

Scopolamine으로 인한 건망증 모델에서 sucralose의 기억력 및 인지기능 완화 효과

정은미^{1*} · 이은홍¹ · 권현지² · 이지혜³ · 김혜정¹ · 박진한⁴ · 이종원⁵ · 정지욱^{6,†}

¹ 대구한의대학교 일반대학원 제약공학과, 학생
² 건국대학교 일반대학교원 첨단중개의학과, 학생
³ 대구한의대학교 산학협력단, 박사 후 연구원
⁴ 대구한의대학교 화장품제약대학 K-뷰티학부, 교수
⁵ 대구가톨릭대학교 의과대학 생화학교실, 교수
⁶ 대구한의대학교 일반대학원 제약공학과, 교수
(2023년 12월 27일 접수; 2023년 12월 29일 채택)

Effects of sucralose on memory and cognitive function relief in a scopolamine-induced amnesia model

Eun-mi Jung^{1*} · Eunhong Lee¹ · Hyun-Ji Kwon² · Jihye Lee³ · Hye-jeong Kim¹
Jinhan Park⁴ · Jongwon Lee⁵ · Ji Wook Jung^{6,†}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu haany University, Korea
²Advanced Translational Medicine, Konkuk University, Korea
³Daegu Haany University Industry Academic Cooperation Foundation, Korea
⁴Department of K-Beauty Business, College of Cosmetics and Pharm, Daegu Haany University
⁵Department of Biochemistry, School of Medicine, Daegu Catholic University
⁶Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu haany University
(Received December 27, 2023; Accepted December 29, 2023)

요 약 : Sucralose는 식품 분야에서 sucrose 대체물로 사용되며 세계적으로 승인된 무열량 고강도 인공 감미료이다. 하지만 감미료가 뇌에 미치는 영향에 대한 조사는 미비하여 본 연구에서 scopolamine으로 유발된 기억력 손상 동물모델에서 sucralose 단기 섭취가 인지 및 기억 보호 효과를 가지는지 확인하였다. Sucralose 2, 5, 10 mg/kg를 경구투여하였으며 30분 후 대조군, 약물군에 scopolamine (1mg/kg) 복강투여를 진행하였고 정상군에는 식염수로 복강투여 후 행동실험을 수행하였다. 결과적으로 Y-maze, passive avoidance, Morris water maze에서 대조군과 비교해 10% 이상의 인지기능이 회복되는 결과를 도출하였다. 또한, 전염증성 사이토카인을 측정한 결과 sucralose가 IL-6와 TNF- α 를 30% 이상 억제하는 것을 보였으며 세포 내 신호 메커니즘으로 ERK-CREB의 발현량을 관찰한 결과 농도 의존적으로

[†]Corresponding author
(E-mail: jwjung@dhu.ac.kr)

증가하였다. 따라서 sucralose는 건망증 환자의 예방과 치료를 위한 기능성 식품과 관련이 있다고 시사된다.

주제어 : 건망증, 스코폴라민, 항염증, 인공 감미료, 수크랄로스

Abstract : Sucralose is used as a sucrose alternative in the food sector and is a globally approved pyrogenic, high-intensity artificial sweetener. However, due to the lack of studies on the effects of sweeteners on the brain, this study confirmed whether short-term consumption of sucralose has cognitive and memory protective effects in scopolamine-induced memory-injured animal models. After oral administration of sucralose 2, 5, and 10 mg/kg, scopolamine (1 mg/kg) was administered to the control group and the drug group 30 minutes later, and saline was administered intraperitoneally to the normal group, followed by behavioral experiments. As a result of the experiment, Y-Maze, passive avoidance, and Morris WaterMaze recovered more than 10% of cognitive function compared to the control group. In addition, as a result of measuring proinflammatory cytokines, sucralose was found to inhibit IL-6 and TNF- α by more than 30%, and we observed that the expression level of ERK-CREB with intracellular signaling mechanisms increased in a concentration-dependent manner. Therefore, it suggests that sucralose is associated with functional foods for the prevention of functional food patients.

Keywords : amnesia, scopolamine, anti-inflammatory, artificial sweeteners, sucralose

1. 서론

기억상실증(amnesia)은 기억을 유지 및 조절에 관여하는 해마와 피질의 장애를 의미하며, 신경 및 대사 장애를 동반하는 대표적인 증상으로는 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)이 있다 [1-2]. AD는 초기 단계에 단기 기억 및 장기 기억 손상으로 나타나며 기억상실, 지적 기능 저하, 언어기능 저하, 불규칙한 보행 등의 증상이 있다고 알려져 있고, 노년층의 비율이 매년 증가함에 따라 유병률도 급상승해 문제를 해결하고자 치료제 개발을 위한 연구들이 진행 중이다. 또한 현재 다양한 새로운 치료법이 개발되었으나 AD의 치료법은 예방은 가능하나 완치는 어려운 문제로 알려져 있다 [3-5]. 이러한 연구들 가운데 염증성 이론과 ERK-CREB 기전에서 해마의 신경 발생 및 인지기능에 영향을 준다고 제기되었다 [6-7]. 세포 성장과 신호전달에 관여하며 인지기능에 중요한 역할을 하는 세포 외 신호 조절 키나아제(ERK) 경로는 장기 기억 및 학습 기억형성에도 중요한 역할로 알려져 있다. ERK가 인산화되어 활성화된 pERK가 cAMP반응 요소 결합 단백질(CREB)과 연결되어 해마의 장기 기억을 유지해

준다고 알려져 있으며, 이러한 기전을 바탕으로 scopolamine 모델, 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 모델 등에서 신호전달과 기억 간의 관계를 분석하기 위해 연구되고 있다. 그 결과 ERK-CREB의 경로가 활성화되어 학습 및 기억 상실을 개선시킨다고 보고하였다 [8-9].

전염증성 사이토카인 신호전달은 AD와 밀접한 관련이 있으며 세포 사멸을 유발하는 면역 매개체의 방출을 유도한다 [10]. 특히 신경 염증반응에서 IL-6는 초기 아밀로이드 플라크 형성과 타우 과인산화를 증가시키고 시냅스를 손실시켜 기억 장애와 연결되어 있으며, TNF- α 는 중추신경계 발달 및 신경 가소성, 인지 및 행동을 포함한 기능에서 중요한 역할을 하여 문제가 일어날 경우 해마의 비정상적인 발달 및 인지기능의 장애로 이어진다 [11-12]. 이러한 메커니즘에 따라 IL-6, TNF- α 등 다양한 신경염증 유발 인자에 대한 억제제를 치매 치료제로 사용하기 위해 임상 4단계 시험 중에 있다 [13].

무스카린성 수용체의 활성화는 기억력 감퇴와 관련된 인지 결핍을 개선하는 접근법으로 수용체 길항제인 스코폴라민(scopolamine)은 주로 눈, 위장관, 심장, 타액 및 기관지 분비선에 대한 영향

으로 부교감 활동 감소가 필요한 상태에서 사용된다[14]. 또한, 스코폴라민은 신경과학 연구에서 밝혀진 바에 의하면 혈뇌장벽(Blood-brain Barrier)을 쉽게 투과해[15] 인지 장애 및 신경독소 모델을 정립하기 위해 사용되어 기억상실을 일으키며 이로 인한 생리 및 병리학적 변화를 연구하는 데 사용된다[16].

감미료는 식품 제조에서 단맛을 부여하기 위해 사용되는 물질로써 최근 열량이 낮고 당 함량이 높아 설탕 대체물로 소비되고 있다[17]. 이러한 단맛을 지닌 무열량 감미료 중 가장 주목할 만한 것은 acesulfame potassium(Ace K), aspartame, cyclamate, saccharin, sucralose, neotame 및 steviol glycosides 등이 있으며 이러한 감미료들을 고용량의 단기투여하였을 경우 소화기관 연구에서 혈당조절, 인슐린 저항성 등 논란의 여지가 있다고 보고하였다[18-19]. 특히 acesulfame potassium(Ace K), aspartame의 경우 신경인지 및 신경생물학적 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있으며, 최근 연구에서는 장내 미생물의 구성을 변화시켜 혈당조절을 악화시켰고, 고용량으로 섭취 시 인지 및 해마에 해로운 영향에 대해 발표하였다. 다만, 저용량으로 섭취 시 부정적인 영향을 미치지 않으며, 오히려 체중 감소, 칼로리 조절, 혈압과 관련하여 무관 등에서 유의미한 차이가 나지 않다고 보고되었으며[20-21], 시상하부를 포함한 몸 전체에 분포된 미각 수용체와의 결합을 통한 소량의 단맛은 대사 및 행동 반응에 관여한다고 알려져 있다.

수크랄로스(Sucralose)는 설탕을 기본 골격으로 3개의 수산기를 염화 이온으로 치환한 구성이며 설탕보다 600배 더 단맛을 나타내며 세계적으로 승인된 무열량 고강도 감미료이며, 대부분 식품 및 음료에 첨가됨으로써 일반 식품 성분으로 알려져 있다[22]. 또한, 설탕 섭취를 줄여 칼로리 감소, 체중 관리에 도움을 주는 것으로 높은 온도의 조리 및 베이킹 후에도 구조 변형 없이 제품의 단맛 수준을 유지하여 소비자의 관심이 증가하는 추세이다[23]. 이러한 관심들로 인해 sucralose가 체내의 작용기전을 알아보고자 연구한 결과 저용량으로 섭취할 시 체중증가 개선, 인슐린 신호전달 억제, 뇌 에너지의 항상성 및 식욕을 조절하는 뇌 회로에 영향을 주지 않는 등의 긍정적인 연구들이 보고되었다[24-26]. 최근에는 인공 감미료의 일부 및 당과 관련한 미각 수용체와 구조적인 결합으로 인해 에너지 항상성,

기억력 개선 등의 보고 되었다[27-28].

이에 본 연구에서 저용량으로 섭취 시 sucralose의 기억력 및 인지기능 보호 효과를 체계적으로 검토하고자 sucralose 투여 후 scopolamine으로 기억력 저하를 일으킨 동물모델에서 행동실험인 Y-maze, passive avoidance test(PAT) 및 Morris water maze(MWM)을 통해 행동 변화를 확인하고 체내 cytokine, 해마 내 ERK/CREB 기전의 변화를 조사하였다.

2. 실험

2.1. 재료

본 실험에 사용된 수크랄로스(sucralose), donepezil 및 scopolamine은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매했고, sucralose와 scopolamine은 상온 보관, donepezil은 냉동 보관 후 모든 재료는 생리식염수(saline 0.9%)에 용해시켜 동물에게 투여하였다.

2.2. 실험동물

Male ICR mouse 4주령을 DBL(Chungbuk, Korea)로 공급받아 일주일 동안 순환기를 거쳐 실험에 투입하였다. 사육시설에서 식이와 물은 자율적으로 섭취하였으며 온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 조명시간 09:30 ~ 21:30(12시간 주기)로 환경을 유지하였다. 실험 동물에게 시료로 sucralose 및 양성대조군으로 donepezil 5 mg/kg를 단회 경구 투여하고 30분 뒤 scopolamine 1 mg/kg를 복강 투여하여 기억력을 손상시키고 30분 뒤 행동 실험을 진행하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 사전심사와 윤리규정을 준수하여 수행하였다(승인번호:DHU2022-077).

2.3. Y-미로 시험 (Y-maze test)

Y-maze test는[29] 측정 장비로 세 개의 가지로 구성되었으며 각 가지의 길이는 42cm, 넓이는 3cm, 높이는 12cm이고 세 개의 가지가 접힌 각도는 120° 로 제작하였다. 장치는 검은색의 polyvinyl plastic을 사용했으며 각 가지 부분을 A, B, C 구역으로 정해 실험을 진행하였다. 한 구역에 한 마리의 동물을 넣어 8분간 실험동물의 꼬리까지 각 가지에 들어간 횟수와 성공률을 1점(실제 변경, actual alternation)씩을 부여하였으며

변경행동력(alternation behavior)은 각 구역을 겹치지 않는 부분을 정의하였고 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

$$\text{자발적 변경 행동력(Spontaneous alteration, \%)} \\ = \frac{\text{실제 변경(actual alternation)} / \text{최고변경(maximum alternation)} \times 100}{(\text{최고변경} : \text{총 입장횟수} - 2)}$$

2.4. 수동 회피 시험 (Passive avoidance test, PAT)

Passive avoidance test는[30] Gemini(San Diego Instruments, San Diego, USA)를 이용해 실험을 진행하였다. 수동회피 상자는 암실과 명실로 나누어져 있으며, 명실에서 암실로 이동하는 실험동물의 습성을 활용해 명실에서 암실로 넘어간 순간을 측정하고 즉시 5초 0.3 mA 조건의 전기충격을 가하였다. 전기충격을 가한 24h 이후 다음 날 실험동물을 명실에 다시 넣게 되면 정상군의 경우 암실에서 전기충격을 기억하여 명실에 머무르는데 이러한 체류 시간(step-through latency)을 각 군을 측정해 기억력을 평가하였다.

2.5. 수중 미로 시험 (Morris water maze test, MWM)

Morris water maze test는[31] 원형으로 제작된 지름 90cm, 높이 45cm의 수조에서 4개의 구역을 나누어 한 구역에 지름 9cm, 높이 25cm 정도로 제작된 도피대를 설치하여 21±3°C 정수로 가득 채웠으며 도피대는 1 cm 정도 위만큼 채워진 상태였다. 이후 실험동물의 도피대 탐색 시간을 측정하였고, 원형 수조의 4개의 구역에 각 표지판을 설치해 4일간 입수 위치를 다르게 선정하여 총 4번씩 반복 학습하였다. 총 120초간 진행되었으며 60초 안에 도피대를 찾으면 실험을 완료하였다. 다만 찾지 못한 경우에는 도피대의 위치에서 10초간 머무르게 하였다. 실험 마지막 날 도피대를 제거해 학습능력을 확인하기 위해 60초간 도피대 제거 구역의 체류 시간을 측정하였다. 또한, 모든 실험에선 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을 이용해 기록 및 측정해 평가하였다.

2.6. Cytokine 측정

Cytokine 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법[32]으로 측정하였으며, 모든 행동실험이 끝난 후 실험동물의 복강 내에 혈액

을 뽑아내 상온에 1시간 동안 방치하고, 원심분리기 20분간 RPM 14,000에서 혈청을 분리한다. 이후 96 well plate에 capture antibody를 PBS(pH 7.4)에 희석 후 각 well에 100 μl씩 분주하여 24시간 이상 코팅하였고, 24시간이 지난 well을 0.1% tween 20이 함유된 PBS를 3번 washing하여 10% FBS를 100 μl 분주하였다. 1시간 blocking 후 혈청을 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. 이후 washing하고 detection antibody를 각 well에 100 μl씩 분주하여 1시간 방치한 다음 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate enzyme reagent를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시키고 재세척하였다. 이후 1N HCl 용액을 첨가하여 ELISA reader을 이용해 405nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

2.7. Western blot

MWM 실험이 끝난 직후 실험동물의 뇌를 적출하여 해마를 분리하였다. 해마 부분의 단백질을 정량하여 12% polyacrylamide gel에 전기영동시켜 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane으로 이동시켰다. Membrane을 5% skim milk로 1시간 blocking 후 1차 항체(pERK, ERK, pCREB, CREB)와 함께 4°C에서 24시간 방치하였다. 다음 날 10분간 3회 tris-buffered saline with 0.1% tween 20(TBST)로 washing 후 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 반응시켜 해당하는 각각의 단백질을 LAS 4000 mini system(GE Healthcare, VA, USA)을 사용해 촬영하여 관찰하였다.

2.8. 통계 처리

본 연구에서 모든 실험 결과는 mean ± standard error of mean(SEM)으로 표시하였고 분석은 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 일원 배치분산분석(one-way analysis of variance)을 해 Newman-Keuls test로 사후 검증을 하였다. 군들 간의 평균 차이에 대해 통계적으로 *p*-value<0.05 미만일 경우 유의하다고 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Y-maze test

최근 제로칼로리 또는 저열량 식품을 섭취하는

것을 선호하는 추세에 따라 인공 감미료에 대한 연구가 활발하다[33]. 그 중 sucralose는 설탕과 동일한 단맛을 내어 시장에서 가장 많이 유통되는 감미료 중 하나이나[34] 뇌 내 신호전달 변화 메커니즘은 알려지지 않아 본 연구에서 sucralose가 단기 섭취가 기억력에 미치는 영향을 확인하고자 순차적인 행동 능력을 평가하는 Y-maze test를 진행하였다.

실험 결과 정상군인 normal(NOR)군의 변경행동률은 $75.5 \pm 1.1\%$ 이며 scopolamine 투여한 control(CON)군의 변경행동률은 $50.9 \pm 1.7\%$ 로 감소하여 기억 손상이 유발된 것을 확인할 수 있었으며($p < 0.001$), sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine 복강 투여한 실험군에선 $54.8 \pm 2.8\%$, $62.5 \pm 2.7\%$, $65.6 \pm 2.9\%$ 로 농도 의존적으로 변경행동률이 향상하여 scopolamine으로 유도된 인지기능 저하가 회복 양상을 보임을 알 수 있었다($p < 0.01$, $p < 0.001$). donepezil (DNPZ)을 경구 투여 후 scopolamine을 복강 투여한 양성대조군인 DNPZ군은 $70.8 \pm 1.7\%$ 로 나타났다($p < 0.001$)(Fig. 1A). 또한, 모든 실험군에서 가지 끝에 입장한 총횡수 값이 군간 차이를 보이지 않아 약물이 행동력 변화 없이 기억력 손상과 회복을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 그러므로 scopolamine으로 유도한 기억력 손상 모델에서 sucralose가 단기 기억력을 완화된 것을 확인하였다.

Sucralose의 경우 미각 수용체에 반응하는 것으로 시상하부에 분포된 단맛 수용체와 결합하여 뇌 포도당 감지, 에너지 항상성에 관여한다고 알려져 있다[35-36]. 이러한 내용을 토대로 sucralose가 뇌에 영향을 주는 것으로 판단하여 이에 본 실험 결과 sucralose를 투여가 단기 기억력을 개선됨을 확인하였다.

3.2. Passive avoidance test (PAT)

Passive avoidance test는 대부분의 콜린성 경로와 관련된 인지기능 장애 모델에서 많이 사용되는 방법의 하나며, 어두운 곳에 머무르려고 하는 쥐의 습성을 이용한 실험으로 해마 부분에서 조건화된 기억의 변연계와 관련되어있다. 이에 본 실험은 단기 섭취로 인한 기억력 개선을 확인하고자 행동평가를 시행하였다.

정상군인 NOR군의 명실에 체류 시간은 279.8 ± 7.2 초인 반면 scopolamine 투여한 CON군의 명실에서 체류 시간이 53.6 ± 3.2 초로 감소함을 확인하였고($p < 0.001$), sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine을 복강 투여한 실험군에서 73.3 ± 4.4 초, 136.6 ± 5.4 초, 184.5 ± 7.0 초로 체류시간이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있어 scopolamine으로 인해 감소된 명실에서 체류하는 시간이 다시 증가하여 sucralose 단기투여로 인해 인지기능이 개선됨을 알 수 있었다($p < 0.001$). 양성대조군인 DNPZ를 경구 투여 후

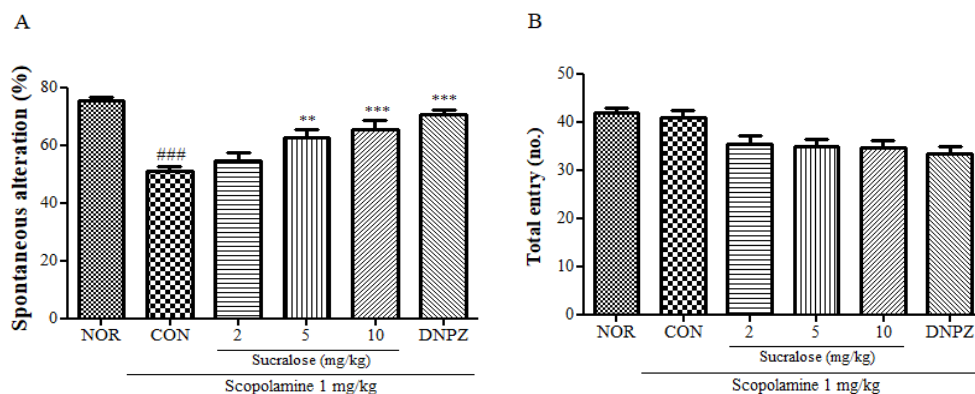


Fig 1. Effect of sucralose on Y-maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were treated with sucralose 1h before the test. A: spontaneous alteration, B: total entry. Data represent means \pm SEM(n=7). ### $p < 0.001$ as compared with the NOR group, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the CON group.

scopolamine을 복강 투여한 DNPZ군은 250.6 ± 13.7 초로 나타났다($p < 0.001$)(Fig. 2).

Kim 등의 인지 개선 실험[37]에서 Casticin에 대한 효과를 확인하고자 수행한 working memory ability에서는 단기투여에서 기억력 개선을 보고하였다. 이를 통해 scopolamine으로 유도한 기억력 손상 모델에서 sucralose 단기 투여해 확인한 결과 농도 의존적으로 기억 손상을 회복 시킴으로써 이는 sucralose 단기투여가 인지기능을 회복시키는 것을 판단하였다.

3.3. Morris water maze test (MWM)

MWM은 1981년 신경과학자 Richard G. Morris에 의해 처음 설립되었으며 장기 공간 학습 및 기억 평가로 해마 의존 학습을 확인하는 연구로[38] 이에 본 연구에서 인공 감미료 중 sucralose 단기투여가 기억력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MWM를 진행한 결과, scopolamine을 투여하여 기억 손상을 일으킨 CON군의 도피대 탐색 시간은 첫날과 마지막 날을 비교하였을 때 비슷한 수준이지만 정상인 NOR군에서는 학습이 진행됨에 따라 감소한 것을 확인하였으며, 이는 기억력 손상을 일으키지 않은 NOR군은 CON군과 달리 원통 안의 도피대 위치를 기억함을 의미한다. 실험 수행 1시간

전 sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여한 실험군의 경우 교육이 진행됨에 따라 도피대를 찾아가는 시간이 감소하는 것으로 보아 sucralose가 scopolamine으로 유도된 기억 손상을 농도 의존적으로 개선된 것을 확인할 수 있었다. 양성대조군인 DNPZ을 경구투여한 DNPZ군 또한 시간이 감소하였음을 확인하였다(Fig. 3A). 도피대를 제거 후 수행한 probe test에서 NOR은 도피대 구역에서 체류 시간이 42.0 ± 1.2 초에 비해 CON군은 23.4 ± 3.2 초로 감소함으로 scopolamine으로 인한 동물모델이 잘 정립되었으며($p < 0.001$), sucralose 2, 5, 10 mg/kg 투여군에서 31.31 ± 3.1 초, 37.12 ± 2.4 초, 37.73 ± 2.4 초로 농도 의존적으로 증가하여 도피대가 없음에도 인지 및 공간 지각력을 회복시킨 것을 확인하였다($p < 0.05$) ($p < 0.01$). 또한 DNPZ군에서도 42.7 ± 1.5 초로 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.001$)(Fig. 3B). 그러므로 scopolamine으로 유도한 기억력 손상 모델에서 sucralose가 농도 의존적으로 개선된 것을 확인하였다.

Abu-Taweel GM 등의 실험[39]에서 인공 감미료인 aspartame 장기투여에서 MWM을 통해 기억 및 인지 회복이 미비하다고 보고되었으나, 본 실험에서 sucralose 단기투여한 결과 회복되는 양상을 확인하여 이는 sucralose가 MWM 실험

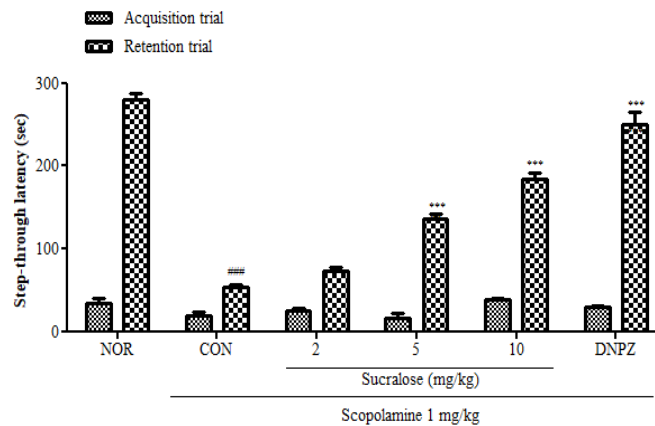


Fig. 2. Effect of sucralose on the passive avoidance test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. sucralose were orally administered 1 h before the acquisition trial. Latency time was measured and the values shown the mean \pm SEM (n=8). ### $p < 0.001$ as compared with the NOR group, *** $p < 0.001$ as compared with the CON group.

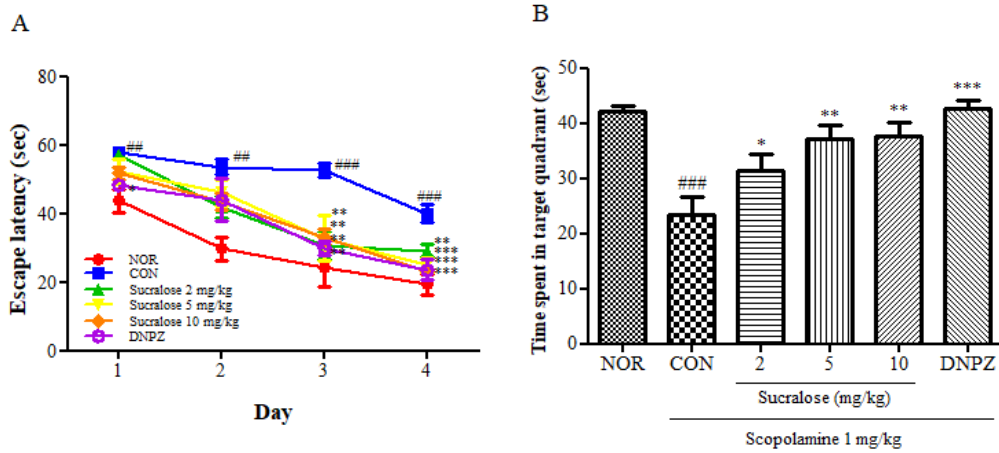


Fig. 3. Effect of sucralose on the Morris water maze test using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were orally administered with sucralose 1 h before the training trial sessions. A: escape latency, B: exploration time in target quadrant. The values shown the mean \pm SEM (n=6). ## p <0.01, ### p <0.001 as compared with the NOR group, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 as compared with the CON group.

에서 장기 및 공간 기억력을 회복된 것이라 판단하였다.

3.4. IL-6 와 TNF- α 생성 효과

신경 염증반응에서 중요한 역할을 하는 cytokine은 AD 발병의 생물학적, 병리학적 과정 및 반응을 평가하기 위한 바이오마커로써 사용되고 있다[40]. 그 중 전염증성 인자로 과생성 시 신경 염증반응과 신경 퇴행을 유도하는 IL-6와 beta-amyloid의 전구물질인 APP 단백질의 분해 인자의 생성과 microglia 활성을 조절하여 신경 염증반응에 관여하는 인자인 TNF- α 는 급성 혹은 만성 염증 질환을 발생 및 진행시킨다고 알려져 있다[41]. 본 연구는 혈액 내의 사이토카인의 양을 알고자 평가 진행하였다. 실험 결과 IL-6 경우 정상군 NOR에서 37.2 ± 0.6 pg/mL이며, scopolamine을 투여한 CON에서 61.0 ± 4.5 pg/mL로 증가함을 확인하였다(p <0.001). Sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine 복강 투여한 실험군에서 43.6 ± 1.0 pg/mL, 41.5 ± 1.3 pg/mL, 39.1 ± 0.4 pg/mL로 감소하며(p <0.001) (Fig. 4A), TNF- α 경우 정상군 normal(NOR) 군에서 154.1 ± 7.7 pg/mL이며, scopolamine을

투여한 CON군에서 397.3 ± 29.2 pg/mL로 증가함을 확인하였다(p <0.001). Sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine 복강 투여한 실험군에서 103.8 ± 21.2 pg/mL, 87.7 ± 10.3 pg/mL, 65.5 ± 4.7 pg/mL로 감소였다(p <0.001) (Fig. 4B).

IL-6는 뉴런의 생존을 증가시킴으로써 인지 기능을 조절하지만 억제되지 않고 지속적인 합성을 할 시 만성 염증 및 자가 면역에 영향을 받으며, TNF- α 는 대식세포 및 단핵구에 의해 생성되는 염증성 사이토카인으로 신호전달과 관련된 괴사 또는 세포 사멸을 유발하지만[42-43], 억제됨으로써 기억력의 회복에 도움이 된다. Afzal M 등의 scopolamine 인지 장애 완화 실험[44]에 따르면 인지기능이 완화된 것을 확인한 후 사이토카인을 측정된 결과 IL-6에서 40%와 TNF- α 에서 50% 억제하여 항염증 있다고 보고하였다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 본 실험에서 사용한 sucralose를 단기 투여하여 측정된 결과 IL-6는 39.1%와 TNF- α 는 65.5%로 항염증 효과가 있으며, 기억 및 인지기능을 회복되었다고 판단하였다.

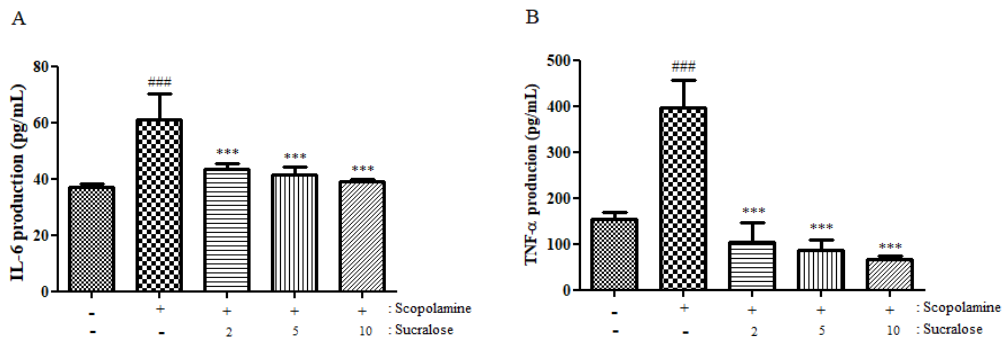


Fig. 4. Effect of Careswell on the IL-6, TNF- α production using scopolamine (1 mg/kg, i.p)-induced memory impairment mice. Mice were orally administered with sucralose 1 h before the training trial sessions. The levels of IL-6, TNF- α were measured from serum using ELISA. All data were represented in the means \pm S.D(n=5). The values shown the mean \pm SEM(n=6). ### p <0.001 as compared with the NOR group, *** p <0.001 as compared with the CON group.

3.5. ERK, CREB 발현에 미치는 효과

세포 내 신호전달 계통을 활성화하여 신경 기능을 조절하는 것으로 알려진 ERK-CREB은 해마 의존성 기억에 중요하다[45]. 따라서 sucralose가 ERK-CREB 경로와 연관되어 있는지 조사하기 위해 해마에서 인산화된 ERK 및 CREB를 측정하였고 pERK의 경우 NOR군에 비해 scopolamine을 투여한 CON군은 $51.0 \pm 4.2\%$ 감소함을 확인하였다(p <0.01). Sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine 복강 투여한 실험군에서 $63.4 \pm 3.0\%$, $69.5 \pm 5.2\%$, $71.96 \pm 4.5\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였다(p <0.05). 또한, 양성대조군 DNPZ군에서 $81.2 \pm 8.5\%$ 로 증가하였다(p <0.05)(Fig. 5A). pCREB의 경우 NOR군에 비해 scopolamine을 투여한 CON군에서 $44.3 \pm 1.3\%$ 감소함을 확인하였다(p <0.001). Sucralose 2, 5, 10 mg/kg 경구 투여 후 scopolamine 복강 투여한 실험군에서 $49.26 \pm 4.2\%$, $66.83 \pm 4.4\%$, $70.0 \pm 2.8\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였다(p <0.01). 또한, 양성대조군 DNPZ군에서 $84.51 \pm 3.8\%$ 로 증가하였다(p <0.001)(Fig. 5B).

인지 장애 완화 실험에서 ERK-CREB 기전은 scopolamine 모델, 염증 모델, 산화 스트레스 모델 등의 기억력 감퇴 모델[46-48]에서 대표적인 기전으로 ERK의 경우 세포 외 신호 조절 키나제

이며, 장기 학습 및 기억과 관련된 단백질로 기억형성에 도움이 된다고 알려져 있다. 이러한 과정 중 CREB의 인산화를 통해 ERK의 활성화시켜 기억을 향상시키는 연구가 보고되었으며, 조건화된 연구 방법을 통해 해마의 기억 및 인지기능이 회복 양상을 보인다 알려져 있다[4]. 이를 바탕으로 scopolamine에 의한 기억 손상 모델에서 sucralose를 단기 투여해 관찰한 결과 CON군에 비교하여 sucralose 투여군이 ERK 경우 21.0%, CREB의 경우 25.7% 회복됨으로써 신경 세포 활성화를 통해 건망증을 예방하는 것으로 판단하였다.

4. 결론

본 연구에서는 scopolamine으로 인한 기억 및 인지기능 저하 동물모델에서 인공 감미료 중 하나인 sucralose 단기 경구 투여로 인한 인지기능 개선 효과를 알아보고, 기능성 식품 소재로서의 가능성을 확인하고자 행동실험인 Y-maze, PAT, MWM을 진행하고, 관련 기전을 확인하기 위해 염증성 cytokine 측정 및 western blot을 수행하였다.

행동실험에서 sucralose를 2, 5, 10 mg/kg의 농도로 투여한 결과 Y-maze test의 경우 대조군

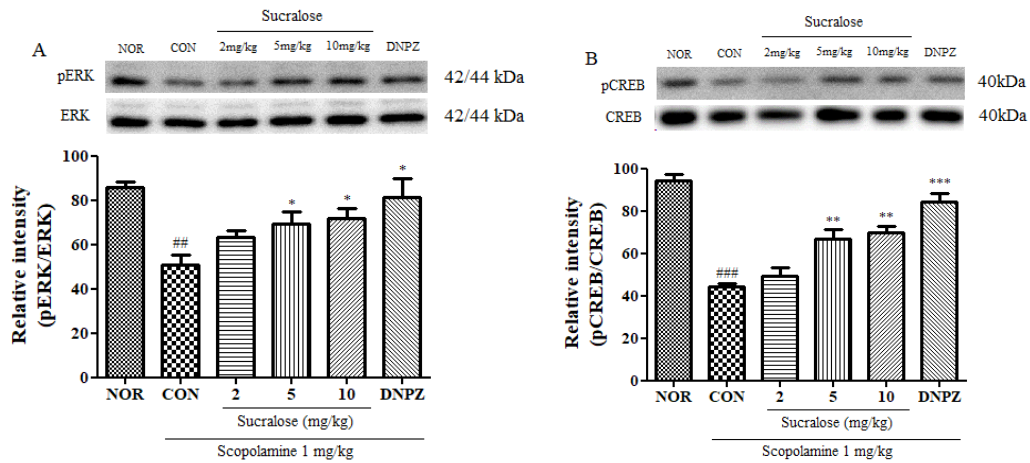


Fig. 5. Western blot analysis of A : ERK expression in hippocampus, B : CREB expression in hippocampus. Band 1: normal group ; Band 2: control group; Band 3: sucralose (2 mg/kg); Band 4: sucralose (5 mg/kg); Band 5: sucralose (10 mg/kg); Band 6: donepezil (5mg/kg). Values given are means \pm S.E.M, (N = 4).

대비 5%, 12%, 15%로 변형행동력이 회복되는 양상을 보여 손상된 단기 기억능력을 개선 시킴을 알 수 있었으며, 해마에서 조건화된 기억을 측정하기 위해 수행한 PAT에서도 대조군에 비해 7%, 29%, 46%씩 체류 시간이 증가됨으로써 유의적으로 인지기능이 개선된 것을 확인할 수 있었다. 장기 공간 학습 능력을 확인하고자 측정된 MWM에서 19%, 33%, 34%로 탐색 시간이 감소하여 대조군 대비 공간 지각력을 회복시키는 효능이 있음을 확인하였다. 이러한 결과들을 토대로 행동실험에서 sucralose의 단기 섭취가 농도 의존적으로 기억 및 인지기능이 회복됨을 확인할 수 있었다. 또한, 염증 및 면역 반응을 알기 위해 전염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α 에서 sucralose의 효능을 확인한 결과 대조군과 비교해 10 mg/kg 농도에서 IL-6는 39.1%, TNF- α 65.5%의 억제 효과를 확인하여 관련 기전에서 항염증 효능이 있어 인지기능이 회복됨을 확인할 수 있었고, 신경 세포에서 분화와 생존을 조절하는 ERK-CREB 경로를 관찰하였을 때, 이 또한 농도 의존적으로 발현량이 증가한 것을 확인하였으며, 10 mg/kg를 단기 섭취는 CON군 대비 ERK 경우 21.0%, CREB의 경우 25.7% 활성을 확인

하여 인지기능 장애의 신경 보호에 효과가 있음을 알 수 있었다.

이러한 내용들을 종합한 결과 sucralose 단기투여가 행동실험을 통해 기억 및 인지기능에 대한 회복 양상이 보임을 판단하였고, 이후 항염증 활성을 통해 관련된 기전을 확인하였다. 그러나 sucralose의 기억력 및 인지기능 회복 효과에 관여하는 신경 전달 물질 기전과 복용기간, 복용량 등에 대해서는 추후 추가적인 보완 연구를 거친 후 기능성 식품 소재로서 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 과제(결과물)는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0)의 연구 결과이며, 2022년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 - 이공분야기초연구사업의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2022R1F1A1074902).

References

- Kim MS, Lee DY, Lee J, Kim HW, Sung SH, Han JS, Jeon WK, "Terminalia chebula extract prevents scopolamine-induced amnesia via cholinergic modulation and anti-oxidative effects in mice.", *BMC Complement Altern Med*, Vol.18, No.1, pp.136, (2018)
- Solas M, Milagro FI, Ramírez MJ, Martínez JA, "Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions.", *Curr Opin Pharmacol*, Vol.37, pp.87-92, (2017).
- Al-Tawarah NM, Al-Dmour RH, Abu Hajleh MN, Khleifat KM, Alqaraleh M, Al-Saraireh YM, Jaradat AQ, Al-Dujaili EAS, "Rosmarinus officinalis and Mentha piperita Oils Supplementation Enhances Memory in a Rat Model of Scopolamine-Induced Alzheimer's Disease-like Condition.", *Nutrients*, Vol.15, No.6, pp.1547, (2023).
- Knapskog AB, Engedal K, Selbæk G, Øksengård AR, "Alzheimer's disease - diagnosis and treatment", *Tidsskr Nor Lægeforen*, Vol.141, No.7, (2021).
- Lim S, Moon M, Oh H, Kim HG, Kim SY, Oh MS, "Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse.", *J Nutr Biochem*, Vol.25, No.10, pp.1058-65, (2014).
- Chen ZY, Zhang Y, "Animal models of Alzheimer's disease: Applications, evaluation, and perspectives.", *Zool Res*, Vol.43, No.6, pp.1026-1040, (2022).
- Ozben T, Ozben S, "Neuro-inflammation and anti-inflammatory treatment options for Alzheimer's disease.", *Clin Biochem*, Vol.72, (2019).
- Kim MS, Kim BY, Kim JI, Lee J, Jeon WK, "Mumefural Improves Recognition Memory and Alters ERK-CREB-BDNF Signaling in a Mouse Model of Chronic Cerebral Hypoperfusion.", *Nutrients*, Vol.15, No.14, pp.3271, (2023).
- Shi M, Ding J, Li L, Bai H, Li X, Lan L, Fan H, Gao L, "Effects of Ketamine on Learning and Memory in the Hippocampus of Rats through ERK, CREB, and Arc.", *Brain Sci*, Vol.11, No.1, pp.27, (2020).
- Thakur S, Dhapola R, Sarma P, Medhi B, Reddy DH, "Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Progress in Molecular Signaling and Therapeutics.", *Inflammation*, Vol.46, No.1, pp.1-17, (2023).
- Lyra E Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende EPF, Vieira ELM, Teixeira AL, de Souza LC, Peny JA, Fortuna JTS, Furigo IC, Hashiguchi D, Miya-Coreixas VS, Clarke JR, Abisambra JF, Longo BM, Donato J Jr, Fraser PE, Rosa-Neto P, Caramelli P, Ferreira ST, De Felice FG, "Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease.", *Transl Psychiatry*, Vol.11, No.1, pp.251, (2021).
- Li Y, Shen R, Wen G, Ding R, Du A, Zhou J, Dong Z, Ren X, Yao H, Zhao R, Zhang G, Lu Y, Wu X, "Effects of Ketamine on Levels of Inflammatory Cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the Hippocampus of Mice Following Acute or Chronic Administration.", *Front Pharmacol*, Vol.8, pp.139, (2017).
- Hampel H, Caraci F, Cuello AC, Caruso G, Nisticò R, Corbo M, Baldacci F, Toschi N, Garaci F, Chiesa PA, Verdooner SR, Akman-Anderson L, Hernández F, Ávila J, Emanuele E, Valenzuela PL, Lucía A, Watling M, Imbimbo BP, Vergallo A, Lista S, "A Path Toward Precision Medicine for Neuroinflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease." *Front Immunol*, Vol.11, pp.456, (2020).
- Renner UD, Oertel R, Kirch W, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical use of scopolamine.", *Ther Drug*

- Monit*, Vol.27, No.5, pp.655-65, (2005)
15. Chen WN, Yeong KY, "Scopolamine, a Toxin-Induced Experimental Model, Used for Research in Alzheimer's Disease.", *CNS Neurol Disord Drug Targets*, Vol.19, No.2, pp.85-93, (2020).
 16. Stone WS, Croul CE, Gold PE. "Attenuation of scopolamine-induced amnesia in mice.", *Psychopharmacology*, Vol.96, No.3, pp.417-20, (1988).
 17. Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A, "Effects of Sweeteners on the Gut Microbiota: A Review of Experimental Studies and Clinical Trials.", *Adv Nutr*, Vol.11, No.2, pp.468, (2020).
 18. Debras C, Chazelas E, Srour B, Druesne-Pecollo N, Esseddik Y, Szabo de Edelenyi F, Agaësse C, De Sa A, Luchia R, Gigandet S, Huybrechts I, Julia C, Kesse-Guyot E, Allès B, Andreeva VA, Galan P, Hercberg S, Deschasaux-Tanguy M, Touvier M, "Artificial sweeteners and cancer risk: Results from the NutriNet-Santé population-based cohort study.", *PLoS Med*, Vol.19, No.3, pp.e1003950, (2022).
 19. Qurrat-ul-Ain, Khan SA, "Artificial sweeteners: safe or unsafe?", *J Pak Med Assoc*, Vol.65, No.2, pp.225-7, (2015).
 20. Erbaş O, Erdoğan MA, Khalilnezhad A, Solmaz V, Gürkan FT, Yiğittürk G, Eroglu HA, Taskiran D, "Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral, and histological study.", *J Biochem Mol Toxicol*, Vol.32, No.6, pp.e22053, (2018).
 21. Morales-Ríos EI, García-Machorro J, Briones-Aranda A, Gómez-Pliego R, Espinosa-Raya J, "Effect of Long-Term Intake of Nutritive and Non-Nutritive Sweeteners on Metabolic Health and Cognition in Adult Male Rats.", *J Med Food*, Vol.25, No.11, pp.1059-1065, (2022).
 22. Magnuson BA, Roberts A, Nestmann ER, "Critical review of the current literature on the safety of sucralose.", *Food Chem Toxicol*, Vol.106, No.Pt A, pp.324-355, (2017).
 23. AlDeeb OA, Mahgoub H, Foda NH, "Sucralose", *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, Vol.38, pp.423-462, (2013).
 24. Pino-Seguel P, Moya O, Borquez JC, Pino-de la Fuente F, Díaz-Castro F, Donoso-Barraza C, Llanos M, Troncoso R, Bravo-Sagua R, "Sucralose consumption ameliorates high-fat diet-induced glucose intolerance and liver weight gain in mice.", *Front Nutr*, Vol.9, pp.979624, (2022).
 25. Van Opstal AM, Hafkemeijer A, van den Berg-Huysmans AA, Hoeksma M, Mulder TPJ, Pijl H, Rombouts SARB, van der Grond J, "Brain activity and connectivity changes in response to nutritive natural sugars, non-nutritive natural sugar replacements and artificial sweeteners.", *Nutr Neurosci*, Vol.24, No.5, pp.395-405, (2021).
 26. Meyer-Gerspach AC, Wingrove JO, Beglinger C, Rehfeld JF, Le Roux CW, Peterli R, Dupont P, O'Daly O, Van Oudenhove L, Wölnerhanssen BK, "Erythritol and xylitol differentially impact brain networks involved in appetite regulation in healthy volunteers.", *Nutr Neurosci*, Vol.25, No.11, pp.2344-2358, (2022).
 27. Wu B, Eldeghaidy S, Ayed C, Fisk ID, Hewson L, Liu Y, "Mechanisms of umami taste perception: From molecular level to brain imaging.", *Crit Rev Food Sci Nutr*, Vol.62, No.25, pp.7015-7024, (2022).
 28. Talevi A, Enrique AV, Bruno-Blanch LE, "Anticonvulsant activity of artificial sweeteners: a structural link between sweet-taste receptor T1R3 and brain glutamate receptors.", *Bioorg Med Chem Lett*, Vol.22, No.12, pp.4072-4, (2012).
 29. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z, "The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice.",

- Methods Mol Biol*, Vol.1916, pp.105–111, (2019).
30. Ambrogi Lorenzini C, Bucherelli C, Giachetti A, “Passive and active avoidance behavior in the light–dark box test”, *Physiol Behav*, Vol.32, No.4, pp.687–9, (1984).
 31. Bromley–Brits K, Deng Y, Song W, “Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer’s disease model mice.”, *J Vis Exp*, Vol.20, No.53, pp.2920, (2011).
 32. Konstantinou GN, “Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA).”, *Methods Mol Biol*, Vol.1592, pp.79–94, (2017).
 33. Ibi D, Suzuki F, Hiramatsu M, “Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice.”, *Physiol Behav*, Vol.188, pp.291–297, (2018).
 34. Grice HC, Goldsmith LA, “Sucralose—–an overview of the toxicity data.”, *Food Chem Toxicol*, Vol.38, (2000)
 35. Kohno D, “Sweet taste receptor in the hypothalamus: a potential new player in glucose sensing in the hypothalamus.”, *J Physiol Sci*, Vol.67, No.4, pp.459–465, (2017).
 36. Lee AA, Owyang C. Sugars, “Sweet Taste Receptors, and Brain Responses”, *Nutrients*, Vol.9, No.7, pp.653, (2017)
 37. Kim J, Seo YH, Kim J, Goo N, Jeong Y, Bae HJ, Jung SY, Lee J, Ryu JH, “Casticin ameliorates scopolamine–induced cognitive dysfunction in mice.”, *J Ethnopharmacol*, Vol.259, pp.112843, (2020).
 38. Parsa H, Moradi–Khaligh Z, Rajabi S, Ranjbar K, Komaki A, “Swimming training and Plantago psyllium ameliorate cognitive impairment and glucose tolerance in streptozotocin–nicotinamide–induced type 2 diabetic rats.”, *J Physiol Sci*, Vol.71, No.1, pp.37, (2021).
 39. Abu–Taweel GM, A ZM, Ajarem JS, Ahmad M, “Cognitive and biochemical effects of monosodium glutamate and aspartame, administered individually and in combination in male albino mice.”, *Neurotoxicol Teratol*, Vol.42, pp.60–7, (2014).
 40. Olayinka J, Eduviere A, Adeoluwa O, Fafure A, Adebajo A, Ozolua R, “Quercetin mitigates memory deficits in scopolamine mice model via protection against neuroinflammation and neuro–degeneration.”, *Life Sci*, Vol.292, pp.120326, (2022).
 41. Amoah V, Atawuchugi P, Jibira Y, Tandoh A, Ossei PPS, Sam G, Ainooson G, “Lantana camara leaf extract ameliorates memory deficit and the neuroinflammation associated with scopolamine–induced Alzheimer’s–like cognitive impairment in zebrafish and mice.”, *Pharm Biol*, Vol.61, No.1, pp.825–838, (2023).
 42. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T, “IL–6 in inflammation, immunity, and disease.”, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol.6, No.10, pp.a016295, (2014).
 43. Idriss HT, Naismith JH, “TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure–function relationship(s).”, *Microsc Res Tech*, Vol.50, No.3, pp.184–95, (2000).
 44. Afzal M, Alzarea SI, Alharbi KS, Alzarea AI, Alenezi SK, Alshammari MS, Alquraini AH, Kazmi I, “Rosiridin Attenuates Scopolamine–Induced Cognitive Impairments in Rats via Inhibition of Oxidative and Nitrate Stress Leded Caspase–3/9 and TNF– α Signaling Pathways.”, *Molecules*, Vol.27, No.18, pp.5888, (2022).
 45. Lu C, Wang Y, Xu T, Li Q, Wang D, Zhang L, Fan B, Wang F, Liu X, “Genistein Ameliorates Scopolamine–Induced Amnesia in Mice Through the Regulation of the Cholinergic Neurotransmission, Antioxidant System and the ERK/CREB/BDNF Signaling.”, *Front Pharmacol*, Vol.9, pp.1153, (2018).
 46. Madhu LN, Kodali M, Attaluri S, Shuai B, Melissari L, Rao X, Shetty AK, “Melatonin improves brain function in a

- model of chronic Gulf War Illness with modulation of oxidative stress, NLRP3 inflammasomes, and BDNF-ERK-CREB pathway in the hippocampus.”, *Redox Biol*, Vol.43, pp.101973, (2021).
47. Zhao X, Li S, Gaur U, Zheng W, “Artemisinin Improved Neuronal Functions in Alzheimer's Disease Animal Model 3xtg Mice and Neuronal Cells via Stimulating the ERK/CREB Signaling Pathway.”, *Aging Dis*, Vol.11, No.4, pp.801-819, (2020).
48. Su X, Wang C, Wang X, Han F, Lv C, Zhang X, “Sweet Dream Liquid Chinese Medicine Ameliorates Learning and Memory Deficit in a Rat Model of Paradoxical Sleep Deprivation through the ERK/CREB Signaling Pathway.”, *J Med Food*, Vol.19, No.5, pp.472-80, (2016).
49. Liu L, Zhu J, Zhou L, Wan L, “RACK1 promotes maintenance of morphine-associated memory via activation of an ERK-CREB dependent pathway in hippocampus.”, *Sci Rep*, Vol.6, pp.20183, (2016).