

□ 증 례 □

결핵환자에서 NAD Glycohydrolase Activity에 관한 연구

전북대학교 의과대학 내과학교실

서 재 석 · 이 용 철 · 이 양 근

= Abstract =

NAD Glycohydrolase Activity in Patients of Tuberculosis

Jae Seok Seo, M.D., Yong Chul Lee, M.D. and Yang Keun Rhee, M.D

Department of Internal Medicine, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk, Korea

Background: Nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase(NADase) is located on the surface of the cells. It is bound by glycosylphosphatidylinositol(GPI)-linkage, which can be cleaved by bacterial PI-specific phospholipase C(PI-PLC). Recently, it was studied that NADase was increased in infected tuberculosis animal, but absolute NADase is uncertainly increased because of high NADase in Mycobacterium tuberculosis. Therefore, we studied pure NADase activity in red blood cells of normal person and patients of tuberculosis.

Method: We evaluated the 19 healthy adults and 16 tuberculosis infected patients, and then, the latter cases were evaluated after 3 months antituberculosis therapy. NADase activity was calculated by scintillated counting of cleaved radioactive [carbonyl-³H] nicotinamide.

Result: NADase activity was 2021.1 ± 824.0 pmol/min/ 10^6 erythrocytes in healthy adults vs. 3339.0 ± 1568.0 in tuberculosis infected patients, and was 3339.0 ± 1568.0 in pretreated patients vs. 2238.6 ± 1013.1 in same 3 months treated patients.

Conclusion: NADase activity of erythrocytes is elevated in tuberculosis infection, and normalized after antituberculosis therapy. Therefore, we suggested NADase activity as the new diagnostic and therapeutic indicator.

Key Words: NAD Glycohydrolase(NADase), Tuberculosis

서 론

NAD glycohydrolase(NADase)는 생체내 중요한 조효소인 NAD의 ADP-ribose와 nicotinamide를 생성시키는 반응을 촉매하는 효소이다. NADase는 모든 진핵세포는 물론 여러 미생물에도 존재한다^{1~5)}.

이 효소는 포유류에서 정액에 존재하는 가용성 효소를 제외하고는 형질막의 막외면에 존재한다고 알려져 있으며^{4~7)}, 적혈구막에 glycosylphosphatidylinositol(GPI) 결합으로 막 외면에 붙어 있음이 밝혀진 바 있다⁸⁾. 과거 결핵 감염시 NADase activity에 대한 연구가 시행되었으나 논란이 있어 NADase activity를 결핵 감염의 진단 및 치료에 대한 새로운 지표로서 제공하기 위해 본

연구를 시행하였다.

의 NADase activity는 paired T-test로 시행하였다.

대상 및 방법

결 과

1. 대 상

건강 대조군은 과거 결핵감염의 기왕력이 없고 흉부 방사선 사진과 객담검사상 결핵의 징후가 보이지 않았으며, 검사 당시 다른 질환을 가지고 있지 않은 25세에서 70세까지 남자 14명, 여자 5명을 대상으로 하였으며 평균연령은 44.9세였다.

결핵감염군은 과거 결핵감염의 기왕력이 없고 다른 질환이 합병되어 있는 징후가 없는 흉부 방사선 사진상 결핵으로 추정되는 병변이 발견되고 객담검사상 결핵균이 처음 발견된 환자로 총 46예를 검사하였으나 추적검사가 가능했던 19세에서 72세까지 남자 13명, 여자 4명을 대상으로 하였고, 평균 연령은 46.2세였다.

2. 방 법

혈액을 채취한 후 영상 4℃에 냉장 후 적혈구를 분리하고 serum에 포함되어 있을 수 있는 NADase를 제거하기 위하여 phosphate buffered saline으로 3회 세척한다. 이후 hemocytometer로 1×10^6 개의 적혈구를 분리해낸 다음 NADase assay를 한다. pH 7.2에서 25nCi의 [carbonyl- 3 H] NAD와 4×10^6 개의 적혈구 50 μ l를 37℃에서 1시간 동안 배양하는데 여기에서 적혈구 막 표면에 있는 NADase가 [carbonyl- 3 H] NAD를 [carbonyl- 3 H]nicotinamide와 ADP-ribose로 분리시키는 반응이 일어나게 된다. 이 반응을 일으킨 혼합물을 negative charge를 띤 Dowex-1-chloride column에 넣어 빠져나온 [carbonyl- 3 H]nicotinamide의 radioactivity를 scintillation counting하여 평가한다.

이상의 방법으로 정상대조군에서와 결핵감염군에서 NADase activity를 측정하였으며 결핵감염군에서는 결핵치료 전과 isoniazid와 rifampin으로 치료한 3개월후 각각 NADase activity를 측정하였다.

3. 결과 분석

대조군과 치료전의 결핵감염군에서 NADase activity는 grouped T-test로, 결핵감염군에서 치료전과 치료후

건강 대조군 총 19예에서는 NADase activity가 2021.1 ± 824.0 pmol/min/ 10^6 erythrocytes(이하 단위 생략)이었고 치료전의 결핵 감염군 총 17예에서는 3339.0 ± 1568.0 이어서 양군의 결과가 유의 있게 결핵감염군에서 NADase activity가 높았다(Table 1, Fig. 1).

결핵감염군에서 치료전과 Isoniazid와 Rifampin으로 치료후를 비교했을 때 치료전은 3339.0 ± 1568.0 이었고 치료후 2238.6 ± 1013.1 로 결핵 치료전보다 치료후 NADase activity가 유의 있게 낮은 것을 알 수 있었다

Table 1. NADase Activities of the Group of Normal Control and Pretreated Tuberculosis Patients

Group	NADase activities (pmol/min/ 10^6 erythrocytes)
Healthy control group (n=19)	2021.1 ± 824.0
Pretreated, infected group (n=17)	$3339.6 \pm 1568.0^*$

* p<0.05

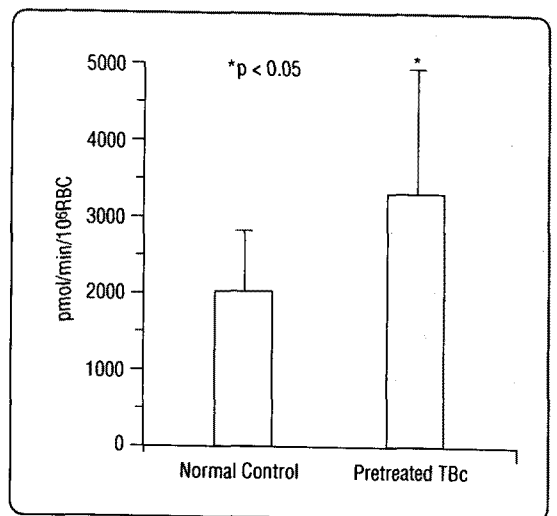


Fig. 1. NADase activities of the group of normal control and pretreated tuberculosis patients.

Table 2. NADase Activities of the Group of Pretreated and Post-Treated Tuberculosis Patients

Group	NADase activities (pmol/min/10 ⁶ erythrocytes)
Pretreated, infected group (n=17)	3339.6 ± 1568.0
Posttreated, infected group (n=17)	2238.0 ± 1013.1*

* p<0.05

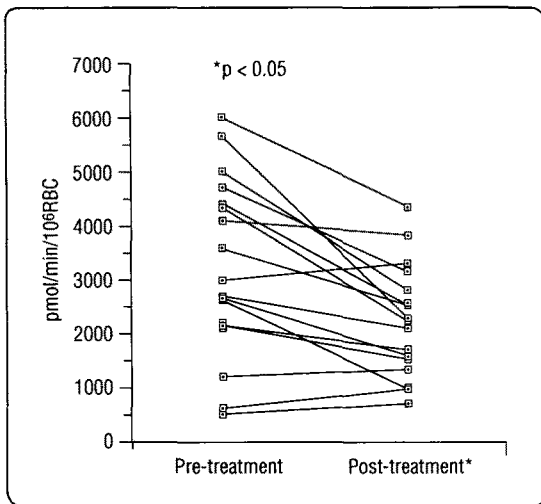


Fig. 2. NADase activities of the group of pretreated and posttreated tuberculosis patients.

(Table 2, Fig. 2).

고 찰

대부분의 포유류의 세포에서 NADase는 세포막의 외막에 존재한다^{1~5)}. 그러나 in vivo에서 NADase의 역할은 아직도 미지수이다. NAD가 ADP-ribose와 nicotinamide로 가수분해 되는 데 촉매작용을 하는 NAD glycohydrolase(NADase)는 박테리아에서 포유류까지 다양하게 존재하는 것으로 알려지고 있다^{9~16)}. 유핵세포 내의 NADase 대부분은 membrane-associated enzyme 이며^{4,5)} 유핵세포에서 이 효소의 활성도는 세포막의 외벽에 주로 위치한다^{6,7)}.

결핵이 감염된 숙주에서 NADase activity가 증가된다는 보고들이 있고 그 증가가 주로 숙주에서 유리된 것으로 밝혀진바 있다^{17,18)}. 하지만 이의 정확한 기전이나 원인에 대해서는 규명되지 않았다. 이 NADase의 일부는 bacterial phosphatidylinositol specific phospholipase C(PI-PLC)로 용해되어지는 데 phosphatidylinosito(PI)-glycan의 고정에 의한 plasma membrane에 부착되어지고 있음을 보인다⁸⁾. NADase에서 PI anchor의 생리적 중요성이 확인되지는 않았지만 PI-PLC에 의한 PI-anchored NADase의 용해성은 이효소를 분리해낼 수 있게 했다¹⁹⁾. 신생아의 적혈구에는 NADase 활성도가 낮거나 존재치 않지만 정상성인치는 생후 1년 이내에 이루어진다.

과거 NADase의 결핵과의 관계에 대한 보고들^{13,14)}은 주로 혈청 및 조직에서의 NADase를 측정된 것이고 적혈구에 있는 NAD에서 ADP-ribose uptake의 비율을 NADase activity와 연관하여 측정하기도 하였으며 PI-PLC활성을 측정하여 NADase activity를 반영한 대식세포에서의 측정도 있으나 대식세포는 NADase가 많은 세포이어서 저자들은 대식세포가 아닌, PI-PLC의 활성 측정이 아닌 새로운 방법, 즉 NADase의 고유역할이 NAD에서 nicotinamide와 ADP-ribose로의 분리를 이용한 방법으로 적혈구 막외면의 NADase activity를 측정하여 동일 환자에서 추적검사하여 위와같은 결과를 얻었다.

이상의 결과를 보면 정상 대조군에 비해 결핵 감염군에서 NADase activity가 증가했고, 결핵치료 후 감소하는 것을 볼 수 있어 NADase activity가 결핵 감염의 진단 및 치료에 새로운 지표가 될 수 있을 것으로 사료된다.

저자들은 1991년 1월부터 1992년 6월까지 전북대학교병원 내과에 내원한 결핵환자 17예와 건강 대조군 19예를 대상으로 적혈구 막 외면에서 NADase activity를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 건강 대조군에서 2031 ± 824.0 pmo/min/10⁶ erythrocytes, 결핵 감염군에서 3339 ± 1568.0, 그리고 isoniazid와 rifampin으로 치료한 3개월 후 2238.6 ± 1013.1을 얻어 결핵 감염시 NADase activity가 유의한 차이를 가지고 증가하며(p<0.05), 치료전에 비하여 치료후 유의있게 감소하였다.

따라서 건강 대조군에 비하여 결핵 감염군에서 NAD

ase activity는 증가하였으며 치료후 감염균에 비하여 감소되어 NADase activity가 결핵 감염의 진단 및 치료경과 도움을 줄 수 있으리라 사료된다.

요 약

연구배경: NAD glycohydrolase(NADase)는 세포 표면에 위치하며 glycosylphatidylinositol(GPI)로 세포표면에 부착되어 있으며 bacterial PI-specific phospholipase C(PI-PLC)에 의해 분리된다. 최근 결핵환자에서 NADase가 증가한다는 보고가 있었으나 결핵균자체가 NADase가 높기 때문에 절대적인 NADase치가 증가했는 지는 확실치 않다. 따라서 저자들은 정상 대조군과 결핵환자의 적혈구에서 순수한 NADase activity를 측정하였다.

방법: 19명의 정상 건강 대조군과 16명의 과거 결핵의 진단 및 치료를 받지 않은 결핵환자를 대상으로하여 NADase activity를 측정하였고 결핵환자는 결핵치료 3개월후 재 검사하였다. NADase activity는 [carbonyl-³H] nicotinamide 동위원소를 사용하여 측정하였다.

결과: 건강 대조군에서 2031 ± 824.0 pmol/min/ 10^6 erythrocytes, 결핵 감염군에서 3339 ± 1568.0 , 그리고 isoniazide와 rifampin으로 치료한 3개월 후 2238.6 ± 1013.1 을 얻어 결핵 감염시 NADase activity가 유의한 차이를 가지고 증가하며($p < 0.05$), 치료전에 비하여 치료후 유의있게 감소하였다.

결론: 결핵감염시 NADase activity가 올라가고 결핵 치료시 NADase activity가 정상화 되어 NADase activity가 결핵감염의 진단 및 치료에 대한 새로운 지표가 될수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Kaplan NO: Animal tissue DPNase(pyridine transpilycosidase). *Methods Enzymol* 2:660, 1955
- 2) Swislocki NI, Kalish MI, Chasalow FI, Kaplan NO: Solubilization and comparative properties of some mammalian diphopyridine nucleosidases. *J Biol Chem* 242:1089, 1969
- 3) Srivastava SK, Maini SB, Ramakrishnan CV: Studies on NAD glycohydrolase in *Rumex acetosa* tumor tissue cultivated in vitro. *Phytochemistry* 8:1147, 1969
- 4) De Wolf MJS, Van dessel GAF, Lagrou AR, Hilderson HJJ, Dierick WSH: Topography, purification and characterization of thyroidal NAD+glycohydrolase. *Biochem J* 226:415, 1985
- 5) Pekala PH, Anderson BM: Studies of bovine erythrocyte NAD glycohydrolase. *J Biol Chem* 253:7453, 1978
- 6) Gopinathan KP, Sirsi M, Vaidyanathan CS: Nicotinamide-adenine dinucleotide glycohydrolase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochem J* 91:277, 1964
- 7) Anderson BM, Yuan JH: NAD glycohydrolase from bovine seminal plasma. *Methods Enzymol* 66:144, 1980
- 8) Anderson BM, Yost DA, Anderson CD: Snake venom NAD glycohydrolase: Purification, immobilization and transglycosidation. *Methods Enzymol* 122:173, 1986
- 9) Everse KE, Everse J, Simeral LS: *Bacillus subtilis* NADase and its specific inhibitor. *Methods Enzymol* 66:137, 1980
- 10) Williams GT, Ford CC, Shall S: NAD glycohydrolase activity in *Xenopus laevis* oocytes and early embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 108:36, 1982
- 11) Kim UH, Seo JS, Kim HR: Isolation and in vitro translation of the messenger RNA coding for *Nerospora crassa* NAD glycohydrolase. *Korean Biochem J* 19:32, 1986
- 12) Pace M, Agnellini D, Peitta PG, Mauri PL, Menegus F, Berger RL: NAD glycohydrolase from *Nerospora crassa* Association of the proterin in solution. *Plant Physiol* 7:115, 1988
- 13) Muller HM, Schuber F: Assymmetric reassociation of calf spleen NAD glycohydrolase into lipo-

- some. *Biochem J* **246**:319, 1987
- 14) Friedemann H, Rapoport SM: Enzymes of the red cell A critical catalogue. Cellular and molecular Biology of Erythrocytes(Yoshikawa H, Rapoport SM, eds), 181-259, University Park Press Baltimore
 - 15) Alivisatos SGA, Denstedt OF: Lactic dehydrogenase and DPN-ase activity of blood. *Science* **114**:281, 1951
 - 16) Gopinathan KP, Sirsi M, Vaidyanathan CS: Nicotinamide-adenine dinucleotide glycohydrolase activity in experimental tuberculosis. *Biochem J* **94**: 446, 1965
 - 17) Bekierkunst A, Artman M, Alexander N: Nicotinamide-adenine dinucleotide glycohydrolase activity in cells of tuberculous animals. *Science* **145**: 280, 1964
 - 18) Kim UH, Rockwood SF, Kim HR, Daynes RA: Membrane-associated NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes is solubilized by phosphatidylinositol-specific phosphlipase C. *Biochem Biophys Acta* **965**:76, 1988
 - 19) Kim UH, Kim MK, Kim JS, Han MK, Park BH, Kim HR: Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* in Press 1993