

赤血球 酵素活性化에 依한 비타민 B₁ B₂ 및 B₆ 營養狀態의 生化學的 評價

서울大學校 醫科大學 生化學教室, 人口醫學研究所

蔡 範 錫

=Abstract=

Biochemical Assessment of Vitamin B₁, B₂, and B₆ Nutriture by Coenzyme Activation on Erythrocyte Enzymes

Bum Suk Tchai, M.D.

*Department of Biochemistry, and The Institute of Reproductive Medicine and
Population, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea*

It was attempted in this study to assess the vitamin B₁, B₂, and B₆ status in tissue by determination of erythrocyte transketolase (TK), glutathione reductase (GR), and aspartate aminotransferase (AST) activities, and their activation by their respective coenzymes, thiamine pyrophosphate, flavin-adenine dinucleotide, and pyridoxal-5-phosphate.

The activities of erythrocyte enzymes were stable for more than 30 days when erythrocyte had been stored at -20°C and affirmed that the enzyme activities were more stable in the case of deep frozen sotrage of erythrocytes rather than hemolysates.

The assay procedures involving ultraviolet kinetic analysis with continuous monitoring for each of enzymes have good within-batch and between-batch precisions and will be available in the routine laboratories for the nutritional and clinical surveys.

Activity coefficient of TK, GR, and AST was studied in healthy medical students (fifteen men and twelve women, between 21 and 30 years old) on an unrestricted diet. The mean activity coefficient of TK, GR, and AST were 1.18, 1.35, and 2.01 for men, and 1.14, 1.33, and 1.83 for women, respectively. And the upper limit of normal (mean+2SD) were 1.52, 1.69, and 2.61 for men, and 1.50, 1.61, and 2.37 for women, respectively.

서 론

체내의 비타민 영양상태를 평가하는데 있어서, 보편적으로 행하여지던 혈청, 혈장, 또는 소변중의 비타민 및 이들 대사산물의 정량에 의한 방법은 기술적으로 어려운 문제점이 있고, 실질적인 조직내에서의 비타민의 저장량을 반영하지 못하므로 이와같은 방법으로 체내의 비타민 결핍상태를 평가하는 것은 타당치 못하였다.

그러므로 비타민 영양상태의 평가는 조직내에서의 이들 비타민의 양을 직접 측정하는 것이 바람직하며 적혈구는 이런 목적에 알맞는 대상조직임에 틀림이 없으나, 영양조사를 위한 임상검사에서 적혈구 안의 비타민의 양을 측정한다는 것은 그렇게 쉬운 일이 아니다.

그러나 적혈구 안에는 비타민 B₁(thiamine), B₂(riboflavin) 및 B₆(pyridoxine)를 조효소로 사용하는 몇가지 효소들이 상당한 활성을 갖고 존재하고 있다. 이들 효소의 활성은 각 조효소의 *in vitro* 첨가에 의해 증가되며 thiamine pyrophosphate(TPP), flavinadenin dinucleotide(FAD) 및 pyridoxal-5-phosphate(P-5-P)

This investigation received financial support from World Health Organization.

의 *in vitro* 첨가에 의해서 적혈구 중의 transketolase (TK; EC 2.2.1.1; sedoheptulose-7-phosphate: D-glyceraldehyde-3-phosphate glycoaldehyde transferase), glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2; NAD (P)H: glutathione oxidoreductase) 및 aspartate transaminase (AST; EC 2.6.1.1; L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase) 활성증가의 정도는 이들 비타민양의 간접적인 척도가 되며, 적혈구 안의 비타민 양에 역비례하게 된다.^{1,2,3,4,5}

최근 여러 연구자들은 상기의 생화학적 원리를 이용한 측정 방법으로 비타민 B₁, B₂ 및 B₆의 영양상태를 특이하고 손쉽게 평가하려는 시도와, 방법론의 표준화를 위한 연구를 진행하여 왔다.

Bayoumi와 Rosalki⁶⁾는 적혈구 TK 활성의 측정에 있어서 Smeets 등⁷⁾의 nicotinamide-adenine-dinucleotide (NADH)-dependent method를 변형하였다.

즉 ribose-5-phosphate를 기질로 하여 생성된 glyceraldehyde-3-phosphate는 triosephosphate isomerase (TIM, EC 5.3.1.1.)에 의해 dihydroxyacetone phosphate로 되고 dihydroxyacetone phosphate는 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.8)와 NADH에 의해 glycerol-1-phosphate로 환원되며 동시에 NADH는 NAD⁺로 산화된다. 이때 NADH의 산화에 의한 340nm에서의 흡광도의 감소속도로 TK 활성을 측정하였다.

적혈구 GR 활성의 측정은 Beutler^{8,9)}의 방법에 기초를 둔 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾법이 있다. glutathione reductase는 nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH)를 산화시키면서 산화된 glutathione (GSSG)을 환원시키는 반응을 촉매하는 효소이다. 그러므로 340nm에서의 NADPH의 흡광도 감소를 측정함으로써 GR의 활성을 측정할 수 있다.

또한 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾는 Karmen¹⁰⁾과 Stanulovic¹¹⁾ 등의 방법을 변형시켜서 적혈구 AST 활성을 측정하였다. 즉 L-aspartate와 2-oxoglutarate로부터 생성된 oxaloacetate는 NADH 존재하에 malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37)에 의해 malate로 환원되고 이때 NADH의 NAD⁺로의 산화에 의한 340nm에서의 흡광도의 변화는 AST 활성에 비례하게 된다.

저자는 이와 같은 적혈구 효소 활성화에 의한 생화학적 방법으로 한국인의 비타민 B₂, B₂ 및 B₆ 영양상태를 평가하기 위하여 건강성인 남녀의 각 효소별 평균 activity coefficient와 이들의 정상치를 조사하는 한편 적혈구의 냉동저장시 이들 효소의 안정도와 본 실험조작

의 정밀도를 검사하였다.

실험대상

한국인의 정상치 조사는 21~30세 사이의 건강한 의과대학 남녀 학생 27명(남 15명, 여 12명)을 대상으로 1977년 11월 초에 행하여졌으며, 최근에 비타민을 복용하였거나, 복용중인 사람은 본 대상에서 제외되었다. 채혈은 아침식사 전에 시행하였고 적혈구 조제물은 -20°C에서 보관하였다가 3~7일 사이에 실험되었다.

적혈구 효소 안정도 검사 및 실험정밀도 검사시에는 3인의 실험실 근무자를 대상으로 하였다.

실험재료 및 기구

1. 적혈구세척

채혈후 8시간 안에, heparin 처리한 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심한 후, 혈장과 buffy coat를 제거하고, 적혈구와 동 부피의 0.9% 식염수액(6~7°C)으로 1회 세척한 후 재 원심하여 상등액과 남아있는 buffy coat를 제거하였다.

즉시 적혈구 중의 중간에서 200 μ l씩 취하여 5개의 용량 5ml의 시험관에 분배하여 -20°C에 보관하였다.

2. Hemolysate의 조제

Hemolysate는 측정 직전에 다음과 같은 방법으로 조제하였다.

1) transketolase: 200 μ l의 냉동적혈구에 0.8ml의 증류수를 첨가하고 즉시 잘 혼합한후 원심하여 그 상등액을 효소원으로 하였다.

2) glutathione reductase: 200 μ l의 냉동적혈구에 3.8ml의 인산완충액(pH 7.4, 0.1M)을 첨가하고 잘 혼합한후 원심하여 그 상등액을 효소원으로 하였다.

3) aspartate transaminase: 200 μ l의 냉동적혈구에 3.8ml의 증류수를 첨가하고 잘 혼합한 후 원심하여 그 상등액을 효소원으로 하였다.

3. 측정 기구

효소활성의 측정은 Pye Unicam SP 1750 UV-Spectrophotometer를 사용하였으며, hemoglobin의 흡광에 의한 noise를 감소시키기 위하여 slit width는 TK 및 GR의 경우 0.4mm, AST의 경우 0.8mm로 넓혔으며, cuvette cell은 10mm light path의 UV용 석영제를

사용하였다.

Temperature controller 로 활성측정시 cuvette cell의 온도는 37°C 로 유지하였으며, automatic cell changer 를 사용하여, basal activity 와 stimulated activity 는 항상 동시에 측정하였다.

시 약

1. Transketolase 활성의 측정

(1) tris(hydroxy methyl) amino methane buffer (Tris-HCl), 0.1M, pH 7.6 at 37°C.

(2) D-ribose-5-phosphate, disodium salt(sigma 사), 14.4mM in Tris-HCl buffer.

(3) thiamine pyrophosphate chloride(sigma 사), 10 mM in Tris-HCl buffer, 실험직전 조제.

(4) β -nicotinamide-adenine dinucleotide, reduced form, disodium salt(sigma 사), 10mM in Tris-HCl buffer, 사용직전 조제.

(5) α -glycerol-3-phosphate dehydrogenase / triose phosphate isomerase(GDH-TIM) suspension in ammonium sulfate(sigma 사, GDH 1039 U/ml, TIM 11,446 U/ml)를 Tris-HCl buffer 로 6배 희석하여 사용(GDH 활성 : 173U/ml, TIM: 1908U/ml)

2. Glutathione reductase 활성의 측정

(1) potassium phosphate buffer, 0.1M, pH 7.4 at 37°C.

(2) ethylenediaminetetraacetate, potassium salt(wako 사), 75mM in distilled water

(3) nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced form, tetra sodium salt(sigma 사), 2mM in 1% sodium bicarbonate solution, 실험직전 조제.

(4) flavin-adenine dinucleofide, disodium salt(sigma 사), 300 μ M in distilled water, 실험 직전 조제, 광으로부터 차폐시킴.

(5) glutathione, oxidized from, disodium salt(sigma 사), 75mM in 50 mM NaOH solution, 실험직전 조제

3. Aspartate aminotransferase 활성의 측정

(1) tris(hydroxy methyl) amino methane buffer (Tris-HCl), 0.1M, pH 7.4 at 37°C.

(2) aspartate-MDH-NADH mixture, L-aspartate mono potassium salt(sigma 사) 4g 을 100ml 의 Tris-

HCl buffer 에 용해시키고, malate dehydrogease(in ammonium sulfate, sigma 사, 10,000U/ml) 40 μ l 와 NADH 15mg 을 첨가, 실험직전 조제.

(3) 2-oxoglutarate, mono sodium salt(sigma 사), 360mM in Tris-HCl buffer

(4) pyridoxal-5-phosphate (sigma 사), 8.1mM in Tris-HCl buffer, 실험직전 조제, 빛차단

실험 방법

본 실험에 사용된 방법은 Smeets⁷⁾, Beutler^{8,9)} 및 Karmen¹⁰⁾의 방법을 변형한 Bayoumi 와 Rosalki⁶⁾의 방법을 따랐으나 적혈구 세척, hemolysate 의 조제, 효소 활성의 계산 및 반응물의 농도는 다른 연구자들의 보고를 참작하여 부분적으로 변형되었다.

1. Transketolase 활성의 측정

TK 활성의 측정은 2.4ml 의 ribose-5-phosphate 용액에 0.01ml 의 hemolysate, 0.01ml 의 GDH-TIM 용액 및 0.1ml 의 TPP 용액을 첨가하여 37°C 에서 15분간 incubation 시킨후 0.05ml 의 NADH 용액을 첨가하여 즉시 340nm 에서 5분간 반응 속도를 측정하였다. basal activity 의 측정시 0.1ml 의 TPP 용액을 0.1ml 의 Tris-HCl buffer 로 대체하였으며, 2.56ml 의 Tris-HCl buffer 와 0.01ml 의 hemolysate 혼합액을 reference 로 하여 basal activity(-TPP)와 stimulated activity (+TPP)를 항상 동시에 측정하였다.

반응혼합액에서의 각 조성물의 최종농도는 ribose-5-phosphate, 13.4mM; NADH, 195 μ M; TPP, 389 μ M; GDH, 673U/liter; TIM, 7,424U/liter 이었다.

효소활성의 계산은 적혈구 ml 당 시간당 산화되는 NADH 의 micromole 수로 표시하였으며 그 계산식은 다음과 같다.

$$ETK \text{ Activity} = \frac{4A \times 2.57 \times 5 \times 60}{6.22 \times 0.01} = 4A \times 12,360 \text{ U/ml}$$

4A 는 340nm 에서의 분당 흡광도의 변화이며, NA DH 의 molar extinction 은 6.22×10^3 이다. 효소활성은 basal activity(-TPP)와 stimulated activity (+TPP)로 표시 하였으며, activity coefficient 는 basal activity 에 대한 stimulated activity 의 비율이다.

2. Glutathione reductase 활성의 측정

Glutathione reductase 활성의 측정은 2.0ml 의 phos-

phate buffer에 0.1ml의 hemolysate, 0.1ml의 GSSG, 0.1ml의 FAD 및 0.05ml의 EDTA 용액을 첨가한 후 37°C에서 15분간 incubation 하고 즉시 0.1ml의 NADPH 용액을 첨가하여 340nm에서 15분간 흡광도의 감소를 측정하였다. basal activity의 측정은 FAD 용액을 0.1ml의 phosphate buffer로 대체하였고, 2.35ml의 인산완충액과 0.1ml의 hemolysate 혼합액을 reference로 하여 stimulated activity와 항상 동시에 측정하였다.

반응액에서의 각 조성물의 최종농도는 GSSG, 3.1 mM; FAD, 12.2 μ M; EDTA, 1.5mM; NADPH, 8.2 μ M이었다.

GR 활성의 계산은 적혈구 ml 당, 시간당 산화되는 NADPH의 micromole 수로 표시하였다.

$$GR \text{ activity} = \frac{\Delta A \times 2.45 \times 20 \times 60}{6.22 \times 0.1} = \Delta A \times 4,726 \text{ U/ml}$$

ΔA 는 340 nm에서 분당 흡광도의 감소량이며, NADPH의 molar extinction은 6.22×10^3 이다.

효소 활성은 basal activity와 stimulated activity로 표시하였으며, activity coefficient는 stimulated activity의 basal activity에 대한 비율이다.

3. Aspartate aminotransferase 활성의 측정

AST 활성의 측정은 0.2ml의 hemolysate에 0.02 ml의 pyridoxal-5-phosphate 용액과, 2.7ml의 aspartate-MDH-NADH 혼합용액을 첨가하고, 37°C에서 15분간 incubation 한 후, 0.1ml의 2-oxoglutarate 용액을 첨가하여 즉시 340nm에서 15분간 흡광도의 변화를 관찰하였다. basal activity의 경우 0.02ml의 pyridoxal-5-phosphate 용액을 0.02ml의 Tris-HCl buffer로 대체하였으며, 2.82ml의 Tris-HCl buffer와 0.2ml의 hemolysate 혼합용액을 reference로 하여 측정하였다.

반응액에서의 각 조성물의 최종농도는 aspartate, 209 mM; MDH, 3,576U/l NADH, 198 μ M; P-5-P 54 μ M; 2-oxoglutarate 12mM이었다.

AST 활성의 계산은 적혈구 ml 당 시간당 산화되는 NADH의 micromole 수로 나타내었다. 그 계산식은 다음과 같다.

$$EAST \text{ Activity} = \frac{\Delta A \times 3.02 \times 60 \times 20}{6.22 \times 0.2} \\ = \Delta A \times 1,913 \text{ U/ml}$$

ΔA 는 340nm에서의 분당 흡광도의 감소량이며, NADH의 molar extinction은 6.22×10^3 이다. 효소활성은 basal activity와 stimulated activity로 나타내었으며, activity coefficient는 basal activity에 대한

stimulated activity의 비율이다.

실험결과 및 고찰

1. 효소반응 속도의 linearity

TK의 경우 효소활성은 5분간 관찰되었으며, basal activity나 stimulated activity는 모두 초기 2분이 넘어서부터는 효소반응속도의 linearity를 상실하는 것으로 나타났다. 그러므로 효소활성의 계산시 분당 흡광도의 변화는 초기 2분간의 흡광도의 감소량에서 산출하였다.

GR의 활성은 15분간 관찰되었으며 basal activity의 경우 초기 10분간, stimulated activity의 경우 초기 7~8분간은 훌륭한 linearity를 보여주었으므로, 효소활성의 계산시 초기 5분간의 흡광도의 감소량으로부터 분당 흡광도의 변화를 산출하였다.

AST의 활성도 15분간 관찰되었으며 basal activity와 stimulated activity 모두 이 기간 중에 훌륭한 linearity를 유지하였다. 효소활성의 계산시 초기 5분간의 감소량으로 분당 흡광도의 변화량을 산출하였다.

2. 효소활성의 안정도

적혈구를 -20°C에서 장기간 보관할 경우 TK, GR 및 AST의 활성과 이들의 activity coefficient에 어떠한 변화가 오는가를 조사하였다. 3명의 대상자(남 2명, 여 1명)로부터 각기 채혈하여 전술한 방법에 따라 적혈구를 세척한후 각기 잘 혼합하여, 각 대상자 별로 50개의 시험관에 200 μ 씩 분배하여 즉시 -20°C에서 냉동 보관한 후, 초기에는 3~5일 간격, 말기엔 10~15일 간격으로, 35일 동안에 TK의 경우 7회, GR의 경우 5회, AST의 경우 6회 각 효소활성을 측정하였다. 매 측정시마다 각 시료당 4번 반복 측정되었으며 Fig. 1~3에 그 평균값으로 표시하였다.

TK의 경우, Fig. 1에 나타나 있듯이, 냉동 후 1일 후의 측정값은 약간 낮은 활성을 보이고 있으나 초기 20일간의 효소활성의 변화는 거의 없는 것으로 관찰되었다. 35일째 측정시는 약간 낮은 활성을 보이고 있으나 주목할만한 것은 아니다. 처음 1일째 측정의 낮은 활성은 짧은 냉동기간으로 인한 불충분한 hemolysis에 그 원인이 있는 것으로 생각된다.

activity coefficient 역시 실험기간 동안에 큰 변화는 관찰되지 않았으며 35일째 분석시에는 약간 높은 값을 보여주나 주목할만한 것은 아니었다.

GR의 경우(Fig. 2)에도 35일 간의 실험기간 중 활성

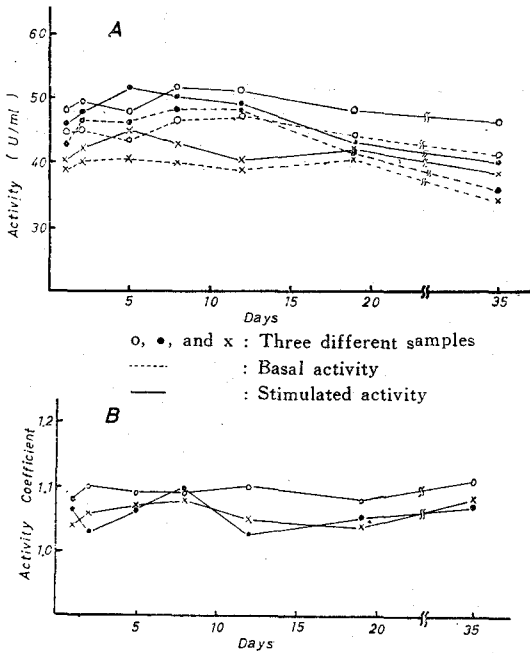


Fig. 1. The effect of deep frozen storage of erythrocyte on transketolase activity (A) and activity coefficient (B).

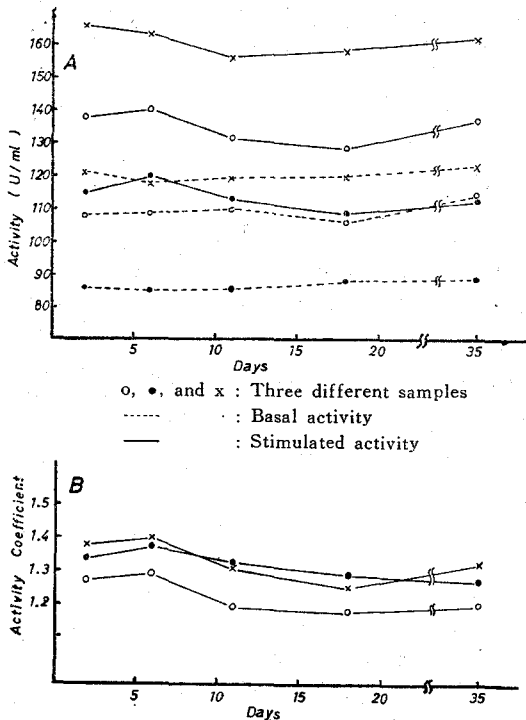


Fig. 2. The effect of deep frozen storage of erythrocyte on glutathione reductase activity (A) and activity coefficient (B).

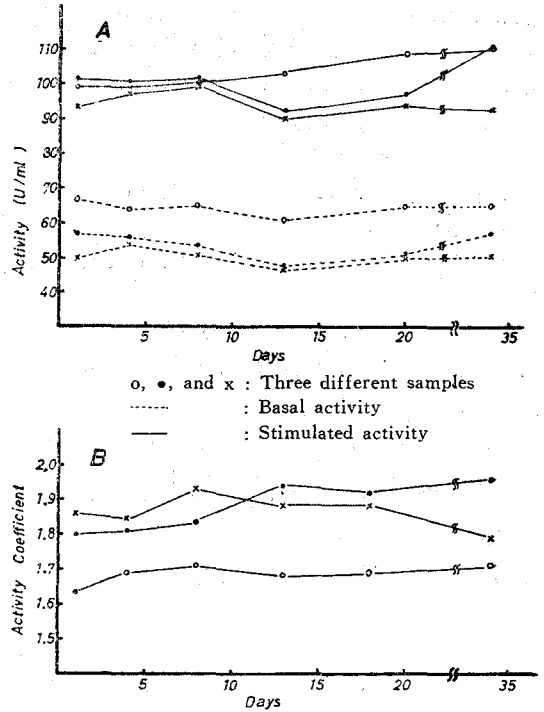


Fig. 3. The effect of deep frozen storage of erythrocyte on aspartate aminotransferase activity (A) and activity coefficient (B).

의 감소 현상은 보이지 않았으며, activity coefficient 역시 큰 변화는 없었다.

AST의 활성(Fig.3)도 큰 변화는 없었고 activity coefficient의 변화도 주목할 만한 것은 아니었다.

Smeets 등⁷⁾, Nichoalds 등¹³⁾, Hoorn¹³⁾와 Rose 등¹⁴⁾은 적혈구 hemolysate의 경우 -18°C 에서 TK나 GR의 활성은 3~4주간은 안정하고 AST 활성의 경우는 8~17%의 감소를 관찰하였다고 보고한 바 있다. 그러나 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾의 보고에 의하면 같은 조건하에서 TK 활성은 2주 후에 10~16% 감소하였고, GR 활성은 16~17%, AST 활성은 8~17% 감소하였다고 보고하고 Smeets 등⁷⁾의 보고는 확실치 않다고 주장하였다.

또한 activity coefficient의 경우는 TK나 GR는 약간의 변화만이 관찰됐으나 AST의 경우는 반으로 감소하였다고 보고한 바 있다.

이와같이 hemolysate의 냉동보관시 얻어지는 효소활성 및 activity coefficient의 변화는 일반 영양, 임상조사 시 비타민 결핍상태를 평가하는 데에 큰 오차를 갖고 올 것이므로 최근에는 적혈구를 냉동 보관하여 효소활성 측정시 hemolysate를 조제하는 방법이 추천되

Table 1. Within and between-batch coefficient of variation for erythrocyte transketolase, glutathione reductase and aspartate aminotransferase

		Activity		Activity coefficient
		Without coenzyme	with coenzyme	
Transketolase	within-batch	5.0(2)*	4.3(2)	0.08
	between-batch	3.5(7)	5.6(9)	0.07
Glutathione Reductase	within-batch	3.1(5)	3.4(4)	0.04
	between-batch	2.3(8)	3.9(5)	0.05
Aspartate Aminotransferase	within-batch	1.6(2)	3.3(3)	0.03
	between-batch	2.6(9)	4.9(10)	0.05

* Figures in parentheses are the results reported by Bayoumi and Rosalki⁶⁾.

고 있다. 본 실험의 결과에 의하면 TK, GR 및 AST 어느 경우에도 35일 간의 실험기간 중 효소활성의 감소 현상은 관찰되지 않았고, activity coefficient의 변화도 임상적으로 주목할 만한 것이 아니었으므로 적혈구의 냉동보관이 hemolysate의 경우보다 비타민의 조

직내 저장량 평가에 있어 바람직하다는 것을 재확인할 수 있었다.

3. 측정 정밀도

TK, GR 및 AST 활성 측정시 존재하는 within-batch

Table 2. Erythrocyte transketolase activity and the effect of coenzyme

No.	Male			Female		
	activity(unit)*		activity** coefficient	activity(unit)*		activity** coefficient
-TPP	+TPP	-TPP		+TPP		
1	43.3	49.4	1.14	37.1	49.4	1.33
2	30.9	49.4	1.60	49.4	49.4	1.00
3	49.4	55.6	1.13	49.4	49.4	1.00
4	37.1	43.3	1.17	37.1	43.3	1.17
5	49.4	55.6	1.13	37.1	49.4	1.33
6	49.4	49.4	1.00	24.7	37.1	1.50
7	37.1	37.1	1.00	49.4	49.4	1.00
8	37.1	37.1	1.00	37.1	49.4	1.33
9	43.3	49.4	1.14	37.1	37.1	1.00
10	43.3	55.6	1.29	37.1	37.1	1.00
11	49.4	55.6	1.13	49.4	49.4	1.00
12	37.1	43.3	1.17	49.4	49.4	1.00
13	30.9	43.3	1.40			
14	30.9	43.3	1.40			
15	30.9	30.9	1.00			
\bar{X}	40.0	46.6	1.18	41.2	45.8	1.14
SD	7.3	7.7	0.17	8.0	5.5	0.18
SE	1.9	6.0	0.05	2.3	1.6	0.05

* One unit of enzyme activity is expressed as the micromoles of NADH oxidized per hour per ml of red cells.

** Activity coefficient is the ratio of stimulated to basal activity.

precision 과 between-batch precision 을 조사하기 위하여 앞의 효소활성 안정도 조사시에 얻어진 결과를 이용하였다.

결과는 coefficient of variation 으로 계산되었으며 Table 1에 나타나있다. Bayoumi, Rosalki⁶⁾의 결과와 비교해 보면 TK의 경우 본 실험의 결과가 약간 높은 within-batch coefficient of variation 을 갖으며 GR와 AST의 경우 유사한 값을 나타내었다. 그러나 between-batch coefficient of variation 은 본 실험의 결과가 훨씬 낮은 값을 갖으며 이는 효소활성이 안정되어 있는 데에 기인하는 것으로 생각된다.

4. 정상치

21~30세 사이의 건강한 대학생 27명(남자 15명, 여자 12명)의 적혈구 TK, GR 및 AST의 활성과 조효소 첨가에 의한 이들 효소의 활성 증대 효과를 관찰한 결과는 Table 2~4와 같았다.

TK의 경우(Table 2) 효소활성의 평균치는 남자 40.0

units 여자 41.2 units 이었고 activity coefficient의 평균값은 남자 1.18(18% activation), 여자 1.14(14% activation)으로 정상치의 상한선(mean+2SD)은 남자가 1.52, 1.50으로 관찰되었다. 이 결과는 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾, Smeets 등⁷⁾ 및 Dreyfus¹⁵⁾ 등이 보고한 평균 9~13%의 activation(activity coefficient 1.09~1.13)과 비교하여 큰 차가 없는 것이나, 정상치 상한선은 이들의 20~23%라는 보고와 차이가 난다.

GR의 경우(Table 3)는 효소활성의 평균값이 남자 93.0units 여자 126.8units로 여자의 경우 높은 활성을 보였다. 그러나 조효소 활성화 효과에 있어서는 평균 activity coefficient가 남자 1.35 여자 1.33으로 큰차가 없었다. 한편 정상치 상한선은 남자 1.69, 여자 1.61이었다. 이 결과는 Bayoumi와 Rosalki의 평균 32%의 activation과 76%의 정상치 상한선과 유사한 것이었다.

AST(Table 4)의 경우 효소활성의 평균치는 남자 52.2 units 여자 61.7units이고 activity coefficient의 평균

Table 3. Erythrocyte glutathione-reductase activity and the effect of coenzyme

No.	Male			Female		
	activity(unit)* -FAD	activity(unit)* +FAD	activity** coefficient	activity(unit)* -FAD	activity(unit)* +FAD	activity** coefficient
1	96.4	127.6	1.32	171.1	175.8	1.03
2	64.3	76.6	1.19	110.6	156.9	1.42
3	108.2	137.5	1.27	94.5	144.6	1.53
4	77.5	126.7	1.63	134.2	158.8	1.18
5	130.4	150.3	1.15	120.9	166.6	1.38
6	87.9	138.0	1.57	133.3	165.4	1.24
7	88.9	116.3	1.31	109.6	152.2	1.39
8	98.3	123.8	1.26	115.3	155.0	1.34
9	146.5	162.6	1.11	138.9	180.5	1.30
10	83.2	120.0	1.44	138.0	191.9	1.39
11	106.1	120.1	1.19	134.2	169.2	1.26
12	101.1	107.8	1.19	120.9	176.8	1.46
13	72.8	107.8	1.48			
14	59.6	96.4	1.62			
15	73.7	107.8	1.46			
\bar{X}	93.0	121.3	1.35	126.8	166.1	1.33
SD	23.7	21.3	0.17	19.5	13.5	0.14
SE	6.1	5.5	0.05	5.6	3.9	0.04

* One unit of enzyme activity is expressed as the micromoles of NADPH oxidized per hour per ml of red cells.

** Activity coefficient is the ratio of stimulated to basal activity.

Table 4. Erythrocyte aspartate aminotransferase activity and the effect of coenzyme

No.	Male			Female		
	activity(unit)* -P-5-P	activity(unit)* +P-5-P	activity** coefficient	activity(unit)* -P-5-P	activity(unit)* +P-5-P	activity** coefficient
1	36.1	96.7	2.68	69.9	111.9	1.60
2	80.4	145.1	1.80	54.2	106.0	1.96
3	64.1	114.2	1.78	67.6	110.1	1.63
4	68.2	131.7	1.93	57.7	113.6	1.97
5	61.2	110.7	1.81	49.5	101.4	2.05
6	35.6	94.4	2.66	54.2	99.0	1.83
7	57.1	113.6	1.99	72.2	132.3	1.83
8	45.4	80.4	1.77	49.5	85.1	1.72
9	62.3	111.3	1.79	48.9	90.3	1.85
10	51.3	98.5	1.92	133.4	159.6	1.20
11	35.5	81.0	2.28	40.2	85.1	2.12
12	54.8	95.6	1.74	43.1	92.6	2.15
13	39.0	81.6	2.09			
14	43.1	86.2	2.00			
15	48.9	91.5	1.87			
\bar{X}	52.2	102.2	2.01	61.7	103.3	1.83
SD	13.5	18.9	0.30	24.8	21.4	0.27
SE	3.5	4.9	0.08	7.2	6.2	0.08

* One unit of the activity is expressed as the micromoles of NADH oxidized per hour per ml of red cells.

** Activite coefficient is the ratio of stimulated to basal activity.

치는 남녀 각기 2.01, 1.83이었다. 정상치의 상한선은 각기 2.61, 2.37로 Bayoumi와 Rosalki의 83% 평균 activation(activity coefficient 1.83), 131% (activity coefficient 2.31)의 정상치 상한선과 여자의 경우에는 유사한 결과이었으나, 남자의 경우는 약간 높은 값을 보이고 있어 주목할만 하다.

결 론

본 실험에서는 조직내 비타민 영양상태 평가의 한 방법으로 최근에 시도되고 있는, 적혈구 transketolase, glutathione reductase 및 aspartate aminotransferase 활성에 미치는 조효소들의 활성화 효과를 관찰하는 생화학적 방법을 도입하여 한국인의 조직내 vitamin 영양상태의 정상치를 구하고자 하였다.

적혈구내 이들 각 효소활성은 적혈구 자체를 냉동보관할 경우 상당 기간 동안 활성의 감소가 없음이 확인되었다. 이는 지금까지 Smeets⁷⁾, Beutler^{8,9)}, Karmen¹⁰⁾ 및 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾등의 여러 보고자들이 행하였

던 hemolysate의 냉동 보관시에 관찰되었던 활성감소 현상을 배제함으로써 between-batch coefficient of variation을 낮추는 것으로 관찰되었으며, 영양검사 및 임상검사를 목적으로 하는 일반 실험실에서의 오차를 감소시킬 수 있다는 점에서, 적혈구 자체의 냉동보관이 바람직하다는 결론을 얻을 수 있었다.

한편 측정 within-batch coefficient of variation은 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾의 보고와 유사하였다.

건강한 21~30세 사이의 의과대학생을 대상으로 하여 얻은 activity coefficient의 정상치(mean+2SD)는 TK의 경우 남자 1.52, 여자 1.50, GR의 경우 남자 1.69, 여자 1.61, 그리고 AST의 경우 남자 2.61 여자 2.37로 Bayoumi와 Rosalki⁶⁾의 결과와 유사하였으나 Nichoalds 등¹²⁾, Hoorn 등¹³⁾, Nobbs¹⁶⁾ 및 Glatzlo¹⁷⁾이 보고한 것에 비하면 상당히 높은 값을 나타내고 있다. 그러나 이는 실험방법의 차이에서 기인하는 것이며 방법론의 표준화가 이루어지면 해결되어 질 수 있으리라 생각된다.

이상과 같은 결과는 비록 실험대상자의 수가 충분치

는 못하였으나, 한국인의 체내 비타민 B₁, B₂ 및 B₆ 영양상태의 평가에 참고가 되어지리라 믿으며, 영양학과 임상학분야에서 유용한 방법론으로써 계속적인 연구가 기대되어지는 바이다.

참 고 문 헌

- 1) Brin, M., Shohet, S.S. and Davidson, C.S.: *The effect of thiamine deficiency on glucose oxidative pathway of rat erythrocyte. J. Biol. Chem.* 230, 319(1958)
- 2) Glatzle, D., Weber, F. and Wiss, O.: *Enzymatic test for the detection of riboflavin deficiency. NADPH-dependent glutathione reductase of red blood cells and its activation by FAD in vitro. Experientia* 24, 1122(1968)
- 3) Tillotson, J.A. and Sauberlich, H.E.: *An enzymatic measurement of the riboflavin status in man. J. Nutr.* 101, 1459(1971)
- 4) Racica, N. and Sauberlich, H.E.: *Blood cell transaminase activity in human vitamin B₆ deficiency. Am. J. Clin. Nutr.* 15, 67(1964)
- 5) Krishnaswamy, K.: *Erythrocyte transaminase activity in human vitamin B₆ deficiency. Int. J. Vitm. Nutr. Res.* 41, 240(1971)
- 6) Bayoumi, R.A. and Rosalki, S.B.: *Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B₁, B₂ and B₆. Clin Chem.* 22, 3, 327 (1976)
- 7) Smeets, E.H.J., Muller, H. and De Weal, J.: *A NADH-dependent transketolase assay in erythrocyte haemolysates. Clin. Chim. Acta.* 33, 379(1971)
- 8) Beutler, E.: *Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: In vivo and vitro studies. J. Clin. Invest.* 48, 1957(1969)
- 9) Beutler, E.: *Glutathione reductase: Stimulation in normal subjects by riboflavin supplementation. Science* 165, 193(1969)
- 10) Karman, A.: *A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxaloacetate transaminase in human blood serum. J. Clin. Invest.* 34, 131(1955)
- 11) Stanulovic, M, Miletic, D. and Stock, A.: *The diagnosis of pyridoxine deficiency based on the estimation of the erythrocytic aspartate aminotransferase and its stimulation in vitro with pyridoxal-5-phosphate. Clin. Chim. Acta.* 17, 353(1967)
- 12) Nichoalds, G.E., Lawrence, J.D. and Sauberlich, H.E.: *Assessment of status of riboflavin nutrition by assay of erythrocyte glutathione reductase activity. Clin. Chem.* 20, 624(1974)
- 13) Hoorn, R.K. J., Flikweert, J.P. and Westeirnk, D.: *Vitamin B₁, B₂, and B₆ deficiencies in geriatric patients, measured by coenzyme stimulation of enzyme activities. Clin. Chim. Acta.* 61, 151(1975)
- 14) Rose, D.P., Strong, R., Folkard, J., and Adams, P.: *Erythrocyte aminotransferase activities in women using oral contraceptives and the effect of vitamin B₆ supplementation. Am. J. Clin. Nutr.* 26, 48(1973)
- 15) Pierre, M, Dreyfus: *Clinical application of blood transketolase determinaitons. The New Endgland Journal of Medicine* 267, 12, 596 (1962)
- 16) Nobb, B.T.: *Pyridoxal phosphate status in clinical depression. Lancet* i 405(1974)
- 17) Glatzle, D., Vuillenmier, J.P., Weber, F., and Decker, K.: *Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in human. Experientia* 30, 665(1974)