

한국인 중풍 환자의 기허군 화열군의 plasma free hemoglobin의 비교

임지혜 · 고미미 · 이정섭¹ · 이명수 · 차민호 *

한국한의학연구원 표준화연구본부 뇌질환연구센터, 1: 국립재활원

Different Level of Plasma Free Hemoglobin between Qi-deficiency and Fire Heat among Korean Stroke Subjects

Ji Hye Lim, Mi Mi Ko, Jung Sup Lee¹, Myeong Soo Lee, Min Ho Cha *

Brain Disease Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1: National Rehabilitation Center

The purpose of this study was to fine proteins, which have significantly different level in plasma between Qi-deficiency and Fire-heat group of Korean Oriental Stroke pattern identification (PI) among Korean stroke patients. Eighteen stroke patients with Qi-deficiency and forty nine patients with Fire-heat, which had critical syndrome of each PI, were participated in this study. Plasma protein pattern were analyzed by SELDI-TOF MS using Q10 strong anion exchange chip and Mass spectral data (m/z) statistically determined. The expression level of proteins, which were different between Qi-deficiency and Fire-heat in the results by SELDI-TOF MS, were confirmed by western blot. As a result of analyzing plasma protein by SELDI-TOF MS, six protein peaks were significantly higher in Fire-heat group than Qi-deficiency group. Two peaks among of them, M15003 and M15745, were respectively identified as hemoglobin alpha and beta in previous study. Expression level of plasma free hemoglobin of Fire-heat group was also confirmed higher in Fire-heat group than in Qi-deficiency group. These findings suggest that plasma free hemoglobin is a candidate for discriminating Qi-deficiency and Fire-heat group according to pattern identification (PI) of stroke.

Key words : Qi-deficiency, Fire-heat, pattern identification/syndrome differentiation, hemoglobin, SELDI- TOF MS, Stroke

서 론

한의학적 진단의 원천기술인 변증(Pattern identification/Syndrome differentiation, PI/SD)은 중풍에 대하여 환자의 특이적, 비특이적 증상을 종합하여 병인, 병기, 치료방법, 치료약물을 구성하는 한의학적 진단체계로서 “한의학중풍진단 표준화위원회”에서 제시된 표준안에 근거하면 중풍의 변증아형은 화열증, 음허증, 기허증, 습담증, 어혈증 5가지로 분류된다¹⁾. 하지만 이러한 변증은 통일된 표준안 부재, 표준화된 변증 진단 측정지표의 부재, 수치화가 가능한 객관적 생체지표의 정보취약 등으로 주관적인 진단지표에 의존하며 이로 인한 일관성 및 재현성의 부족이

지적되고 있다. 이로서 유전체, 단백질체, 대사체 등의 오믹스(omics) 기법에 의한 생체지표 발굴은 다소 주관적인 변증 진단에 대한 객관화 및 과학화 효율을 높이는데 생물학적 근거를 뒷받침할 수 있는 중요한 과정이다.

‘한의 중풍변증 표준안-II’에서 제시된 화열증과 기허증은 변증별 주요 지표를 기반으로 분류한 변증 아형 중 다소 임상적 증상 차이가 뚜렷하게 나타나는 변증 증상이다. 일례로, 화열(火熱, Fire Heat Pattern)은 지나친 감정적 자극, 스트레스, 긴장 등이 원인이 되어 주로 간과 심장의 열이 과다하게 항진되어 이것을 제어할 수 없게 되면 의식이 혼미해지고 마비 등이 생기는 증상이 나타난다²⁾. 반면에, 기허(氣虛, Qi Deficiency)는 원기가 부족해지고 오장육부의 기능이 저하되어 병에 대한 저항력이 떨어진 상태로써 만성피로, 무기력증의 증상이 나타난다^{3,4)}. 최근 ‘한의 중풍진단 표준화위원회’에서 제시한 중풍변증 표준안에 근거하여 분류 가능한 임상적 변증지표를 보면 화열증은 얼굴빛이

* 교신저자 : 차민호, 대전시 유성구 전민동 엑스포로 483, 한국한의학연구원

· E-mail : mhchamin@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9566

· 접수 : 2011/05/23 · 수정 : 2011/06/21 · 채택 : 2011/07/22

붉으며, 머리가 열나는 것 같이 아프고, 몸에 열감이 나면서 더운 것을 싫어하고, 가슴이 답답하며 충혈, 구설생창, 수족열, 황태(설진) 등의 증상이 주로 나타나는 반면 기허증은 얼굴빛이 창백하고 기운이 없어 보이며, 쉽게 피로하고 기운이 없으며 수족결냉, 치흔(설진) 등의 증상을 나타낸다⁵⁾.

사람의 혈액(혈청)에는 인체의 상태를 반영하는 각종 단백질 및 저분자 물질들이 많이 있지만 주로 albumin, transferrin, haptoglobin, immunoglobulin, a-2-macroglobulin 등이 90% 이상이며 정보를 주는 목표 단백질은 매우 미량인데다 복잡하며 유전적으로 뿐만 아니라 환경적으로 다양한 조건 (영양상태, 약물복용, 심리적요인 등)에 처해있기 때문에 그들에 대한 반응이 신체의 변화에 반영되어 있고 이들이 모두 고려된 상태에서 실험군에 대한 특이적인 질병 바이오마커를 찾아내는 일은 어려운 일이다⁶⁾.

SELDI-TOF MS (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)는 2D와 함께 환자 혈장의 저분자량 단백질 분포차이를 알아보는데 유용하며 감수성과 특이성이 매우 높은 정량적 질량분석 도구로서⁷⁾ 최근 이를 이용하여 뇌혈관 질환에 있어 중풍을 비롯한 지질대사이상으로 나타나는 이상지질혈증, 고지혈증, 동맥경화증 등의 바이오마커로 S-100 protein, NSE, Hemoglobin, Haptoglobin, Apolipoprotein E (ApoE), Matrix metaloproteinase 9 (MMP-9) 등이 연구되어 있다^{8,9)}. 이로서 본 연구에서는 SELDI-TOF MS를 이용하여 기허증과 화열증 환자에서 차이를 보이는 혈장 단백질을 확인하였으며, 이 중 plasma free hemoglobin이 화열증에서 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다.

연구대상 및 방법

1. 대상환자

2008년 5월부터 2009년 5월까지 경희대 한방병원, 동국대 한방병원, 대전대 한방병원 및 원광대 한방병원 병원에 입원한 중풍환자 중 발병일로부터 30이내의 뇌경색 환자 가운데 “한의 중풍변증 표준안-II”의 연구에 서면 동의한 환자를 대상으로 하였다. 전문가 2인에 의해 “한의 중풍 변증 표준안 II”의 5개 변증 중 기허증과 화열증으로 분류된 환자를 대상으로 하였으며, 두 변증의 증상을 뚜렷이 구분하기 위하여 기허증에서는 “권태핍력” 및 “얼굴이 창백하다”의 증상은 모두 가지고 있으며, “설태색황”, “얼굴이 붉다” 및 “열감이 나면서 더운 것을 싫어한다”의 증상이 없는 사람을 대상으로 하였으며, 화열증에서는 “얼굴이 붉다”, “물을 많이 마신다”, “열감이 나면서 더운 것을 싫어한다”의 증상 중 2개 이상을 가지고 있으며, “얼굴이 창백하다”, “무력맥” 및 “치흔”의 증상이 없는 환자를 대상으로 하였다. 본 연구는 한국한의학회 연구원 기관생명 윤리위원회 및 각 한방병원 윤리심의위원회의 승인을 받아 진행하였으며, 연구 대상자들의 변증 증상 및 중풍 위험요인에 대한 정보(흡연, 음주, 가족력, 합병증 등)는 고호연 외 10인에 의해 보고된 임상증례기록지(case report form :CRF)를 이용하여 조사하였다¹⁰⁾.

2. 혈장의 전처리

서면 동의한 대상 환자로부터 혈액을 채혈한 후, 2000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 사용 전까지 -70℃ 이하에서 보관하였다. SELDI-TOF MS 분석을 위하여 10 ul의 혈장에 15 ul의 Denaturation solution (8M Urea, 1% CHAPS)을 부가한 후, 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 1800 ul의 Binding solution (50 mM Tris-Cl, 0.1% Triton X-100)을 부가하여 전 처리하였다.

3. SELDI-TOF MS 분석

혈장 내 단백질 분석은 SELDI-TOF MS를 사용하였으며, 실험방법은 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 간략히 설명하면, 전 처리한 혈장시료를 Q10 strong anion exchange chip (Ciphaergen Biosystems Frem, USA)에 점적한 후, 30℃에서 30분간 결합시킨 후 Binding solution (50 mM Tris-Cl, 0.1% Triton X-100)과 증류수로 세척 후 공기 중에서 완전히 건조시켰다. 그 후 EAM (Energy Absorbing Molecule) 용액(50% acetonitrile, 0.5% trifluoroacetic acid, 5 mg SPA)을 각각의 칩에 점적하였다. 칩은 Protein Biology System II (Ciphaergen Biosystems Frem, USA)으로 분석하였다. 레이저 강도는 190으로 측정하였으며 민감도는 7로 time-of-flight spectra를 얻었다. 전체량과 internal control로 사용된 Apolipoprotein A1(M 27,894Da)을 기준으로 평균화를 수행하였으며 질량 피크의 선택과 스펙트럼의 비교는 Biomarker wizard Ciphaergen Biosystems (Ciphaergen Biosystems Frem, USA)을 이용하여 분석하였다.

4. Western blot 분석

혈장을 4X SDS와 섞어 200 mA로 4-10% NuPAGE gradient gel을 이용하여 1시간 동안 전기영동하여 분자량에 따라 분리한 후, 상기 단백질을 20V, 400A의 조건으로 1시간 동안 니트로셀룰로오즈 막으로 옮긴 후 1차 항체인 anti-hemoglobin alpha 및 anti-hemoglobin beta (Santa Cruz biotech, UK)를 각각 결합시키고 2차 항체를 순차적으로 반응하여 단백질의 발현 양상을 비교하였다.

5. 통계분석

모든 연속변수는 Kolmogorov-Smirnov normality test를 시행하여 정규분포를 확인하였으며, 그 결과에 따라 정규분포를 따르는 경우는 T-test를 시행, 정규분포를 따르지 않는 경우는 Wilcoxon test를 수행하였다. 통계분석은 SAS software version 9.1.3 (SAS Institute Inc. NC) 을 이용하였으며, 두 군간의 유의성은 p 값 <0.05 수준에서 결정하다.

결 과

1. 기허증 및 화열증의 임상적 특성비교

기허증 환자 18명과 49명의 화열증 환자의 일반적인 임상적 특성을 비교한 결과, 기허증 환자는 여성 비율이 77.8%, 화열증

환자는 남성 비율이 87.8%로 성별에 따라 변증의 차이를 확인하였다. 또한 환자의 과거력을 비교해 본 결과, 화열증에서 고혈압을 가졌던 비율이 다소 유의하게 높았다 ($p=0.0475$). 두 변증 환자간의 신체적 차이를 조사한 결과에서는 기허증 환자의 체중이 54.65 kg, 화열증 환자의 66.95 kg 에 비해 유의적으로 감소하였으며 ($p=0.0013$), 혈장 내 생화학적 지표에서는 화열증의 혈중 헤모글로빈 수치가 14.49 g/dL 로 기허증 환자의 12.64 g/dL 에 비해 높은 경향성을 나타내었다 ($p=0.0027$). 이외에 RBC, HCT의 혈중 수치는 화열증에서 약간 증가한 유의적인 결과를 보였다 (Table 1).

Table 1. Clinicopathologic characteristics between Qi Deficiency and Fire Heat group

Characteristic	Qi Deficiency (N=18)	Fire Heat (N=49)	P
Anthropometric characteristics			
Sex(M/F)	4/14	43/6	<.0001
Age	70.167±13.035	66.184±10.770	0.2097
Subtype.(ICH/SAH/CI)	1/0/17	4/0/45	1.000
TOAST classification (LAA/CE/SVO/SOE/SUE)	3/1/13/0/0	13/3/24/2/2	0.5257
Smoking(Y/N)	3/15	20/29	0.065
Drinking(Y/N)	4/14	35/14	0.0003
BM(kg/m ²)	22.499±4.031	23.887±3.747	0.2908
Waist(cm)	84.3±9.534	89.939±9.906	0.1065
WHR	0.9351±0.109	0.9573±0.083	0.4885
History			
TIA(y)	0(0)	6(12.24)	0.1806
Hypertention	15(83.33)	28(57.14)	0.0475
Hyperlipidemia	1(5.56)	9(18.37)	0.2666
Diabetic mellitus	5(27.78)	14(28.57)	0.9491
Ischemic heart	2(11.11)	1(2.04)	0.1735
Blood parameter			
WBC	7.379±2.514	8.234±2.381	0.2041
RBC	4.180±0.625	4.6404±0.539	0.0042
Hg	12.644±2.333	14.492±2.075	0.0027
HCT	36.767±5.765	42.149±5.566	0.0009
Plat	296.72±106.12	259±105.850	0.2009
GOT(U/ml)	33.5±39.194	29.096±14.153	0.6468
GPT(U/ml)	38.056±61.795	28.908±17.268	0.5435
T-Chol(mg/dL)	189.5±49.382	182.59±43.317	0.5793
Trig(mg/dL)	164±82.034	169.33±73.471	0.8015
HDL(mg/dL)	47.806±13.004	46.398±15.08	0.7346
LDL_C(mg/dL)	240.52±121.74	276.34±133.75	0.3262
FBS(mg/dL)	115.28±36.972	126.89±64.742	0.3851
BUN	17.806±10.03	14.283±5.505	0.1725
Cr	0.9289±0.718	0.9521±0.286	0.8955

All results except age, subtype of stroke, TOAST classification, smoking, drinking are expressed as mean±SD for parametric variables or as median (interquartile range) for non-parametric variables. P-values with statistical significance were presented in bold.

2. SELDI-TOF MS 를 이용한 두 군간 연관 단백질 분석의 차이

기허증 및 화열증 증상이 뚜렷한 중풍환자 각각 18명, 49명을 대상으로 혈장을 채취한 후 SELDI-TOF MS 를 이용하여 두 군 간의 혈장 내 단백질의 차이를 분석하였다. 두 군 사이 스펙트럼에서 양적 차이를 보이는 단백질은 Fig 1a에 표시하였으며, 차이를 보이는 단백질 종류는 Table 2에 표시하였다. 관찰된 단백질 종류는 모두 화열증에서 유의하게 증가하였으며, 이전 연구에서 각각 Hemoglobin alpha와 beta로 확인된 M15003과

M15735의 양이 화열증에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다 ($p=0.0104$, $p=0.0149$)(Fig. 1b). 또한 화열증에서 유의하게 증가되는 것으로 확인된 M7474와 M7846은 각각 M15003과 M15735이 double charge 된 것임을 확인하였다. 이상의 결과는 혈장 내 free hemoglobin이 기허증에 비해 화열증에서 증가하는 것을 보여준다.

Table 2. Descriptive Statistics for the Peaks Constituting a Differential Pattern between Qi Deficiency and Fire Heat group

M/Z value(kDa)	Log normalised Intensity		P
	Qi Deficiency (N=18)	Fire Heat (N=49)	
M6040_48	1.027 (0.095, 1.862)	1.985(1.399, 3.191)	0.0011
M7474_96	8.716(3.169, 19.270)	19.346(8.960, 34.661)	0.0055
M7846_98	6.495(2.513, 12.024)	10.567(7.300, 22.057)	0.0075
M15003_1	16.359(6.058, 29.965)	27.724(18.279, 49.188)	0.0104
M15208_0	5.004(2.176, 9.315)	7.458(5.370, 13.963)	0.0168
M15745_3	10.362(4.344, 19.166)	17.795(11.081, 32.328)	0.0149

Values means median (interquartile value) and p value were calculated by Mann-Whitney U test.

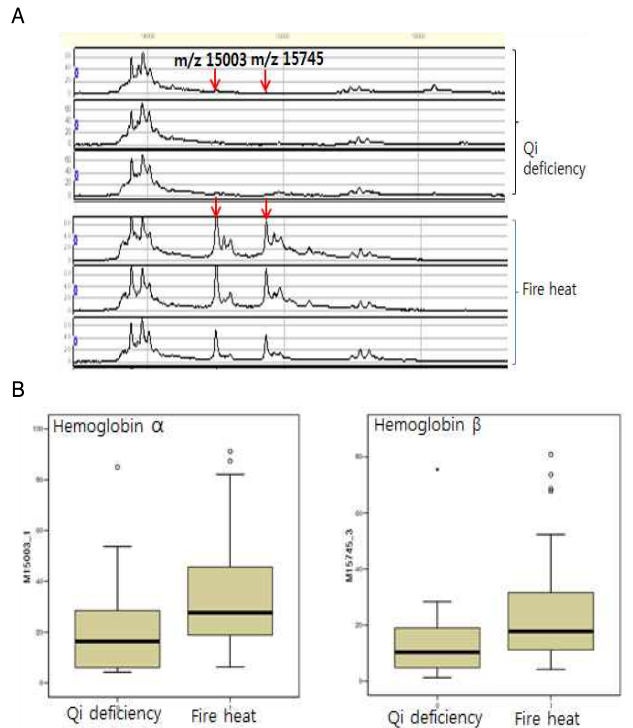


Fig. 1. SELDI-TOF-MS protein spectra of marker of m/z value around 15.0 KDa, 15.7 KDa. (a) Representative protein spectra ranging from 13.5K to 17.0K of Qi-deficiency and Fire-heat group. The mass is given as m/z values on the x-axis and the intensity is displayed along the y-axis. The arrow indicated highly expressed protein peaks in Fire-Heat compared with Qi-deficiency. (b) Peak intensity of representative candidate proteins in the Qi-deficiency and Fire-heat. The box-whisker plots indicate the median value (thick line) and the 25th (lower line of box) and 75th (upper line of box) percentile.

3. 혈장 내 free hemoglobin의 변화 확인

SELDI-TOF MS에서 관찰된 혈장 내 free hemoglobin의 변화를 확인하기 위하여 변증군의 혈장을 대상으로 hemoglobin 특이항체 (anti-Hba antibody, anti-Hbβ antibody)를 이용한 western blot을 수행하여 검증하였다. 그 결과, SELDI-TOF MS

분석 시 internal control로 사용된 Apolipoprotein A1의 경우 양적 차이를 보이지 않는 반면, 혈장 내 free hemoglobin α 와 β 가 기허증에 비해 화열증에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

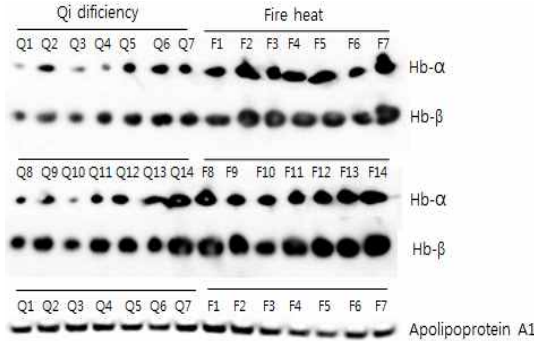


Fig. 2. Expression of plasma free hemoglobin of each subject between Qi-deficiency and Fire-heat group. Plasma hemoglobin from Qi-deficiency (n=14, Q1-Q14), Fire-heat (n=14, F1-F14), Apolipoprotein as internal control (n=14, Q1-Q7, F1-F7) was determined by Western blot analysis.

고찰

현재 중풍을 진단하는 방법은 뇌의 CT (computerized tomography)와 MRI (magnetic resonance imaging) 및 MRA 등이 사용되고 있으나, 이들의 방법은 중풍 발병 유무, 발병 위치 및 크기 등을 결정하는 영상진단으로 한의학적 중풍 진단 및 치료의 근간인 변증 진단에는 활용되고 있지 않는 실정이다. 이에 따라 최근에는 유전체, 단백질, 대사체 분석을 기반으로 변증과 연관된 생물학적 지표를 발굴하고 이들의 검증을 통하여 진단에 활용하고자 하는 연구가 대체의학, 특히 중의학에서 많이 진행되고 있다¹¹⁾.

본 연구에서는 단백질 분석법 중 하나인 SELDI-TOF MS를 이용하여 기허증과 화열증의 혈장에서 유의한 차이를 보이는 단백질을 발굴하고자 하였다. 화열증은 기허증에 비해 상대적으로 혈액 내 적혈구 수치가 높으며, 또한 고혈압 환자가 많았다 (Table 1). 이는 이전의 결과와 유사하였으며, SELDI-TOF MS를 이용한 혈장 단백질 분석에서 혈장 내 free hemoglobin이 기허증에 비해 화열증에서 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 증가는 화열증의 증상지표인 '얼굴색이 붉다' '설질이 붉다' 등과 밀접한 연관성이 있을 것으로 추정된다¹²⁾.

혈장 내 free Hemoglobin (α/β subunit)는 혈관 내 용혈 (Intravascular hemolysis)시 적혈구로부터 유리되며, hemoglobin scavenger 역할을 하는 Haptoglobin, CD163, Hemopexin 복합체에 의해서 제거되는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 그러나, 혈장 내 유리 헤모글로빈의 함량이 증가하게 되면 산화질소의 소비가 촉진되어 부족 또는 결핍이 되어 지방간 생성으로 인한 동맥경화증이 발생하게 된다¹⁴⁾. 산화질소(NO)는 아르지닌 (Arg) 으로부터 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의하여 혈관의 내벽에서 자연스럽게 생성되어 분비되는 물질로 세포 내 cGMP 상승작용을 통하여 혈관 주변의 근육을 이완

하여 탄력성을 증가시켜 혈액의 흐름을 원활히 한다. 이 외에도 항산화 작용을 통해 혈전 형성을 일으키는 트롬빈 (thrombin)의 생성을 억제하여 심장마비와 뇌졸중 발생을 예방시키며 체내 신호전달 역할을 하여 체내 모든 기능의 역할을 촉진시키는 등의 중요한 역할을 하는 작용을 한다¹⁵⁾. 특히, NO의 활성은 고혈압과 밀접한 연관성을 가지고 있다. Irvine 등은 혈관 확장을 유도함으로써 혈압 조절에 관여하는 NO의 불활성이 혈압의 지속적인 상승을 유발하여 고혈압을 유발한다고 보고하였으며¹⁶⁾, Kass 등은 고혈압이 심근 (myocardium)에서 nitric oxide synthase-3의 활성을 억제함으로써 NO의 활성에 영향을 주는 것을 확인하였다¹⁷⁾.

이상의 결과, 혈장 내 free hemoglobin이 중풍환자의 변증 유형 중 화열증과 밀접한 연관성이 있으며, 변증 진단 시에 하나의 객관적 생체지표로 활용될 수 있을 것이다. 하지만 본 연구 결과에는 몇 가지 한계점이 있다. 첫째는 샘플 수가 부족하며, 특히 성비의 불균형에 따라 일반화하기 어렵다는 것이다. 둘째는 환자 선별 시 기허증 및 화열증의 대표적인 증상을 가지고 있는 환자를 선별함에 따라 일부 증상만을 가지고 있는 환자는 배제하였다. 따라서, 혈장 내 free hemoglobin과 변증과의 연관성을 확인하기 위한 대규모 연구가 요구된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 K11132의 지원을 받아 수행하였다.

참고문헌

1. 전국한외과대학 심계내과학교실. 心系內科學. 서울군자출판사, pp 331-342, 393-408, 2006.
2. 이정섭, 고미미, 강병갑, 김정철, 김보영, 이 인, 김윤식 등. 중풍환자의 화열변증 진단지표에 관한 연구. 동의생리병리학회지 23(2):499-504, 2009.
3. 강병갑, 선승호, 강경원, 조기호, 이 인, 설인찬 등. 중풍환자의 기허변증 진단 기준에 관한 연구. 동의생리병리학회지 21(6):1581-1585, 2007.
4. 정완우, 이원철. 중풍의 담인설에 대한 고찰. 동국대학교 한의학연구소논문집, 8(1):133-144, 1999.
5. Kim, H.J., Bae, H.S., Park, S.U., Moon, S.K., Park, J.M., Jung, W.S. Clinical approach to the standardization of oriental medical diagnostic pattern identification in stroke patients. Evid Based Complement Alternat Med. pp 1-7, 2010.
6. 조상연, 이은영, 이형주, 나 근, 정슬기, 김광열 등. 프로테오믹스 최신연구동향 (혈액 단백질 바이오마커 발굴, 검증 및 정량분석을 위한 단백질 분석기술발전의 최신동향).
7. De Bock, M., de Seny, D., Meuwis, M.A., Chapelle, J.P., Louis, E., Malaise, M. Challenges for biomarker discovery in body fluids using SELDI-TOF-MS. J Biomed Biotechnol.

- 2010.
8. Abdul-Salam, V.B., Ramrakha, P., Krishnan, U., Owen, D.R., Shalhoub, J., Davies, A.H. Identification and assessment of plasma lysozyme as a putative biomarker of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(5):1027-1033, 2010.
 9. Sanchez, J.C., Lescuyer, P., Hochstrasser, D., Allard, L. Detection of biomarkers of stroke using SELDI-TOF. *Methods Mol Biol.* 357: 343-350, 2007.
 10. 고희연, 김중길, 강병갑, 김보영, 고미미, 강경원 등. 한국형 중풍변증 표준안-II에 대한 보고. *동의생리병리학회지* 20(6):1789-1792, 2006.
 11. Chen, S., Lv, F., Gao, J., Lin, J., Liu, Z., Fu, Y., et al. HLA class II polymorphisms associated with the physiologic characteristics defined by Traditional Chinese Medicine: linking modern genetics with an ancient medicine. *J Altern Complement Med.* 13(2):231-239, 2007.
 12. 차민호, 김소연, 임지혜, 강병갑, 고미미, 김노수, 이정섭, 방옥선. 급성기 중풍환자에서 비만 및 혈액지표의 기허 및 화열 변증의 차이에 대한 고찰. *대한한방내과학회지* 30(4):772-779, 2009.
 13. Nagel, R.L., Gibson, Q.H. The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. *J Biol chem,* 246: 69-73, 1971.
 14. Azarov, I., He, X., Jeffers, A., Basu, S., Ucer, B., Hantgan, R.R. Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin. *Nitric Oxide.* 18(4):296-302, 2008.
 15. Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P., Gladwin, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 293(13):1653-1662, 2005.
 16. Cyril H. Barton, Zhemin Ni and Nosratola D. Vaziri. Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension *Kidney International* 60: 1083-1087, 2001.
 17. Takimoto, E., Champion, H.C., Li, M., Ren, S., Rodriguez, E.R., Tavazzi, B., Kass, D.A. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest.* 115(5):1221-1231, 2005.