

## RBL-2H3에서 IgE-dependent Histamine-releasing Factor에 의한 활성산소종 생성에 관한 연구

주이신 · 이경림\*  
이화여자대학교 약학대학

**Generation of ROS by IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor in RBL-2H3 Cells. Choo, Yee Shin and Kyunglim Lee\***. College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea - Histamine-releasing factors (HRFs) are soluble mediators that can release histamine and other mediators from basophils and mast cells and their activity can vary, depending on the type of IgE. The activity of HRFs is affected by the presence of IgE, although HRF is thought to bind to a specific receptor other than IgE. Until now, HRF signaling pathway including its receptor remains unclear in spite of numerous studies. Since there had been many reports about reactive oxygen species (ROS) as a signaling molecule rather than as a by-product of metabolism, we investigated the possibility of ROS as an intracellular messenger involved in HRF-mediated histamine degranulation. In RBL-2H3 cells, ROS was generated by HRF using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive fluorescence of fluorescent 2', 7'-dichlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCFDA). These effects were blocked by anti-oxidant N-acetylcysteine (NAC). These results suggest that ROS generation could play a role as an intracellular messenger in histamine release by HRF.

**Key words:** Histamine-releasing factors, reactive oxygen species, N-acetylcysteine, histamine

IgE-dependent histamine-releasing factor(HRF)는 translationally controlled tumor protein이라고도 불리는 house keeping gene이다[4, 5]. 1995년 MacDonald *et al.*은 아토피 환자의 림프세포와 알레르기 환자의 체액에서 HRF를 분리, 정제하고 이 HRF가 이미 성장관련 단백질인 translationally controlled tumor protein과 동일한 단백질이라는 것을 밝혔다[14]. 일반적으로 알려진 HRF의 기능은 히스타민 유리기능인데, IgE에 상관없이 HRF가 basophil에서 histamine, IL-4, IL-13의 분비를 조절하는 것이 관찰되어[21] HRF가 IgE가 아닌 특이적 receptor에 결합하여 기능한다는 가능성이 제시되고 있다[2, 12, 13, 20]. 또 HRF의 다른 기능으로 Ca<sup>2+</sup>결합 단백질로서의 기능[11, 19], 세포성장과 관련한 tubulin 결합단백질로서의 기능[6], 말라리아 치료제인 artemisinin의 target으로서의 기능[3], metal homeostasis[23]와 세포내 신호전달 관여 물질[17]로의 기능 등이 알려져 있다.

본 실험실에서는 yeast two-hybrid assay를 통해 HRF가 Na,K-ATPase의 cytosolic domain 중 3번째 loop과 결합함을 동정하였고[10], RBL-2H3 cell에 Na,K-ATPase 저해제로 알려져 있는 ouabain을 처리했을 때 histamine 분비가 증가되었다는 사실로 미루어[7] Na,K-ATPase가 HRF의 세포내 수용체이라고 생각하였다. Na,K-ATPase에 저해제인

ouabain을 처리하면, 활성화된 Src에 의해 epithelial growth factor receptor(EGFR)가 활성화되고[8, 9] 그 결과 reactive oxygen species(ROS) 생성과 함께 Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase(MAPK) 경로를 통해 p42/44 MAPK(Erk1/2)가 활성화된다[16, 24, 25]. 이 현상은 세포밖에 존재하는 Ca<sup>2+</sup>에 의존적으로 나타나는데, HRF 또한 Ca<sup>2+</sup> 결합단백질로 알려져 있으므로 ouabain과 비슷한 신호전달 경로를 거칠 것으로 예상하였다[11].

RBL-2H3에서 항원에 의한 자극시 ROS를 생성한다고 보고되었고[15], ROS가 epidermal growth factor 등의 intracellular messenger로 대두되는 보고를 생각해 볼 때[1] HRF에 의한 신호전달에 ROS가 관여할 가능성이 있다고 생각되었다. 이에 본 연구에서는 RBL-2H3 cell line에서 HRF에 의해 histamine이 분비되는 과정에서 ROS가 생성되는지 확인하고자 하였다.

pRSET/HRF cDNA를 BL21( $\lambda$ DE3)pLysS에 transformation시켜 LB/ampicillin(50 µg/mL)/chloramphenicol(34 µg/mL) 배지를 배양액으로 하여 진탕 배양한 후, IPTG (isopropylthiogalactoside)를 첨가한 후 배양하여 재조합 단백질의 합성을 유도하였다. 15% SDS-PAGE gel에 IPTG를 첨가하기 전과 첨가한지 2-3시간 지난 배양액 400 µL 각각을 pellet으로 하여 loading함으로써 coomassie blue staining으로 재조합 단백질의 유도를 확인하였다.

재조합 단백질이 들어있는 cell pellet을 sonication을 이용하여 깨 상등액을 pore size 1.2 µm syringe filter를 통과시키면서 His · Bind Resin이 담긴 column에 loading하

\*Corresponding author  
Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851  
E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

여 His-tagged HRF를 결합시켰다. Ni<sup>2+</sup>과 결합한 His-tagged HRF 단백질을 용출시켜 수거하고, 용액에 첨가되어 있는 imidazole 등의 salt를 제거하면서 농축하기 위해 10-20 L의 PBS (phosphate buffered saline)에 dialysis (tubing membrane-molecular weight cut-off 6,000-8,000) 한 후 speed vac.를 사용하거나, centrifugal filter인 vivaspin (molecular weight cut-off 5,000)을 사용하였다. 상기에서 정제, 농축된 단백질 중의 endotoxin을 제거하기 위하여 polymyxin B-agarose column에 다시 통과시켜 농축을 시행하였다. 이렇게 얻어진 HRF 단백질은 anti-HRF antibody를 이용한 western blotting을 통하여 동정한 후 차후 실험에 사용되었다.

Rat basophilic leukemia cell로부터 유래된 RBL-2H3 cell을 15% FBS, 100 units/mL penicillin-streptomycin을 첨가한 MEM 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 100 mm tissue culture dish에서 배양하면서 70-80% confluency에 도달하면 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> cells/mL 비율로 분주하였다. Confocal microscope로 관찰할 때에는 100 mm culture dish에 18 mm Ø glass coverslip을 10-12개 정도 두고 RBL-2H3세포들을 분주한 후 80% confluency에 도달하면 실험하였다.

RBL-2H3 cell을 80-90% confluent할 때까지 배양한 다음 trypsin-EDTA을 이용하여 adhesion cell을 떼낸 다음 MEM 완전배지에 희석하여 24 well plate 또는 48 well plate에 2×10<sup>5</sup> cells/well의 비율로 분주하고 12-24시간 배양하였다. 80-90% confluency에 도달하면 PBS로 충분히 세척한 후 serum-free MEM media 또는 serum-free MEM media에 희석한 IgE(0.2-0.4 µg/mL)를 45분간 처리하였다. 이후 dye가 cell에 도입되는 단계부터는 dye의 특성상 autofluorescence를 방지하기 위해 차광하였다. 24 well에서는 용액의 총 부피가 400 µL, 48 well에서는 200 µL가 되게 하였다.

Kinetic method(real-time method)로 측정할 때는 media를 Krebs-Ringer solution(KRH; 125 mM NaCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 6 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES adjust to pH 7.4)으로 세척하고, KRH 용액에 희석한 H<sub>2</sub>DCFDA 10 µM을 10분간 처리한 후 다시 KRH로 세척하고 HRF(20-40 µg/mL) KRH 용액을 loading하여 microplate reader(FL600)에서 15분간 형광도를 측정하였다.

End-point method (time-course method)로 측정할 때는 media를 KRH 용액으로 세척하고, KRH용액에 희석한 H<sub>2</sub>DCFDA 10 µM을 10분간 처리하는 동시에 정해진 시간에 HRF (20-40 µg/mL)를 co-incubation시켰다. Dye가 cell에 도입되고 나면 dye와 protein이 들어있는 용액을 없애고 KRH로 완전히 세척한 후 microplate reader(FL600)에서 각 well별로 scanning하였다.

Inhibitor를 처리할 때는 serum-free MEM 배지를 KRH 용액으로 세척한 다음 단계에 KRH에 녹아있는 상태로 20분간 처리하고, 이 용액에 HRF(10-40 µg/mL)와 H<sub>2</sub>DCFDA가 상기된 바와 같이 처리되었다. 따라서 inhibitor는 대부분 30분간 pre-incubation되도록 하였다. 위의 세포들을 KRH로 다시 2번 세척하여, 세포 안으로 들어가지 못하고 측정에 방해되는 H<sub>2</sub>DCFDA를 제거한 후 FL600으로 측정하였다. 각 실험에는 H<sub>2</sub>DCFDA 자체의 활성을 시험하기 위한 negative control과 FL600의 측정치를 보정해줄 blank가 포함되게 하였다. 각 측정은 KC4(kineticcalc for windows, version 2.7) 분석 프로그램을 이용하여 분석, 계산되었다.

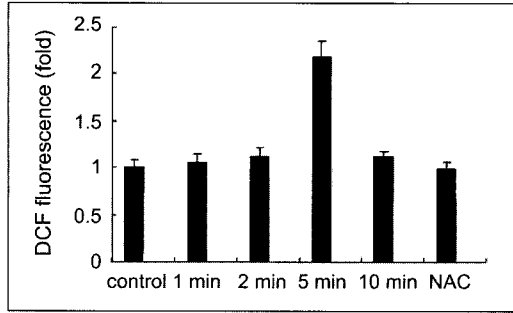
RBL-2H3 세포내의 ROS 측정은 H<sub>2</sub>DCFDA를 사용하는 기존의 방법 (time-course method)으로 측정되었다[18]. Coverslip에 자란 RBL-2H3는 12 well plate로 옮겨져서 MEM 배지에서 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 45분-1시간 동안 배양되었다. 이후 KRH 용액에 2번 세척하고 5 µM H<sub>2</sub>DCFDA가 포함된 KRH 용액을 5분간 처리하였다.

KRH 용액에 2번 세척한 염색된 세포들은 perfusion chamber에 옮겨져서 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss LSM 410)로 측정되고 매초 488/515(excitation/emission) 파장으로 스캔되었다. HRF(10-40 µg/mL)는 다양한 시간으로 처리되었으며, NAC은 IgE를 처리할 때 30 mM 농도로 30-45분간 co-incubation되었다. 상대적인 DCF 형광강도는 Carl Zeiss vision system(KS400, version 3.0)을 이용하여 분석, 계산되었다.

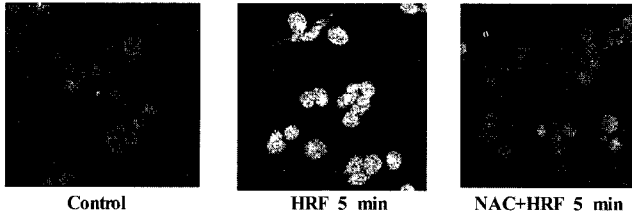
Kinetic method (real-time method)로 측정할 때는 H<sub>2</sub>DCFDA 10 µM을 10분간 처리한 후 세척하고 HRF (20-40 µg/mL) KRH 용액을 loading하여 microplate reader (FL600)에서 15분간 형광도를 측정하였다. 그 결과, RBL-2H3에서만 HRF에 의한 ROS가 생성되며 항산화제인 NAC에 의해 basal level로 낮아진다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 또한 time course로 분석했을 때 HRF에 의한 ROS는 5분대에 최대치를 보이면서 일시적으로 생성되었다가 소멸되었다.

RBL-2H3 세포내의 ROS 측정은 H<sub>2</sub>DCFDA를 사용하는 기존의 방법으로 측정되었다[22]. RBL-2H3는 IgE를 처리한 후 5 µM H<sub>2</sub>DCFDA를 5분간 처리하였다. KRH로 세척한 cell들은 Carl Zeiss LSM 410으로 측정되어 매초 488/515(excitation/emission) 파장으로 스캔되었다. HRF (10-40 µg/mL)는 다양한 시간(1분, 2분, 5분, 10분)으로 처리되었으며, NAC은 IgE를 처리할 때 30-45분간 co-incubation되었다. 상대적인 DCF 형광강도는 Carl Zeiss vision system(KS400, version 3.0)을 이용하여 분석되었다 (Fig. 2). ROS가 5분대에서 최대치를 보이며 일시적으로 생성되고 이는 NAC에 의해서 소멸된다는 결과는 같았고, image로서 더욱 강하게 뒷받침할 수 있었다.

재조합 단백질의 합성 유도 과정에서 endotoxin이 과량



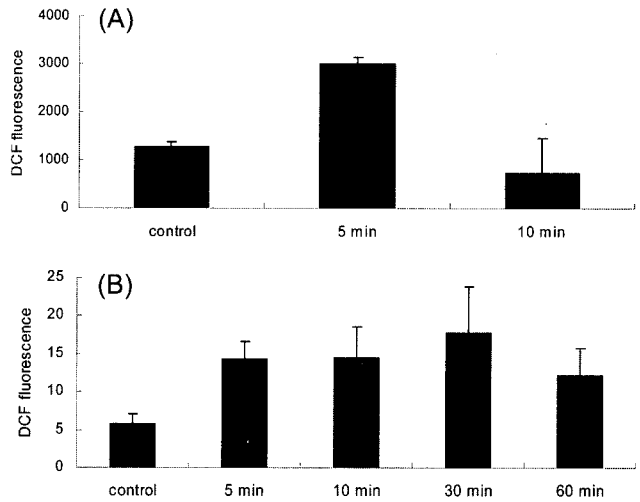
**Fig. 1. Effect of HRF on the generation of intracellular ROS in RBL-2H3 cells.** RBL-2H3 cells were incubated in serum-free media for 45 min. The cells were then rinsed with Krebs-Ringer solution (KRH) and incubated with KRH containing 5 μM H<sub>2</sub>DCFHDA for 5 min. The cells were rinsed with KRH again, and HRF (20-40 μg/mL) was added. ROS was measured with microplate reader (FL600) using kinetic reading and analyzed using KC4 system. Data shown are mean±S.E. This experiments were performed in triplicate.



**Fig. 2. Effect of HRF on the generation of intracellular ROS in RBL-2H3 cells (observed with confocal microscopy).** DCF fluorescence was measured with a Confocal microscope after stimulation of cells with HRF (20-40 μg/mL) at various times. The fluorescence was shown using Carl Zeiss LSM 410.

함유될 수 있다는 발표가 있어 endotoxin에 대한 실험도 병행하였다. Microplate reader에 의한 측정 방법은 같으며, 정확한 실험을 위해 24well에서의 end-point method를 채택하였다(Fig. 3). Endotoxin이 함유된 protein은 polymyxin column을 거치지 않은 crude pRSET/rat HRF를, endotoxin이 제거된 protein은 MBP-HRF를 사용하였다. pRSET/rat HRF는 본 실험실에서 합성되었고, MBP-HRF는 한국생명공학연구원에서 LAL assay를 거친 MBP-HRF를 제공하였다. 실험 결과, endotoxin이 함유된 HRF에서는 ROS가 생성되지 않거나, 생성되더라도 60분이 지나도 소멸되지 않는 전형적인 oxidative stress의 양상을 보였다. 반대로 endotoxin이 제거된 HRF는 ROS가 일시적으로 생성, 소멸되는 intracellular messenger의 양상을 보였다.

본 논문에서는 HRF에 의해서 histamine이 분비되는 과정에서 intracellular messenger로서 reactive oxygen species (ROS)가 관여할 수 있다는 가정을 가지고 HRF에 의한 ROS 생성에 대해 초점을 맞추었다. 본 실험실에서는 HRF를 RBL-2H3에 처리한 후 세포내에 상승된 mRNA를 찾아본 결과, microsomal glutathione S-transferase가 강한 반응을



**Fig. 3. Effect of endotoxin (LPS) on ROS generation.** (A) Endotoxin-free HRF was added to RBL-2H3 cells and after incubation with 10 μM H<sub>2</sub>DCFHDA for 10 min the cells scanned using microplate reader. (B) HRF containing endotoxin was added to RBL-2H3 cells and after incubation with 5 μM H<sub>2</sub>DCFHDA for 5 min the cells scanned using a confocal microscope. Data shown are mean±S.E. of the values obtained from five groups of 20-30 cells.

보이는 group에 속해 있었다. Glutathione S-transferase는 ROS에 의해 간접적으로 변형이 일어나는 cysteine-rich redox-sensitive protein이고, ROS에 의해 야기될 수 있는 유해한 환경으로부터 세포를 보호하는 동시에 eicosanoid 합성에 관여한다[22]는 점에서 HRF의 intracellular signal에 ROS가 관여할 가능성을 두고 실험을 하였다. 한편 RBL-2H3는 IgE의 receptor인 FcεRI receptor를 가지고 있어 감각(sensitization)되기 용이하고, histamine을 방출할 수 있는 adhesion type의 cell line이라 histamine 분비에 관여하는 signaling을 조사하는 데 있어 독보적으로 사용되었다.

이론상 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하는 대표적 dye인 DCF의 경우, 그것의 esterified form인 DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate)가 세포막을 통과해서 세포내 esterase에 의해 deacetylation되면서 형광을 띠지않는 DCFH가 되면서 cell 내에 trap되고 이것이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 만나면서 DCF 형광을 띠게 되는 원리를 가지고 있으나, 실제로 그 specificity가 낮고 특정 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정한다기보다 세포내 전체의 산화환원상태의 변화를 측정한다고 보는 의견이 많다. 따라서 ROS를 측정하고 분석하는데는 불안정한 dye를 보정하는 control과 오직 intracellular signal에만 반응하여 dye가 변화할 수 있도록 최상의 세포 여건이 필요하였다.

처음 ROS의 측정은 microplate reader에서 실시하였다. DCF dye로 real-time 측정이 되는 경우는 극히 드물지만, HRF를 가한지 5분만에 transient하게 생성되었다가 소멸하며, 항산화제인 NAC에 의해서는 억제되는 ROS의 양상을 볼 수 있었다. 일단 HRF에 의해 히스타민 분비가 야기되

는 15분 내에 ROS가 생성되고, growth factor로 인해 생성되는 intracellular messenger로서의 ROS도 5분대에 생성되므로, 그 생성여부를 confocal microscope으로 이미지화 하였다. Microplate reader에서는 DCF dye를 10  $\mu$ M 10분, confocal microscope에서는 5  $\mu$ M 5분간 처리했는데, 측정 시스템에 따라 방법은 달라질 수 있고, DCF dye가 있거나 없는 negative control을 항상 check하였기 때문에 data 자체에 문제는 없었다.

## 요 약

RBL-2H3 cell에서 HRF에 의하여 histamine이 분비되는 과정에서 ROS가 생성되는지 실험해 본 결과, ROS가 HRF를 처리한지 5분대에 최대치를 보이며 생성되었다가 소멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 HRF가 세포내 second messenger로서의 ROS를 생성하였다고 확인할 수 있었다. 또한 ROS는 단백질 정제 과정에서의 endotoxin 오염에 의해 영향을 받지만, 본 실험에서 규명한 HRF에 의한 ROS 생성은 endotoxin에 의한 것이 아닌, 순수하게 HRF에 의한 signaling의 결과라는 것도 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

## 참고문헌

- Bac, Y. S., S. W. Kang, M. S. Seo, I. C. Bains, E. Tekle, P. B. Chock, and S. G. Rhee. 1996. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**: 217-225.
- Beaven, M. A. and R. A. Baumgartner. 1997. Downstream signals initiated in mast cells by Fc epsilon RI and other receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 766-772.
- Bhisutthibhan, J., X. Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame, and S. R. Meshnick. 1998. The *Plasmodium falciparum* translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.* **273**: 16192-16198.
- Bohm, H., B. Gross, M. Gaestel, U. A. Bommer, G. Ryffel, and H. Bielka. 1991. The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed Biochim Acta* **50**: 1193-1203.
- Chitpatima, S. T., S. Markrides, R. Bandyopadhyay, and G. Brawerman. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 2350.
- Gachet, Y., Tourner, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., and Bommer, U. A. 1999. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **112**(Pt 8): 1257-1271.
- Gentile, D. A. and D. P. Skoner. 1996. A role for the sodium, potassium adenosine triphosphatase ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase) enzyme in degranulation of rat basophilic leukaemia cells. *Clin. Exp. Allergy* **26**: 1449-1460.
- Haas, M., A. Askari, and Z. Xie. 2000. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 27832-27837.
- Haas, M., H. Wang, J. Tian, and Z. Xie. 2002. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **277**: 18694-18702.
- Jung, J., M. Kim, M. J. Kim, J. Kim, J. Moon, J. S. Lim, M. Kim, and K. Lee. 2004. Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the Third Cytoplasmic Domain of  $\text{Na}_2\text{K}$ -ATPase {alpha} Subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 49868-49875.
- Kim, M., Y. Jung, K. Lee, and C. Kim. 2000. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 633-636.
- MacDonald, S. M., L. M. Lichtenstein, D. Proud, M. Plaut, R. M. Naclerio, D. W. MacGlashan, and A. Kagey-Sobotka. 1987. Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: heterogeneity of IgE. *J. Immunol* **139**: 506-512.
- MacDonald, S. M. 1997. Human recombinant histamine-releasing factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**: 187-189.
- MacDonald, S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
- Matsui, T., Y. Suzuki, K. Yamashita, T. Yoshimaru, M. Suzuki-Karasaki, S. Hayakawa, M. Yamaki, and K. Shimizu. 2000. Diphenylethylidonium prevents reactive oxygen species generation, tyrosine phosphorylation, and histamine release in RBL-2H3 mast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**: 742-747.
- Mohammadi, K., P. Kometiani, Z. Xie, and A. Askari. 2001. Role of protein kinase C in the signal pathways that link  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase to ERK1/2. *J. Biol. Chem.* **276**: 42050-42056.
- Nielsen, H. V., A. H. Johnsen, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, and P. O. Schiotz. 1998. Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor. *Allergy* **53**: 642-652.
- Ohba, M., M. Shibanuma, T. Kuroki, and K. Nose. 1994. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells. *J. Cell. Biol.* **126**: 1079-1086.
- Sanchez, J. C., D. Schaller, F. Ravier, O. Golaz, S. Jaccoud, M. Belet, M. R. Wilkins, R. James, J. Deshusses, and D.

- Hochstrasser. 1997. Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
20. Sampson, H. A., K. R. Broadbent, and J. Bernhisel-Broadbent. 1989. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N. Engl. J. Med.* **321**: 228-232.
21. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1996. An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J Exp Med* **183**: 1265-1270.
22. Spiteri, M. A., A. Bianco, R. C. Strange, and A. A. Fryer. 2000. Polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTP 1 locus: a novel mechanism for susceptibility and development of atopic airway inflammation. *Allergy* **55**: 15-21.
23. Sturzenbaum, S. R., P. Kille, and A. J. Morgan. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (HRF) in the earthworm *Lumbricus rubellus*1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1398**: 294-304.
24. Xie, Z. and A. Askari. 2002. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* **269**: 2434-2439.
25. Xie, Z. and T. Cai. 2003. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* **3**: 157-168.

(Received Aug. 5, 2005/Accepted Sep. 7, 2005)