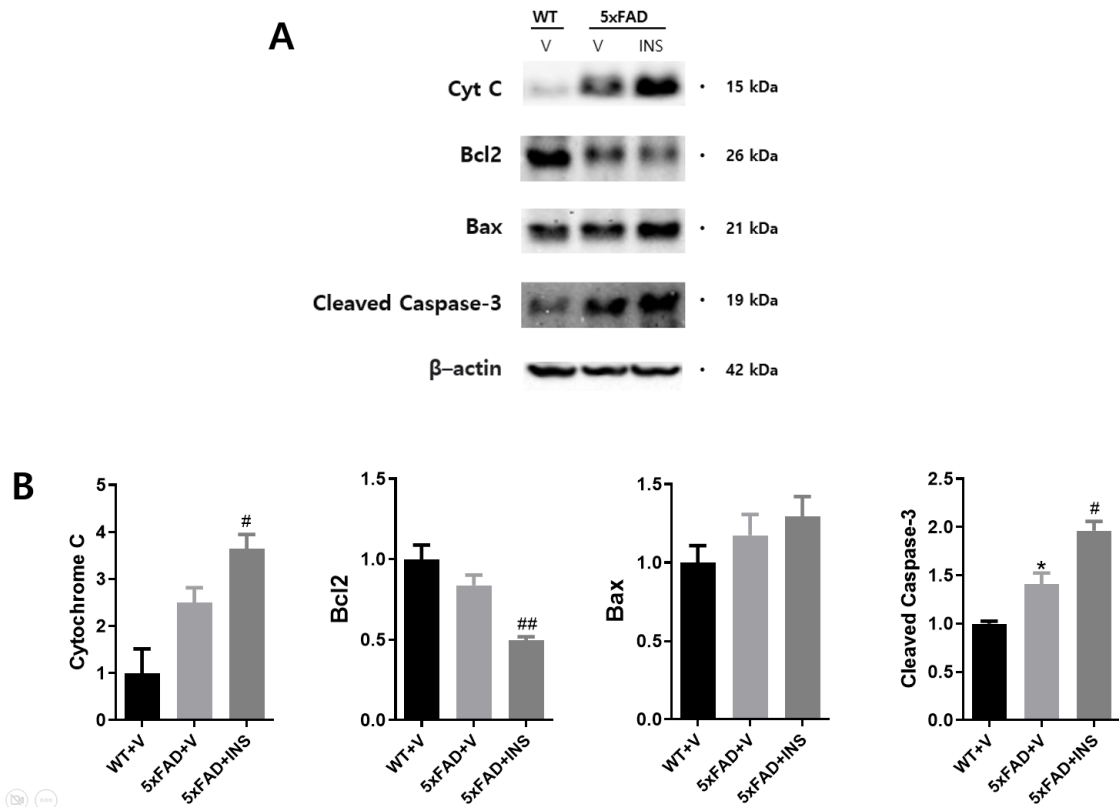


Figure 5. Effect of RH on apoptosis-related proteins expression

(A) Western blot images representing the expression of cleaved Caspase-3, Bcl2, Bax, Cyt C and β -actin. (B) The optical density of cleaved Caspase-3, Bcl2, Bax and Cyt C in whole brain lysate of WT+V, 5xFAD+V and 5xFAD+INS mouse model by western blot result. Graph shows that Cyt C and cleaved Caspase-3 were increased in 5xFAD+INS model, Bcl2 was declined in 5xFAD+INS model. Bax was prone to increase ($p > 0.05$). All results are triplicated and normalized with a loading control. The bar graphs in (B) represent the mean \pm SEM values ($*p < 0.05$, $##p < 0.01$).

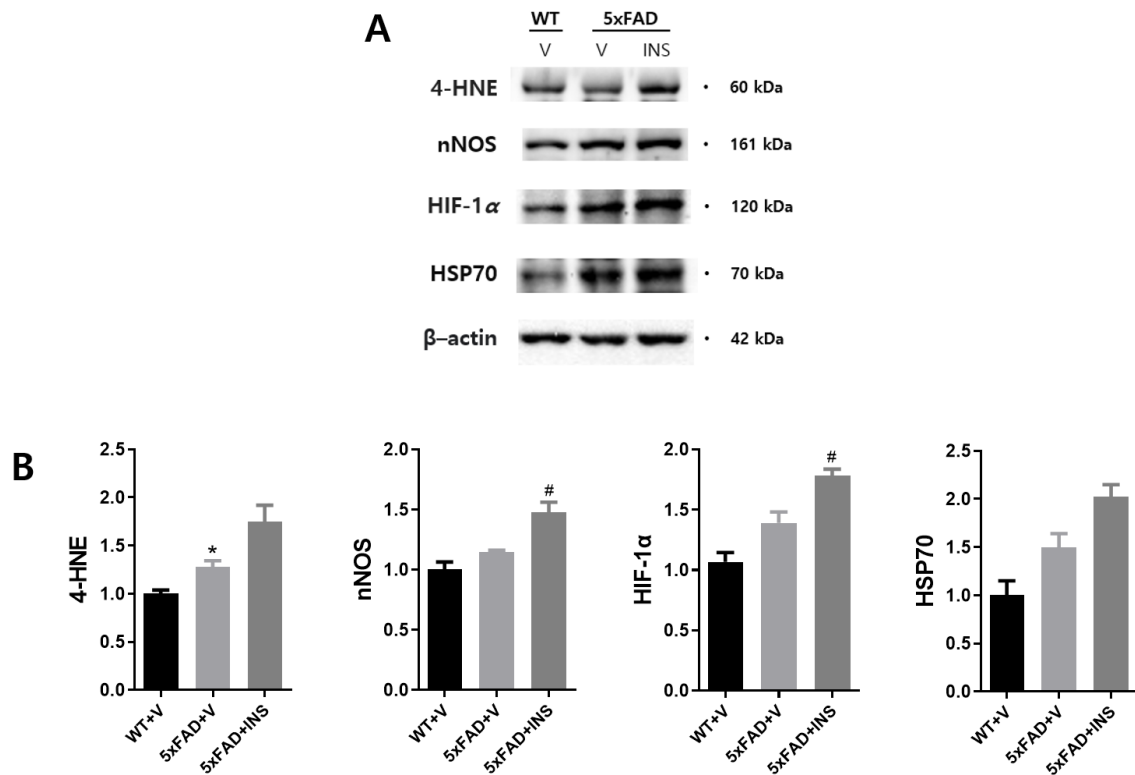


Figure 6. Protein levels of 4-HNE, nNOS, HIF-1 α , HSP70 after RH

The above figure shows the expression of factors related with oxidative stress response. (A) Western blot images representing the expression of 4-HNE, nNOS, HSP70, HIF-1 α and β -actin. (B) The optical density of 4-HNE, nNOS, HSP70 and HIF-1 α in whole brain lysate of WT+V, 5xFAD+V and 5xFAD+INS mouse model by western blot result. All results are triplicated and normalized with a loading control. The bar graphs in (B) represent the mean \pm SEM values (*/# $p < 0.05$).

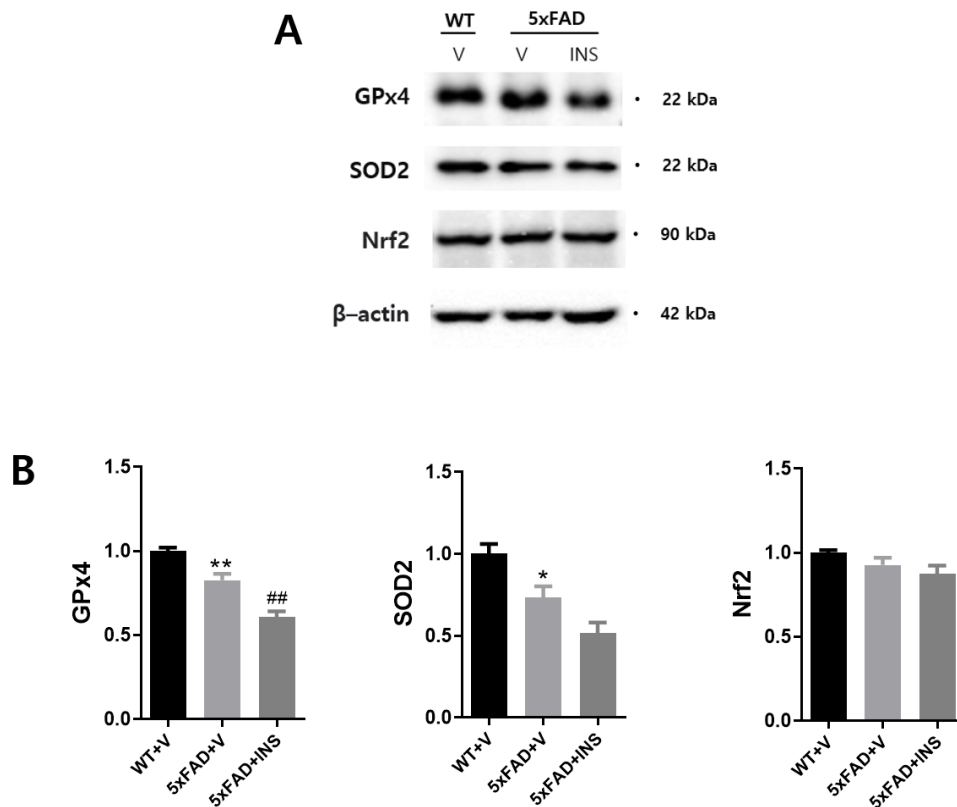


Figure 7. Reduction of antioxidant after RH

GPx4, SOD2, Nrf2 and β -actin in whole brain lysate of WT+V, 5xFAD+V and 5xFAD+INS mouse model by western blot. (A) Western blot images representing the protein expression of GPx4, SOD2, Nrf2 and β -actin. (B) The optical density of GPx4, SOD2 and Nrf2 in western blot result. The antioxidants were gradually diminished in 5xFAD+V and 5xFAD+INS. All results are triplicated and normalized with a loading control. The bar graphs in (B) represent the mean \pm SEM values (* p < 0.05, **/## p < 0.01).