

## The Effect of Morphine on REST Expression in Human Neuroblastoma NMB Cells

Do Kyung Kim\*, Chun Sung Kim, Heung-Joong Kim, Joong-Ki Kook, Seung-Hee Kim<sup>1</sup>, Baek-Hee Lee, Yun-Ho Lee, Shin-Yeob Mo, and Horace H. Loh<sup>2</sup>

Oral Biology Research Institute, Chosun University School of Dentistry, Gwangju 501-759, Korea

<sup>1</sup>Department of Dental Hygiene, Gwangju Health College, Gwangju 506-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota 55455, USA

(received June 1, 2010 ; revised June 17, 2010 ; accepted June 18, 2010)

The mu opioid receptor (MOR) has been regarded as the main site of interaction with analgesics in major clinical use, particularly morphine. The repressor element-1 silencing transcription factor (REST) functions as a transcriptional repressor of neuronal genes in non-neuronal cells. However, it is expressed in certain mature neurons, suggesting that it may have complex and novel roles. In addition, the interactions between MOR and REST and their functions remain unclear. In this study, we examined the effects of morphine on the expression of REST mRNA and protein in human neuroblastoma NMB cells to investigate the roles of REST induced by MOR activation in neuronal cells. To determine the effects of morphine on REST expression, we performed RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, western blot analysis and radioligand binding assays in NMB cells. By RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR, the expression of REST was found to be unchanged by either the MOR agonist morphine or the MOR specific antagonist CTOP. By western blot, morphine was shown to significantly inhibit the expression of REST, but this suppression was completely blocked by treatment with CTOP. In the radioligand binding assay, the overexpression of REST led to an increased opioid ligand binding activity of endogenous MOR in the NMB cells. These results together suggest that morphine inhibits the expression of REST in human neuroblastoma cells through a post-transcriptional regulatory mechanism mediated through MOR.

**Key words:** morphine, REST, mu opioid receptors, neuroblastoma cells.

### 서 론

Mu opioid 수용체(mu opioid receptor, MOR)는 G protein 관련 수용체 중의 하나로 opioid나 내인성 opioid peptide 들에 의해 활성화 된다(Wood, 1988). Morphine나 fentanyl 같은 opioid계 약물들은 내성 등 여러 가지 부작용에도 불구하고 그들이 갖는 강력한 진통효과 때문에 임상적으로 많이 이용되고 있으며, MOR는 이들 opioid계 약물들의 주요 인식부위로 알려져 있다(Wood, 1988; Berrendero 등, 2002).

Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)는 비신경세포에서 발현하여 신경전달물질 수용체, 이온통로 및 neurotrophin 수용체 등의 유전자 프로모터 상에 존재하는 21개의 DNA 염기서열인 REST binding site (RE-1)에 결합하여 이들 신경세포 관련 유전자들의 발현을 억제하는 인자로 최초 보고되었다(Mori 등, 1992; Schoenherr과 Anderson, 1995; Wood 등, 1996; Palm 등, 1998; Timmusk 등, 1999; Kemp 등, 2003; Kim 등, 2004; Kim 등, 2006; Kim 등, 2008). REST는 kruppel family zinc finger 단백질로 구성되어 있고 그 양쪽의 N말단과 C말단이 억제단백질이 결합하는 부위이며, N말단에는 mSin3와 histone deacetylase-1/2(HDAC1/2)가 결합하며 C 말단에는 CoREST/MeCP2 또는 HDAC 단백질들이 결합하고 있다(Christopher 등, 1996; Palm 등, 1998). REST가 유전자의 RE-1 부위에 결합하고 N과 C말단에 여러 억제인

\*Corresponding author: Do Kyung Kim, Department of Oral Physiology, Chosun University School of Dentistry, #375 Seosukdong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.  
Tel: +82-62-230-6893, E-mail: kdk@chosun.ac.kr

자가 결합하여 단단한 nucleosome 복합체를 형성함으로써 비신경세포에서 신경세포 관련 유전자의 발현을 억제한다고 알려져 있다(Christopher 등, 1996; Palm 등, 1998).

현재까지 30여개의 신경세포 관련 유전자가 전사과정 중에 REST/RE-1 시스템에 의해 조절되어진다고 보고되었으며, 전체 사람 게놈서열을 분석한 결과 REST가 결합할 수 있는 RE-1 염기서열을 보유하고 있는 유전자는 1,892 개로 분석되었다(Bruce 등, 2004; Kim 등, 2006; Kim 등, 2008). 그 종류는 매우 다양하며, 따라서 REST/RE-1 시스템은 특정세포에서의 단순한 기능이 아닌 다양한 세포에서 서로 다른 기능이 있을 것으로 추정된다(Bruce 등, 2004). 또한 여러 암세포들과 성숙한 신경세포에서도 REST가 발현된다는 최근의 보고들(Sun 등, 2005; Kim 등, 2006; Kim 등, 2008)에서와 같이, REST는 더 이상 신경유전자 조절 인자로서만이 아닌 다양한 여러 기능을 가지고 있을 것으로 사료되지만, 그 기능은 알려지지 않았다. 최근 Kim 등 (2008)은 REST가 MOR의 프로모터 부위에 결합하여 MOR 유전자 발현의 전사조절인자가 될 수 있을 것이라 하였으나, 그 자세한 기능은 아직 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 신경세포에서 morphine에 의해 유도되는 REST의 기능들을 밝히기 위해, 먼저 사람 neuroblastoma NMB 세포에서 morphine에 의한 REST 유전자와 단백질의 발현변화를 조사하였다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

OneStep RT-PCR Kit와 QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Kit는 Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, [<sup>3</sup>H]diprenorphine는 PerkinElmer (Covina, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Anti-REST는 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

### 세포주와 세포배양

실험에 사용한 사람 neuroblastoma NMB 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)이 함유된 37°C의 성장배지 RPMI 1640 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다(Kim 등, 2004).

### Total RNA 추출과 역전사-중합효소연쇄반응(RT-PCR)

NMB 세포에서 morphine에 의한 REST mRNA 발현을 관찰하기 위해, 6well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 NMB 세포를 접종하였다. 일정시간 배양하여 세포가 부착하면, 1  $\mu$ M의 morphine을 다양한 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시켰다. 세포를 수거하여 TRI REAGENT Kit (Molecular Research Center, Inc., Ohio, USA)를 이용하여 total RNA

**Table 1.** Primer sequences for PCR and real-time quantitative PCR

Primer names		Sequence (5' → 3')
REST	sense	TATGCGTACTCATTTCAGGTGA
	antisense	TTTGAAGTTGCTTCTATCTGCTGT
$\beta$ -actin	sense	AAGAGAGGCATCCTCACCT
	antisense	TACATGGCTGGGGTGTGAA

를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrometer) 260 nm에서 흡광도를 측정, 추출된 RNA의 농도를 계산하였다.

RT-PCR 반응을 위해 OneStep RT-PCR Kit (Valencia, CA, USA)를 사용하였다. cDNA를 합성하기 위하여 0.5  $\mu$ g의 total RNA를 이용하여 50°C에서 30분간 역전사 반응을 시행하였으며, 합성된 cDNA를 REST와  $\beta$ -actin primer (Table 1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 시행하였다. PCR 반응은 변성(denaturation)반응을 94°C에서 20초, 결합(annealing)반응을 60°C에서 30초, 중합(extension)반응을 72°C에서 40초간 36주기(REST) 또는 22주기( $\beta$ -actin)를 반복하였고 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. RT-PCR후 2% agarose gel에서 전기 영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

### Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

NMB 세포에서 morphine에 의해 변화하는 REST의 transcript 발현정도를 확인하기 위해, QuantiTect SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR Kit (Valencia, CA, USA)를 사용하여 real-time quantitative RT-PCR을 수행하였다.

cDNA 합성을 위하여 0.1  $\mu$ g의 total RNA를 이용하여 50°C에서 30분간 역전사 반응을 시행하였으며, 합성된 cDNA를 REST와  $\beta$ -actin primer (Table 1)를 이용하여 quantitative PCR 반응을 시행하였다. Quantitative PCR 반응은 iCycler iQ Real-Time detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 수행하였으며, PCR 반응은 변성반응을 94°C에서 15초, 결합반응을 60°C에서 30초, 중합반응을 72°C에서 30초간 55주기를 반복하였고 마지막 중합반응은 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. Quantitative PCR 결과는 각  $\beta$ -actin의 발현정도를 표준으로 하여 산출하였으며, PCR 후 2% agarose gel에서 전기 영동하여 각각의 PCR product를 확인하였다.

### Western blot analysis

NMB 세포에서 morphine에 의한 REST 단백질발현의 변화를 관찰하기 위해, Hwang 등(2009)의 방법으로 6well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well의 NMB 세포를 접종하였다. 일정시간 배양하여 세포가 부착하면, MOR agonist인 morphine과 MOR의 특이 antagonist인 CTOP을 처리하여 37°C에서 반응시켰다. 세포를 수거하여 protein lysis buffer (0.5% NP-40, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 5 mM AEBSF, 100 mM leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin)를 넣고

얼음위에서 20분간 반응 시킨 후, 세포 용해물을  $14,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리하고 상층액을 회수하여 단백질을 정량하였다.

NMB 세포의 단백질을  $30 \mu g$ 을 SDS-PAGE sample buffer (60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 5분간  $95^\circ C$ 에서 변성시킨 후, SDS-polyacrylamide gel에 2시간 전기영동을 시행한 다음 gel을 XCell II™ Blot Module (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 1시간동안 PVDF membrane에 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer (PBS, 0.05% Tween-20)에서 18시간 동안 blocking 하였다. Anti-REST (Millipore, Billerica, MA, USA)는 5% fat-free dry milk-PBS buffer에 1000배 희석하였으며, 이 용액에 membrane을 넣어 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후, PBST 용액에서 10분 간격으로 3회 세척하였다. Membrane을 horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBST 용액에서 3회 이상 세척하였다. Enhanced Chemiluminescence Detection Kit (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 Storm 860 Molecular Imager (GMI Inc., Ramsey, Minnesota, USA)에서 현상한 후 관찰하였다(Jun 등, 2009).

### Radioligand binding assay

NMB 세포에 REST cDNA를 도입한 후 MOR의 발현을 조사하기 위해 Kim 등(2004, 2008)의 방법으로 [ $^3H$ ] diprenorphine (PerkinElmer, Covina, CA, USA)을 이용하여 whole-cell radioligand binding assay를 시행하였다. MOR의 특이결합은 NMB 세포에 대한 전체 radioligand 결합과 MOR의 특이 antagonist인 CTOP (100 mM) 존재 시 radioligand 결합과의 차이로 결정하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 2회 이상 반복 실험을 시행하여 결과를 산출하였다.

### 통계학적 검정

모든 실험성적은  $mean \pm SEM$ 으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's *t*-test를 하였으며, *p* value가 0.05 미만( $p < 0.05$ )의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 실험결과

### NMB 세포에서 morphine에 의한 REST mRNA의 발현

NMB 세포에서 MOR agonist인 morphine에 의한 REST mRNA의 발현정도를 조사하기 위하여 REST primer (Table 1)를 이용하여 RT-PCR 분석을 시행하였다. NMB 세포에

morphine  $1 \mu M$ 을 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 6 및 24시간 동안 처리한 후 RT-PCR을 시행하였으나, REST mRNA의 발현양은 변화하지 않았다(Fig. 1). 따라서 NMB 세포에서 morphine에 의해 변화하는 REST mRNA의 발현정도를 정량적으로 확인하기 위해, QuantiTect SYBR® Green RT-PCR Kit (Valencia, CA, USA)를 사용하여 real-time quantitative RT-PCR을 수행하였다.

NMB 세포에 morphine  $1 \mu M$ 을 0, 0.5, 1, 6 및 24시간 동안 처리한 후 real-time quantitative RT-PCR을 시행한 결과, REST mRNA 발현은 변화가 없었다(Fig. 2A). NMB 세포에서 6시간 동안의 morphine 0, 0.1, 1 및  $10 \mu M$  처리 또한 REST mRNA 발현을 변화시키지 않았다(Fig. 2B). NMB 세포에서 MOR 특이 antagonist인 CTOP 처리도 REST mRNA의 발현을 변화시키지 않았다(Fig. 2C).

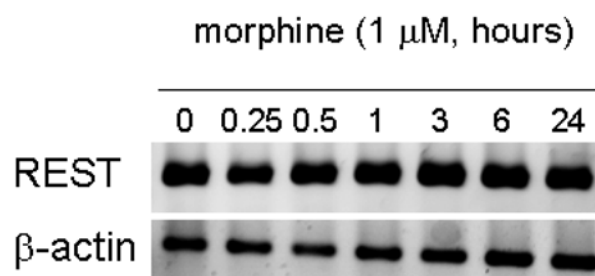
### NMB 세포에서 morphine에 의한 REST 단백질 발현 변화

NMB 세포에서 morphine에 의한 REST 단백질 발현정도를 조사하기 위하여 REST 항체를 이용하여 western blot 분석을 시행하였으며, 그 결과를 이미지 분석계를 이용한 video-based densitometry 방법으로 발현정도를 수치로 변환시켰다. NMB 세포에서 REST 단백질 발현은 morphine  $1 \mu M$  처리에 의해 morphine을 처리하지 않은 대조군에 비해 현저히 감소하였다(Fig. 3A, B). Morphine에 의한 REST 단백질 발현 감소효과는 MOR 특이 antagonist인 CTOP  $5 \mu M$  처리에 의해 완전히 차단되었다(Fig. 3A, B). NMB 세포에서 CTOP  $5 \mu M$  자체는 REST 단백질 발현 변화에 영향을 주지 않았다. 따라서 NMB 세포에서 morphine에 의해 REST 단백질 발현이 감소되는 본 연구의 결과는 MOR를 통하여 일어나는 현상임을 시사한다.

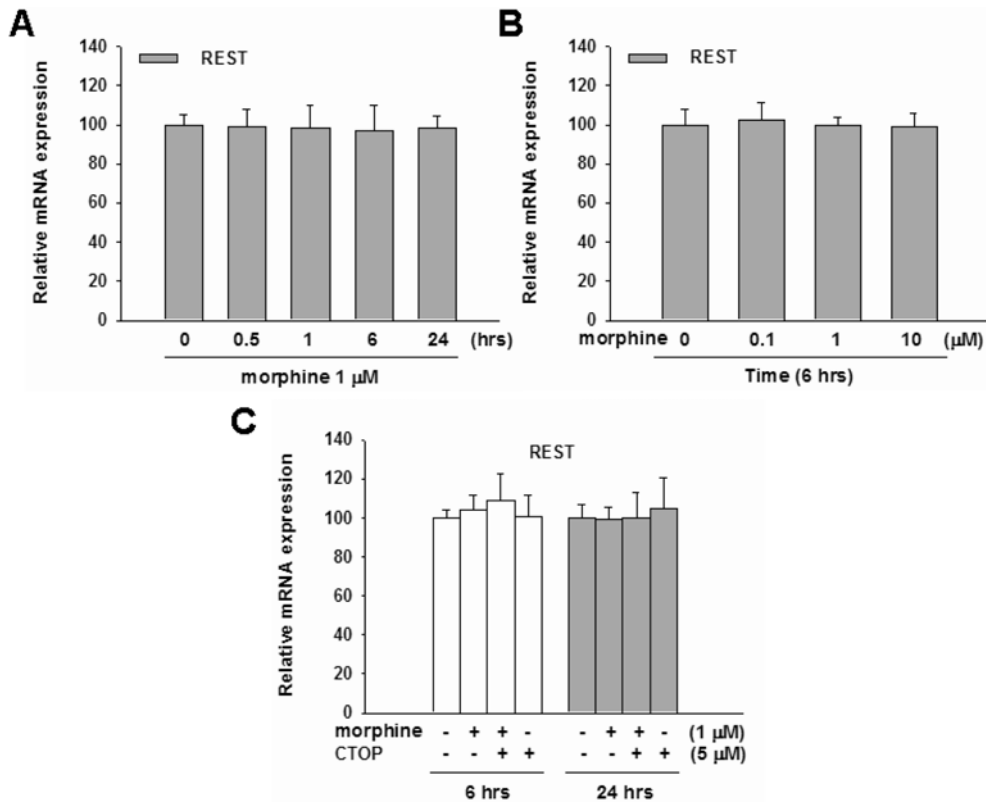
### Receptor binding activity

NMB 세포에 REST cDNA를 도입한 후 MOR의 발현을

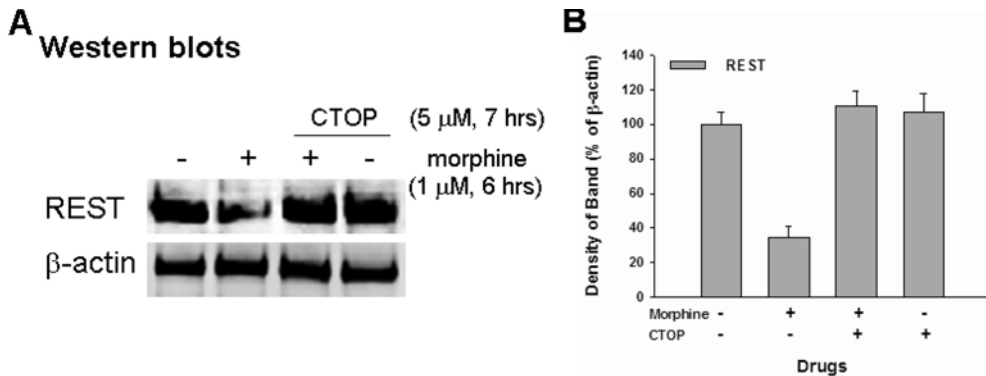
## RT-PCR



**Fig. 1.** Detection of REST mRNA by RT-PCR in NMB cells. The NMB cells were treated with  $1 \mu M$  morphine for 0, 0.25, 0.5, 1, 3, 6 and 24 hours. The first strand cDNAs prepared from the NMB cell total RNAs were used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 2.0% agarose gel and visualized with ethidium bromide.



**Fig. 2.** Real-time quantitative RT-PCR of REST transcripts from NMB cells. The expression of REST transcripts in NMB cells confirmed in quantitative RT-PCR. Changes in transcript levels for drug-treated samples were compared with drug-untreated control cells, which were assigned a value of 100. Each data point represents the mean ± SEM of three experiments. The times and concentrations of drug treatments represent on figures.

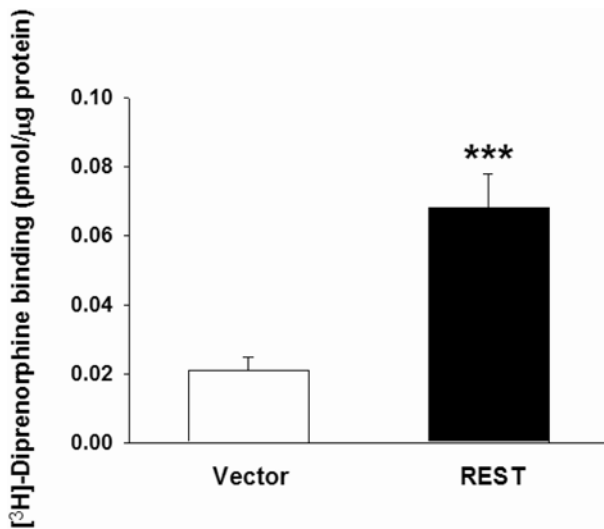


**Fig. 3.** Western blot analyses of REST in NMB cells. (A) Western blot analyses of REST. Western blot analyses were performed on the membrane fractions prepared from NMB cells in the presence of 2-mercaptoethanol using anti-REST antibody. (B) Quantitative analyses of the blots in (A). The percentage of REST protein expression was calculated as a ratio of drug-treated cells and -untreated control cells using the β-actin as internal control.

조사하기 위해, opioid 관련 약물들의 연구에 가장 많이 이용되고 있는 opioid receptor antagonist인 diprenorphine의 방사성동위원소 [<sup>3</sup>H]diprenorphine (PerkinElmer, Covina, CA, USA)을 이용하여 whole-cell radioligand binding assay를 시행하였다. REST cDNA를 도입한 NMB 세포에서 vector만 도입한 대조군 NMB 세포군에 비해 내인성 MOR의 ligand binding 활성이 3배 이상 증가하였다(Fig. 4).

**고찰**

MOR는 morphine이나 fentanyl 같은 임상적으로 중요하게 사용되는 opioid 계열 진통제들의 생리적 표적수용체이다(Raynor 등, 1996). 따라서 많은 연구자들이 MOR의 발현과 기능을 조절하는 요인들을 이해하기 위하여, MOR 유전자를 조절하는 전사인자들의 기능과 조절부위를 조사하여 왔으며(Raynor 등, 1996; Ko 등, 2003; Hwang 등,



**Fig. 4.** Radioligand binding assay. Radioligand binding assay performed by transient transfection with REST expression vector or control vector on NMB cells. Endogenous MOR binding activity is significantly enhanced by transient transfection of the REST expression plasmid in NMB cells. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM of three experiments. \*\*\* $p < 0.001$  vs. mock vector transfection control.

2003; Hwang 등, 2004; Hwang 등, 2007; Kim 등, 2008), 그러한 연구들의 결과로서 REST가 MOR 유전자 발현의 중요한 전사조절인자라는 것이 보고된 바 있다(Kim 등, 2006; Kim 등, 2008). REST는 비신경세포에서 발현하여 신경세포 관련 유전자들의 발현을 억제하는 인자로 최초 보고되었으나(Mori 등, 1992; Schoenherr과 Anderson, 1995; Wood 등, 1996; Palm 등, 1998; Timmusk 등, 1999; Kemp 등, 2003; Kim 등, 2004; Kim 등, 2006; Kim 등, 2008), 여러 암세포들과 성숙한 신경세포에서 REST가 발현된다는 최근의 보고들(Sun 등, 2005; Kim 등, 2006; Kim 등, 2008)에서와 같이 REST는 더 이상 신경유전자 조절인자로서만이 아닌 다양한 여러 기능을 가지고 있을 것으로 사료되지만, 그 기능에 대해서는 거의 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 사람 neuroblastoma NMB 세포에서 morphine에 의해 유도되는 REST의 기능을 확인하기 위해, 먼저 morphine에 의해 유도되는 REST 유전자와 단백질의 발현변화를 조사하였다.

본 연구에서 사람 neuroblastoma 세포인 NMB 세포에서 morphine에 의해 유도되는 REST mRNA의 발현변화를 조사하기 위해 RT-PCR 분석을 시행하였다. NMB 세포에서 REST mRNA의 발현은 morphine에 의해 변화하지 않았다(Fig. 1). 따라서 morphine에 의해 변화하는 REST mRNA의 발현정도를 정량적으로 확인하기 위해, real-time quantitative RT-PCR을 수행하였다. NMB 세포에서 morphine을 다양한 시간과 농도별로 처리하여 보았으나, REST mRNA의 정량적 발현 또한 변화가 없었다(Fig. 2). 이러한 결과는 사람 neuroblastoma NMB 세포에서 morphine

이 REST 유전자의 전사(transcription)단계에서는 어떠한 효과도 나타내지 못함을 시사한다. NMB 세포에서 morphine이 REST 유전자 발현에 어떠한 역할도 나타내지 못하였으므로 morphine에 의한 REST 단백질변화를 확인하기 위하여 western blot 분석을 시행하였다.

NMB 세포에서 REST 단백질의 발현은 morphine 처리에 의해 현저히 감소하였고, morphine에 의한 REST 단백질 발현 감소효과는 MOR 특이 antagonist인 CTOP 처리에 의해 완전히 차단되었으며(Fig. 3). 이러한 결과는 MOR를 통하여 일어나는 현상임을 시사한다. 본 연구에서 morphine에 의해 REST mRNA 발현의 변화는 전혀 없었으나, REST 단백질의 양은 현저히 감소하였고 이러한 현상은 MOR를 통해 일어난다는 사실을 확인하였다. 본 연구의 결과로서 NMB 세포에서 morphine에 의한 REST의 감소는 전사단계에서의 변화가 아닌, 전사후(post-transcription)단계에서의 변화라는 것을 확인할 수 있었다.

NMB 세포에서 REST에 의한 MOR의 발현과 기능을 조사하기 위해 radioligand binding assay를 시행한 결과, REST를 도입한 NMB 세포에서 대조군에 비해 MOR의 ligand binding 활성이 증가하였으며(Fig. 4), 이 결과는 REST에 의한 MOR 발현의 증가 또는 MOR의 활성화를 의미한다(Kim 등, 2006; Kim 등, 2008). 본 연구의 결과로서 NMB 세포에서 REST가 MOR의 발현을 증가시키거나 MOR의 기능을 활성화시킬 수 있음을 확인할 수 있었으며, 또한 REST와 MOR의 상호작용 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 morphine에 의한 REST의 기능, REST에 의한 MOR의 기능 및 REST와 MOR의 상호작용에 관한 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하고야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 사람 neuroblastoma NMB 세포에서 morphine은 MOR를 통하여 REST를 전사후단계에서 감소시키는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로 REST와 MOR가 서로 상호작용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 조선대학교 연구비의 지원을 받아 연구되었음.

## 참고문헌

- Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R. Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002;22:10935-40.
- Bruce AW, Donaldson IJ, Wood IC, Yerbury SA, Sadowski MI, Chapman M, Göttingens B, Buckley NJ. Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription

- factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:10458-63.
- Christopher J, Schoenherr CJ, Alice JP, Anderson DJ. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9881-6.
- Hwang CK, Wu X, Wang G, Kim CS, Loh HH. Mouse mu opioid receptor distal promoter transcriptional regulation by SOX proteins. *J Biol Chem*. 2003;278:3742-50.
- Hwang CK, Kim CS, Choi HS, McKercher SR, Loh HH. Transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor gene by PU1. *J Biol Chem*. 2004;279:19764-74.
- Hwang CK, Song KY, Kim CS, Choi HS, Guo XH, Law PY, Wei LN, Loh HH. Evidence of endogenous mu opioid receptor regulation by epigenetic control of the promoters. *Mol Cell Biol*. 2007;27:4720-36.
- Hwang IN, Jeong YJ, Jung JY, Lee JH, Kim KM, Kim WJ. Mechanism underlying NO-induced apoptosis in human gingival fibroblasts. *Int J Oral Biol*. 2009;34:7-14.
- Jun JH, Ryoo HM, Woo KM, Kim GS, Baek JH. Bone Morphogenetic Protein 2-induced MAPKs Activation Is Independent of the Smad1/5 Activation. *Int J Oral Biol*. 2009;34:115-21.
- Kemp DM, Lin JC, Habener JF. Regulation of Pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor. *J Biol Chem*. 2003;278:35057-62.
- Kim CS, Hwang CK, Choi HS, Song KY, Law PY, Wei LN, Loh HH. Neuronrestrictive silencer factor (NRSF) functions as a repressor in neuronal cells to regulate the mu opioid receptor gene. *J Biol Chem*. 2004;279:46464-73.
- Kim CS, Choi HS, Hwang CK, Song KY, Lee BK, Law PY, Wei LN, Loh HH. Evidence of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF) interaction with Sp3 and its synergic repression to the mu opioid receptor (MOR) gene. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:6392-403.
- Kim CS, Hwang CK, Song KY, Choi HS, Kim DK, Law PY, Wei LN, Loh HH. Novel function of neuron-restrictive silencer factor (NRSF) for posttranscriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783:1835-46.
- Ko JL, Liu HC, Loh HH. Role of an AP-2-like element in transcriptional regulation of mouse micro-opioid receptor gene. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;112:153-62.
- Mori N, Schoenherr CJ, Vandenberg DJ, Anderson DJ. A common silencer element in the SCG10 and type II Na<sup>+</sup>-channel genes binds a factor present in non-neuronal cells but not in neuronal cells. *Neuron*. 1992;9:45-54.
- Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T. Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci*. 1998;18:1280-96.
- Raynor K, Kong H, Law S, Heering J, Tallent M, Livingston F, Hines J, Reisine T. Molecular biology of opioid receptors. *NIDA Res Monogr*. 1996;161:83-103.
- Schoenherr CJ, Anderson DJ. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*. 1995;267:1360-3.
- Sun YM, Greenway DJ, Johnson R, Street M, Belyaev ND, Deuchars J, Bee T, Wilde S, Buckley NJ. Distinct profiles of REST interactions with its target genes at different stages of neuronal development. *Mol Biol Cell*. 2005;16:5630-8.
- Timmusk T, Palm K, Lendahl U, Metsis M. Brain-derived neurotrophic factor expression *in vivo* is under the control of neuron-restrictive silencer element. *J Biol Chem*. 1999;274:1078-84.
- Wood PL. The significance of multiple CNS opioid receptor types: a review of critical considerations relating to technical details and anatomy in the study of central opioid actions. *Peptides*. 1988;9(Suppl 1):49-55.
- Wood IC, Roopra A, Buckley NJ. Neural specific expression of the m4 muscarinic acetylcholine receptor gene is mediated by a RE1/NRSE-type silencing element. *J Biol Chem*. 1996;271:14221-5.