

사람 Neuroblastoma SH-SY5Y 세포주에서 Opiate 내성에 의한 *c-myc* 유전자 표현

김수경 · 박창교 · 권지윤 · 서성일¹

계명대학교 의과대학 약리학교실, ¹미생물학교실 및 의과학연구소

The *c-myc* Expression on the Opioid Tolerance in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells.

Soo-kyung Kim, Chang-kyo Park, Gee-youn Kwon, and Sung-il Suh¹ Department of Pharmacology, ¹Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, and Institute for Medical Science, Taegu 700-712, Korea

The mechanisms underlying opiate tolerance and dependence are not fully understood. We used human neuroblastoma SH-SY5Y cells as a model system for studying effects of morphine tolerance and withdrawal on *c-myc* induction and cAMP levels. It has been reported that regulation of *c-fos* by acute and chronic morphine withdrawal is mediated through alterations in CREB transcription factor.

In this study, we examined the effects of morphine tolerance on *c-myc* expression and cAMP concentrations. The activation of opiate receptors by an acute morphine administration resulted in an increase in *c-myc* mRNA and a decrease in cAMP concentrations in a dose-dependent manner (5, 10, 15, and 20 μ M). On the other hand, the chronic treatment of morphine (10 μ M for six days) did not induce the elevated expression of *c-myc* mRNA. The *c-myc* expression was slightly inhibited in comparison with that of the acute morphine response. However, cAMP concentrations were increased with regard to morphine withdrawal response.

These results suggest that the alterations in *c-myc* expression might imply a significant opiate regulation relating to morphine tolerance. This observation differs from increased expression of *c-fos* via regulation of cAMP pathway.

Key Words: Human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *c-myc*, cAMP

서 론

Opioid 내성 발생에 대한 분자생물학적 연구가 많이 이루어지고 있으나 아직 그 기전은 명확하지 않다. Opioid 수용체는 크게 μ , δ , κ 의 3 종류로 나누어지는데 (Loh & Smith, 1990) 이 수용체들의 분포가 부위별로 구분되어 있지 않고, opioid의 약리작용은 3가지 수용체에 의한 복합적인 작용이기 때문에 특정 opioid 수용체의 연구를 위해서 단일세포주들이 흔히 이용되고 있다. 즉 δ 수용체 연구에는 NG 108-15 C neuroblastoma X glioma hybrid 세포주가 주로 이용되고, μ 수용체 연구에는 mouse 7315 C tumor 세포주가 이용되고 있다. 그러나 morphine 내성의 발생에 관여하는 수용체는 단일 수용체의 작용이

아니기 때문에 본 연구에서는 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주를 이용하였다. 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주의 μ 와 δ 수용체는 분화 상태에 따라 μ 와 δ 수용체의 비율이 달라지는 특성을 나타낸다. 미분화 상태의 세포에서는 μ 와 δ 수용체의 비율이 2:1이고 (Kazmi & Mishra, 1987) 분화된 세포에서는 5:1로서, 분화가 되면 μ 수용체의 비율이 높아지는 것으로 알려져 있으며 (Yu et al, 1990) κ 수용체도 존재한다고 한다 (Cheng et al, 1995).

1970년대에 endogenous opiate 수용체가 발견된 이후로 opiate 내성 발생의 기전은 opiate 수용체의 숫자의 변화 또는 친화성의 변화에 기인된다는 보고가 있어 왔으며 최근에는 opiate를 비롯한 항정신성 약물 중독 기전에 대하여 수용체 자체의 문제보다는 수용체 결합 이후의 세포 내의 경로에 주로 관심이 모아지고 있다. 그리하여 장기간 morphine 등의 opioid 효현제에 노출이 되면 cAMP 함량이 감소되며, opioid 길항제를 투여하거나

책임저자 : 김수경, ☎ 700-712 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 약리학교실

morphine이 갑자기 제거되면 cAMP가 오히려 증가하는 현상과(Sharma et al, 1975; Yu et al, 1990; Carter & Medzihradsky, 1992; Zadina et al, 1993) opioid 수용체의 down-regulation 및 opioid 수용체의 결합력의 감소 등이 나타난다는 보고가 있다(Tao et al, 1987; Prather et al, 1994). 또한 Opioid에 의하여 GTPase의 desensitization이 일어나므로 G protein과 수용체의 결합이 이루어지지 않기 때문이며, 이는 뇌조직(Tao et al, 1987)에서 뿐만 아니라 세포 배양상(Prather et al, 1994)에서도 관찰되었다. 한편, 신경세포가 hormone, 여러 가지의 신경 전달 물질, 세포막에 대한 전기적인 자극, 각 중 신경 성장 인자들에 의하여 자극을 받으면 이 자극들은 하나의 정보가 되어서 세포에서 세포로 전달되므로써 신경계의 가소성, long term potentiation, 간질, 약물 반응 등의 여러 가지 기능을 나타내게 됨은 알려진 사실이다. 또한 세포막 수용체에 가해진 어떤 정보가 세포 내에서 어떤 유전적인 물질로 전환되는 과정에서 자극의 초기 수 분 이내에 발현되는 즉각조기유전자(immediate early genes: IEGs)들은 신경세포의 시냅스를 통한 초기의 반응을 알아보는데 매우 유용한 기준이 되며 뇌 기능 연구의 중요한 부분이 된다(Sagar et al, 1988).

이 연구에서는 morphine 내성 발생 시에 opioid 수용체의 신호전달계에 의하여 일어나는 *c-myc* 유전자 표현의 변화를 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주에서 조사해 보고자 하였다. 그 결과, opioid 내성 발생시 나타난 cAMP 함량 변동과 *c-myc* mRNA 표현은 서로 상반 관계에 있는 것으로 나타났으며, 이러한 결과로서 cAMP 증감과 *c-myc* mRNA 표현의 관계를 직접 연관지어 말할 수는 없으나 morphine 내성 발생시, 이제까지 보고된 *c-fos*와는 다른 *c-myc* mRNA의 억제적 표현양상은 의미 있는 세포 내 현상이므로 보고하는 바이다.

방 법

세포 배양

사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주를 실험에 사용하였으며 배양액은 10% fetal bovine serum(Gibco BRL), 100 units/ml penicillin(Sigma), 100 µg/ml streptomycin(Sigma) 이 함유된 RPMI 1640을 사용하였다. 배양 환경으로는 5% CO₂와 95% O₂, 37°C 및 항습이 유지되도록 하면서 retinoic acid(10 µM)로 1 주일 동안 분화시켰다. 세포생존률은 trypan blue dye exclusion 방법으로 산정 하여 생존 세포수가 5 × 10⁵ 이 되도록 증식시킨 후 실험에 이용하였다.

실험군

100 mm petri dish당 retinoic acid(Sigma) 10 µM로 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포의 분화를 유도하는 동안 10 µM 농도의 morphine(제일 제약회사)에 하루에 12시간씩 노출시키므로써 1일, 4일 및 6일간의 morphine 내성군을 유도하였다. 단기투여군은 약물 투여 후 10, 20, 40 및 60 분으로 하여 장기투여군과 비교하였다. 일정 시간 약물이 처치된 후 morphine 이 들어 있는 배양액을 제거하기 위하여 D-PBS로 3번 씻어 내고 total RNA를 추출하였다.

RNA 분리

다소 수정된 Chomczynski & Sacchi(1987)의 방법으로 total RNA를 분리하였다. 배양된 세포를 D-PBS로 3번 씻어 낸 후 100 mm petri dish당 RNAzol™B(Biotecx Laboratories) 1 ml를 넣었다. 세포용해액 1 ml 당 0.1 ml의 chloroform을 넣고 15초간 잘 혼합하고 4°C에 5분간 두었다가, 4°C에서 12,000 rpm으로 15 분간 원심한 후 상층액을 취하여 차가운 isopropanol을 넣고 -70°C에 4시간 이상 방치하였다. 다시 12,000 rpm으로 15 분간 원심하여 얻은 RNA pellet을 75%의 차가운 ethanol로 세척하고 Speed Vac(Savant Instrument, U.S.A.)을 이용하여 건조시켰다. Diethyl pyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수를 넣어 pellet을 녹인 후 spectrophotometer로 농도 및 순도를 측정하였으며 -20°C에 보관하여 사용하였다.

Northern blot hybridization

분리된 20 µg의 RNA에 formamide, formaldehyde 및 10X MOPS를 첨가하고 65°C에서 10분간 가온한 후 얼음에 두었다. Formaldehyde와 10X MOPS가 들어 있는 0.9% agarose gel을 이용하여 전기영동한 다음 nylon membrane(Amersham)으로 전이시켰다. 5X SSPE, 5X Denhardt's solution, 0.5%(w/v) SDS 및 5% salmon sperm DNA를 함유한 용액으로 65°C에서 최소 1시간 prehybridization하고 100°C에서 5분간 가열하여 denature시킨 labelled probe를 첨가하여 65°C에서 최소 12시간 이상 hybridization 하였다. Labelled probe는 [α -³²P] dCTP(Amersham)로 nick translation 시켜서 준비하였다. -70°C에서 membrane을 X-ray film에 3일간 노출시킨 후 현상하였다. mRNA 정량은 Gel documentation system(Bio-Rad, Molecular Analyst Gel Doc 1000)을 이용하여 분석하였다.

cAMP 측정

cyclic AMP 함량은 cyclic AMP [¹²⁵I]RIA-kit(Dupont Co.)를 사용하여 측정하였다.

Protein 측정

세포의 단백질 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법에 의해서 bovine serum albumin을 표준액으로 사용하여 측정하였다.

통계의 분석

각 실험군간의 통계 처리는 student t-test를 이용하여 p값이 0.05이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

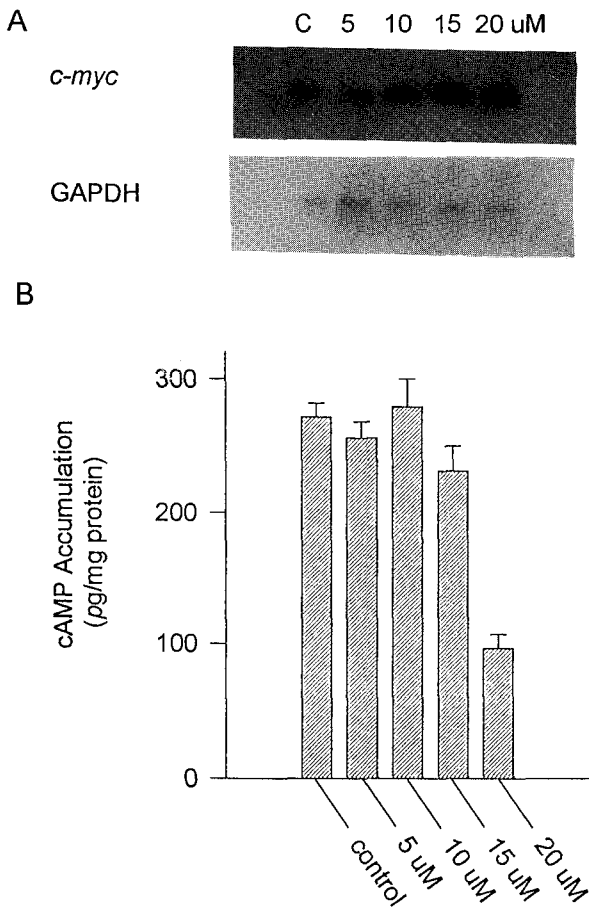


Fig. 1. *c-myc* mRNA expression and cAMP concentrations in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. A, Induction of *c-myc* mRNA upon acute morphine administration. Shown is a representative Northern blot analysis of total RNA from control solvent or morphine-treated(5, 10, 15, & 20 μM for 10 min) SH-SY5Y cells. Blots were hybridized with a probe to *c-myc*. The GAPDH levels are shown to control for differences in sample loading. B, Effect of acute morphine administration on cAMP concentration. Cells were incubated with morphine at various concentration, as indicated, for assay of intracellular cAMP concentration. cAMP data are from analogous incubations corresponding to those for *c-myc* mRNA analysis, and represent the mean ± standard deviation of replicate culture dishes.

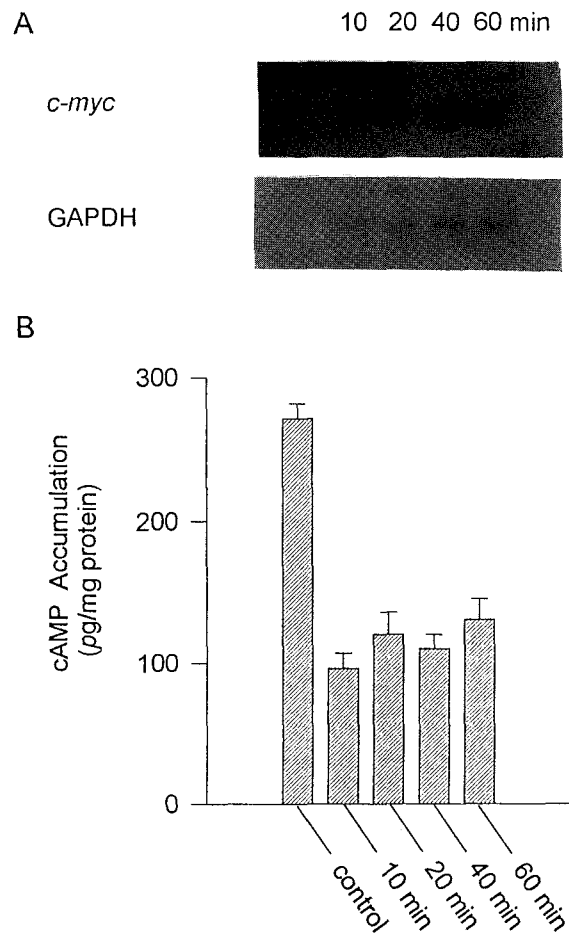


Fig. 2. *c-myc* mRNA expression and cAMP concentrations in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. A, Time course of the expression of *c-myc* mRNA. Cells treated with control solvent or with 20 μM of morphine for the indicated times were analyzed for the expression of *c-myc*. The levels of GAPDH are shown to control for differences in sample loading. B, Time course of cAMP concentration. Cells were incubated with 20 μM of morphine at various time periods, as indicated, for assay of intracellular cAMP concentration. cAMP data are from analogous incubations corresponding to those for *c-myc* mRNA analysis, and represent the mean ± standard deviation of replicate culture dishes.

결 과

Opiate 내성에 따른 cAMP 함량의 변화

Morphine을 5, 10, 15 및 20 μM 을 투여한 10분 후에 측정된 cAMP의 함량은 15 μM 과 20 μM 의 농도에서 감소되는 경향을 보였으며(Fig. 1), 20 μM 의 morphine을 투여한 10, 20, 40 및 60분 후의 cAMP의 함량은 모두 감소되었다(Fig. 2). Morphine 10 μM 을 1, 4 및 6일 동안 장기 투여하다가 차가운 D-PBS로 씻어서 morphine을 제거하거나 naloxone 10 μM 을 투여하므로써 morphine을 제거한 6일 후의 cAMP 함량은 211.5 ± 17.3 pg/mg protein으로써, 1일 (143.6 ± 18.7 pg/mg protein)과 4일(197.0 ± 25.2 pg/mg protein)에 비하여 증가되는 경향을 보여 대조치(235.9 ± 20.0 pg/mg protein)와 거의 비슷한 수준으로 증가됨을 보였다(Fig. 3).

Opiate 내성에 따른 *c-myc* 유전자 표현의 변화

Morphine을 5, 10, 15 및 20 μM 투여한 10분 후에 측정된 *c-myc* 유전자 표현 정도는 농도에 따라 증가되었다(Fig. 1). 20 μM morphine을 투여한 10, 20, 40 및 60분 후의 *c-myc* 유전자 표현은 증가되었으나 시간에 따른 그 차이는 뚜렷하지 않았다(Fig. 2). Morphine 10 μM 을 1, 4 및 6일 동안 장기 투여하다가 차가운 D-PBS로 씻어서 morphine을 제거하거나 naloxone 10 μM 을 투여하므로써 morphine을 제거한 6일 후의 *c-myc* 유전자 표현은 다소 감소되는 경향을 보였다(Fig. 3).

고 찰

Opioid 수용체에 관한 연구에 본 실험에 사용한 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주를 많이 이용하고 있으며, morphine에 대한 내성은 morphine(10 μM)을 6~7일간 투여하면 일어난다고 한다(Yu et al, 1990; Carter & Medzihradsky, 1992).

이 연구에서도 μ 와 δ opioid 수용체가 존재하는 사람 neuroblastoma SH-SY5Y 세포주를 이용하여 morphine을 1일, 4일 및 6일 동안 투여하므로써 morphine 의존을 일으킨 후에 *c-myc* 유전자 표현의 증가 또는 감소가 opioid 내성 발생과 연관이 있는지를 알아보려고 하였다. Morphine 내성에 대한 분자생물학적 기전은 아직 확실하지는 않지만 G protein에 의한 adenylyl cyclase 활성을 억제시킨다고 한다. Adenylyl cyclase 활성은 opioid 효현제에 의하여 억제되며 장기간 투여하면 adenylyl cyclase 억제에 대한 desensitization이 일어나서 갑자기 약물이 중단되

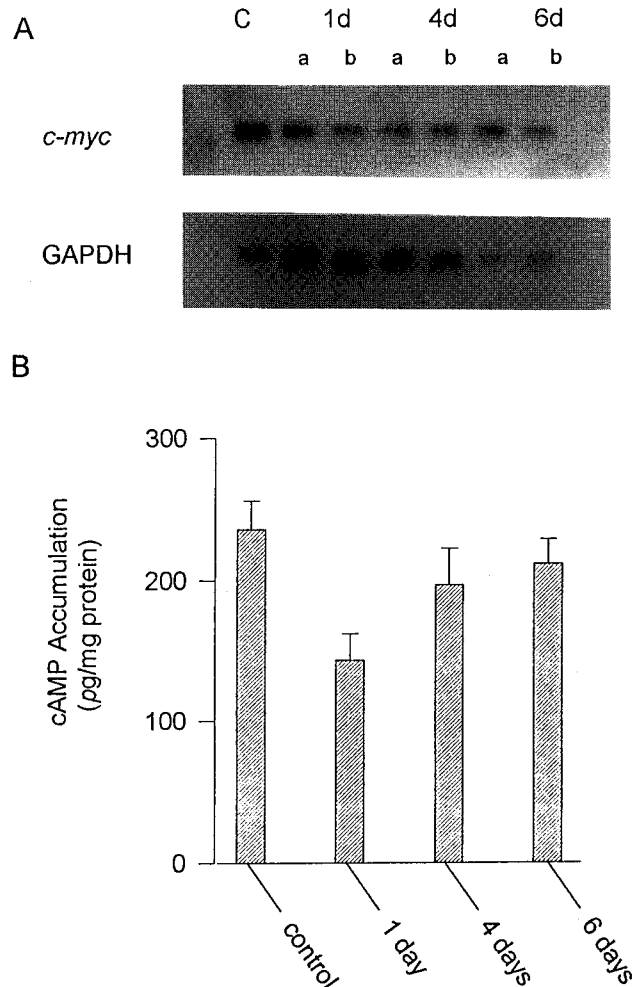


Fig. 3. *c-myc* mRNA expression and cAMP concentrations in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. A, Effect of chronic morphine administration on *c-myc* mRNA expression. Cells were treated with control solvent or 10 μM of morphine for the indicated durations, after which total RNA was isolated and analyzed for *c-myc* mRNA expression. C: control, a: Cells were washed thoroughly with D-PBS to terminate the morphine administration. b: Cells were treated with 10 μM of naloxone to terminate the morphine administration. B, Effect of chronic morphine administration on cAMP concentration. Cells were treated with 10 μM of morphine at various durations, as indicated, for assay of intracellular cAMP concentration. cAMP data are from analogous incubations corresponding to those for *c-myc* mRNA analysis, and represent the mean \pm standard deviation of replicate culture dishes.

면 그 함량이 증가되며 opioid 수용체의 결합력은 감소된다고 한다(Sharma et al, 1975; Traber et al, 1975; Thomas & Hoffman, 1987; Tao et al, 1987; Yu et al, 1990; Carter

& Medzihradsky, 1992; Zadina et al, 1993; Prather et al, 1994). 따라서 opioid 효현제를 계속 투여하다가 갑자기 약물을 끊으면 cAMP 함량의 증가가 급속히 일어나는데 이러한 작용을 opioid 내성 발생의 기전으로 보는 견해들이 있다. cAMP는 알려진 바와 같이 동시에 여러 가지 세포 내 생화학적 대사를 매개할 수 있는 대표적 제 2 전령체 중의 하나로써 여러 가지 세포 내 대사에 관여하여서 세포의 고유한 기능을 나타낸다. cAMP에 의한 protein kinase의 활성화, cAMP response element binding protein(CREB)과 같은 transcription factor들의 활성화 및 *c-fos*, *c-jun*, *zif268*, *c-myc* 등의 IEGs들의 표현에 관계한다(Roesler et al, 1988; Berkowitz et al, 1989; Andrisani & Dixon, 1990; Hartig et al, 1991). IEGs의 활성화는 세포에 가해지는 외부의 자극에 의해서 일어나는 현상으로 신경 세포에만 국한된 현상은 아니며, 이미 opioid 내성 발생에 대한 많은 연구들도 opioid 수용체와 관련된 신호전달계 및 CREB, *c-fos* 표현계의 조사를 통해서 이루어져 있다. *c-fos*는 새로운 단백질의 생성과 직접적인 관련보다는 세포의 어떤 자극에 대한 즉각적이고, 일시적으로 발현되는 IEGs 중의 하나로 알려져 있으며 cAMP에 의한 CREB의 phosphorylation과 함께 opioid계 약물 금단 시에 증가된다고 하며(Chang et al, 1988), 이러한 결과는 배양 세포와 동물의 뇌조직 특히 locus ceruleus에서 CREB의 증가(Aghajanian, 1978; Koob, 1992; Nestler, 1992; Guitart et al, 1992) 및 *c-fos*의 증가(Guitart & Nestler, 1993), nucleus accumbens와 amygdala에서 *c-fos*의 증가(Guitart & Nestler, 1993; Hayward et al, 1990)가 보고된 바 있다. 따라서 opioid 내성 발생과 *c-fos* mRNA의 증가는 cAMP 농도 및 CREB의 phosphorylation과 밀접한 관련이 있는 것으로 인정되지만, 본 연구에서 조사한 *c-myc* 유전자 표현 양상은 *c-fos*와는 달리 cAMP 함량 증가와 일치하지 않았다. *c-myc*도 *c-fos*처럼 세포가 외부 자극을 받은 초기에 발현되는 유전자 중의 하나이지만 *c-myc*의 기능에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

*c-myc*은 *c-fos*나 *c-jun*과는 다른 DNA binding domain (helix-loop-helix motif)을 갖고 있으며 AP-1 transcription factor에 작용하지 않는다. 또한 IEGs의 표현은 종류에 따라 즉각적이고 일시적으로 나타나며 세포에 가해진 자극의 종류에 따라라도 표현되는 정도, 시간 및 강약에 차이가 있음을 밝힌 보고들이 있다(Greenberg & Ziff, 1984; Moratalla et al, 1992; Rusak et al, 1992). 즉 성장 인자, Ca^{2+} , 세포막의 탈분극등의 상태에 따라 IEGs의 표현 양상이 다르다고 한다(Curran & Morgan, 1986; Bartel et al, 1989). 또한 세포 증식 과정에 *c-fos*는 비특이적으로 반응하는 반면, *c-myc*은 특이하게 반응하는 유전자로써 세포

증식 및 분화의 조절에 관여하며 암세포로 변형 또는 apoptosis시에 그의 표현이 증가된다고 한다(Cole, 1986; Luscher & Eisenman, 1990).

이 연구에서 관찰된 morphine 투여에 따른 cAMP 함량의 결과는 다른 연구자들의 보고와 비교하여 opioid 내성 발생시와 일치하였으나(Sharma et al, 1975), 이때 *c-myc* 유전자의 표현 양상은 cAMP 함량 변동과 상반되게 나타났다. Morphine을 투여한 후 10분에 조사한 *c-myc* 유전자 표현은 morphine 농도의 증가에 따라 증가되었으며, cAMP 함량은 감소되었다(Fig. 1). 1회의 morphine(20 μ M) 투여 후 10분에 측정된 cAMP 함량은 감소를 보였으며 20, 40 및 60분에는 별 변화를 볼 수 없었다(Fig. 2). 즉, *c-myc* 표현계의 시간에 따른 변화는 뚜렷하지 않았다(Fig. 2). Morphine을 1일, 4일 및 6일간 투여하였다가 중단하였을 때 이미 보고된(Sharma et al, 1975) 바와 같이 cAMP 함량의 증가를 볼 수 있었으나, *c-myc* 표현계는 투여 기간이 연장됨에 따라 오히려 다소 감소되는 현상을 나타내므로써 cAMP 함량 변동과 대조되었다(Fig. 3).

이러한 *c-myc* 유전자 발현의 양상은 많은 보고(Guitart & Nestler, 1993; Hayward et al, 1990)에서 나타난 *c-fos*의 결과와는 차이가 있다. 이 연구에서 관찰된 opioid 내성 발생과 관련되어 증가하는 cAMP 함량과 *c-fos* 표현의 증가와는 상반되는 *c-myc* 유전자 표현양상은 IEGs들의 고유한 성상의 차이라고 볼 수도 있다. 또한 myeloid 세포 분화시에 cAMP의 함량과 *c-myc* 표현계를 관찰한 최근의 보고에 의하면 cAMP는 *c-myc* 표현을 negative하게 조절한다는 보고가(Williamson et al, 1997) 있으므로, 관찰된 cAMP 함량의 증가와 *c-myc* 표현 억제의 상호 연관성을 시사하는 것으로 생각할 수도 있다. 시간상 *c-fos* 유전자는 *c-myc* 보다 그 발현이 선행되는 IEG으로 알려져 있으며(Greenberg & Ziff, 1984; Muller et al, 1984), 상기한 바와 같이 *c-myc*은 *c-fos*와는 다른 성상의 IEG으로, 이 연구에서 관찰된 결과는 opioid의 내성시에 나타나는 *c-myc*의 고유한 작용으로 보아진다.

결론적으로, opioid 내성 발생과 관련된 cAMP 함량 변동과 *c-myc* mRNA 표현은 서로 상반되게 나타났으며, *c-myc* mRNA의 변동과 cAMP 증감의 직접적인 관계를 말할 수는 없으나, *c-myc* mRNA의 변동은 morphine 내성 발생시에 나타나는 세포 내의 흥미로운 현상으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 동산의료원의 특수 과제 연구비에

의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Aghajanian GK. Tolerance of locus ceruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 267: 186–188, 1978
- Andrisani OM, Dixon JE. Somatostatin gene expression. *Ann Rev Physiol* 52: 793–806, 1990
- Bartel DP, Sheng M, Lau LF, Greenberg ME. Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of *fos* and *jun* induction. *Genes Dev* 2: 304–313, 1989
- Berkowitz LA, Riabowol KT, Gilman MZ. Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse *c-fos* promoter. *Mol Cell Biol* 9: 4272–4281, 1989
- Carter BD, Medzihradsky F. Receptor mechanisms of opioid tolerance in SH-SY5Y human neural cells. *Mol Pharmacol* 43: 465–473, 1992
- Chang SL, Squinto SP, Harlan RE. Morphine activation of *c-fos* expression in rat brain. *Biochem. Biophys Res Comm* 157: 698–704, 1988
- Cheng J, Standifer KM, Tublin PR, Su W, Pasternak GW. Demonstration of κ_3 -opioid receptors in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Neurochem* 65: 170–175, 1995
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159, 1987
- Cole MD. The *myc* oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu Rev Genet* 20: 361–384, 1986
- Curran T, Morgan JI. Barium modulates *c-fos* expression and post-translational modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8521–8524, 1986
- Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311: 433–438, 1984
- Guitart X, Nestler EJ. Second messenger and protein phosphorylation mechanisms underlying opiate addiction: studies in the rat locus ceruleus. *Neurochem Res* 18: 5–13, 1993
- Guitart X, Thompson MA, Mirante C, Greenberg ME, Nestler EJ. Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus ceruleus. *J Neurochem* 58: 1168–1171, 1992
- Hartig E, Loncarevic IF, Buscher M, Herrlich P, Rahmsdorf HF. A new cAMP response element in the transcribed region of the human *c-fos* gene. *Nucleic Acids Res* 19: 4153–4159, 1991
- Hayward MD, Duman RS, Nestler EJ. Induction of the *c-fos* proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res* 525: 256–266, 1990
- Kazmi SMI, Mishra RK. Comparative pharmacological properties and functional coupling of *mu* and *delta* opioid receptor sites in human neuroblastoma SHSY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 32: 109–118, 1987
- Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13: 177–184, 1992
- Loh HH, Smith AP. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 123–147, 1990
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951
- Luscher B, Eisenman RN. New light on *Myc* and *Myb*. part I *Myc*. *Genes Dev* 4: 2025–2035, 1990
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM. Dynamic regulation of *NGFI-A* (*zif 268*, *egr-1*) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12: 2609–2622, 1992
- Muller R, Bravo R, Bruckhardt J, Curran T. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* 312: 716–720, 1984
- Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12: 2439–2450, 1992
- Prather PL, TSAI AW, Law PY. *Mu* and *Delta* opioid receptor desensitization in undifferentiated human Neuroblastoma SHSY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1): 177–184, 1994
- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 263: 9063–9066, 1988
- Rusak B, McNaughton L, Robertson HA, Hunt SP. Circadian variation in photically induced transcription of immediate-early genes in rat suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain Res* 14: 124–130, 1992
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of *c-fos* protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240: 1328–1330, 1988
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Nat Acad Sci USA* 72(8): 3092–3096, 1975
- Tao PL, Law PY, Loh HH. Decrease in *Delta* and *Mu* opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 240(3): 809–816, 1987

- Thomas JM, Hoffman BB. Adenylate cyclase supersensitivity: a general means of cellular adaptation to inhibitory agonists? *Trends Pharmacol Sci* 8: 308–311, 1987
- Traber J, Gullis R, Hamprecht B. Influence of opiates on the levels of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Life Sci* 6: 1863–1868, 1975
- Williamson EA, Burgess GS, Eder P, Litz-Jackson S, Scott Boswell H. Cyclic AMP negatively controls *c-myc* transcription and G1 cell cycle progression in p210 BCR-ABL transformed cells: inhibitory activity exerted through cyclin D1 and cdk4. *Leukemia* 11: 73–85, 1997
- Yu VC, Eiger S, Duan DS, Lameh J, Sadee W. Regulation of cyclic AMP by the μ -opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 55: 1390–1396, 1990
- Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ. μ opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 254–262, 1993
-