

Anti-proliferative and Apoptosis Inducing Effect of Resveratrol on Human Osteogenic Sarcoma (HOS) Cells

Dong Hoon Han^{1,2}, Hee Young Kwon¹ and Jeong Hee Kim^{1,*}

¹Dept. of Biochemistry, College of Dentistry, Institute of Oral Biology, KyungHee University, Seoul, 130-701, Korea

²Dept. of Biomedical Science, KyungHee University, Seoul, 130-701, Korea

(Received October 10, 2005 ; Accepted December 6, 2005)

Resveratrol (3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene), a naturally occurring polyphenol compound which present in the skin of grapes and red wine has been considered to possess chemopreventive and antioxidant properties. However, little is known about the cellular actions by which resveratrol mediates its therapeutic effects. In this study, the effect of resveratrol on cell proliferation and induction of apoptosis in human osteogenic sarcoma (HOS) cells was investigated. IC₅₀ value was determined to be approximately 6.0 µg/ml. Chromosomal DNA fragmentation analysis showed the appearance degraded DNA in time- and dose-dependent manner upon treatment of resveratrol. In order to observe the molecular mechanism involved in resveratrol-induced apoptosis, Western blot analysis was performed. We observed the decrease in the level of procaspase-3, the zymogen form of active caspase-3 in resveratrol-treated cells. This result implies that caspase-3 is activated upon treatment of resveratrol. The activation of caspase-3 was confirmed by the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. Taken together, our data demonstrate that resveratrol has anti-proliferative effect on HOS cells and induced apoptosis through activation of caspase-3 and PARP cleavage.

Key words : Resveratrol, apoptosis, caspase-3, HOS cell.

*Corresponding author: Prof. Jeong Hee Kim, Department of Biochemistry, College of Dentistry, KyungHee University, Seoul, 130-701, Korea. Tel.: 02-961-0915; Fax.: 02-960-1457, E-mail: jhkimh@khu.ac.kr

서 론

암이란 세포의 성장이 조절되지 않는 상태를 총칭적으로 지칭하며, 그 발생 원인으로는 유전적인 요인, 환경적인 요인 등이 복합적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 암치료법으로는 화학요법, 방사선 요법 및 외과적 요법 등이 단독 혹은 복합적으로 적용되고 있으며, 그 중 화학요법제로 사용되는 항암제는 암세포의 각종 대사 경로에 개입하여 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Paclitaxel의 경우 microtubule을 목적으로 하는 항암제이며, 세포를 G2/M phase에서 정지시킨 후 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 의존 및 비의존적인 세포사멸이 유도되는 것이 보고되었다 (Wang 등, 1999). Suramin의 경우 p53 단백질 증가를 통하여 항암작용을 나타내며, 이 작용은 방사선 조사로 얻어지는 항암효과와 부가적이라는 보고가 있다 (Howard 등, 1996). UTP와 구조가 유사하여 항대사작용으로 항암작용을 나타내는 5-fluorouracil (Malet-Martino and Martino, 2002), cyclooxygenase-2 저해제로서 항암효과를 나타내는 celecoxib 등이 보고되었다 (Koki and Masferrer, 2002). 최근에는 암세포가 성장하는 동안 만성적인 영양 결핍상태가 유도되고, 따라서 암세포가 이러한 영양 결핍상태에 적응되어 내성이 유도되는 것을 이용하여 kigamicin D라는 항암제가 개발되기도 하였다 (Lu 등, 2004).

최근에는 천연물에서 약효를 검색하여 신약으로 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있으며, 특히 천연약용식물은 부작용이 적고, 자연에서 손쉽게 얻을 수 있으며, 음식물로도 섭취할 수 있는 등의 여러 가지 장점으로 인하여 각광을 받고 있다. 예를 들면, 녹차 잎에서 추출한 polyphenol 화합물들 (green tea polyphenols, GTPs)은

발암 물질인 benzo[a]pyren (B[a]P)의 발암성 대사물질인 B[a]P-7,8-diol-9,10-epoxide-2를 제거하는 등의 항암 작용이 보고된 바 있다 (Stoner and Mukhtar, 1995). 또한 국내외적으로 인삼 추출물과 그 분획의 항암효과가 보고되었으며 (Lee 등, 2000), 그리고 화피추출물, momordin I 및 생강 추출물 등 천연물 제제의 항암효과에 대하여 다각적인 연구 결과가 보고된 바 있다 (Ju 등, 2004; Kim 등, 2002; Lee and Surh, 1998; Bomser 등, 1996). 그러나, 천연약용식물의 종류는 매우 광범위하고, 그들의 항암 작용 또한 복잡적이며 다양하게 나타나므로, 이에 대한 보다 체계적인 활성 검색이 요구되고 있다.

최근 적포도의 중요한 성분으로, 동맥 혈관세포를 산화적 스트레스로부터 보호하여 심혈관계 질환의 발병을 억제하는 효과가 있다고 알려진, 천연 항산화물질인 resveratrol이 분리되었으며 (Mattivi, 1993), 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 식물체가 환경적인 스트레스를 받거나 병리적인 상태에서 생성되어지는 resveratrol은 phytoalexin계 화합물로서, 식물체내에서의 정확한 기능에 대해서는 아직 많은 연구가 필요한 실정이다. 최근 resveratrol의 항암 (Signorelli and Ghidoni, 2005; Azmi 등 2005) 및 항발암 작용에 (Dong 등, 2003) 대한 연구가 활발해지고 있으며, 이러한 일련의 결과들은 resveratrol이 세포 및 인체에 중요한 작용이 있음을 시사한다. 본 연구에서는 resveratrol의 인간 골육종세포주에 미치는 세포독성 및 세포사멸 유도 효과에 대한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

시약 및 세포배양

Resveratrol (Sigma, USA)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 100 µg/ml가 되도록 녹여 -70°C에 보관하였으며, 필요시 배양배지 또는 phosphate buffered saline (PBS, GibcoBRL, USA)에 다양한 농도로 희석하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 세포, HOS (human osteogenic sarcoma, ATCC CRL-1543) 세포는 Dulbeccos' modified Eagle's medium (Gibco, BRL, USA) 배지에 10% FBS (BioWhittaker, USA)와 2 mM L-glutamine, 100 unit/ml의 streptomycin/penicillin (Gibco, BRL, USA) 및 1 mM sodium pyruvate를 첨가하여 37°C에서 5% CO₂/95% air의 조건하에서 배양하였다. 배양하는 동안 배양액은 이틀에 한번씩 교체하였고, 세포가 배양 접시에 가득 차기 전에 계대하여 주었다.

세포독성 측정

세포 독성 측정 실험은 MTT 분석법을 이용하였다. 성장기에 있는 세포를 96 well plate에 심은 후 하룻밤 동

안 배양하고 시료를 가한 후 48시간 동안 배양한 후 0.1 vol.의 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma, USA)를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 각 well의 배양액을 제거하고 형성된 formazan 염을 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol 100 µl를 넣고 가볍게 진탕하여 완전히 용해시킨 후, ELISA reader (Bio-rad, USA)로 570 nm의 파장(reference: 655 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

DNA 분절 측정

배양 중인 세포에 resveratrol를 결과에 제시된 농도와 시간동안 처리한 후 세포를 수확하여 Hyun 등 (1997)에 기술한 방법으로 DNA를 정제하였다. 세포를 냉장된 PBS로 세척한 후, 1 ml의 lysis buffer (0.5% SDS, 25 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA)로 세포용해액을 준비하였다. 여기에 proteinase K를 1 mg/ml 농도가 되게 첨가한 후, 50°C에서 최소한 3시간동안 배양하였다. 시료를 phenol:chloroform (1:1)으로 2-3번 추출하고 chloroform으로 1회 세척하였다. 시료에 2.5배의 에탄올을 가하여 DNA를 침전시킨 후 TE 완충액 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하였다. RNase A를 200 g/ml 농도가 되게 시료에 첨가하고 37°C에서 30분간 그리고 65°C에서 5분간 가열하였다. 정제된 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동으로 전개하여 ethidium bromide로 염색하여 가시화하였다.

Western blot analysis

Resveratrol을 세포에 처리한 후, 세포용해액을 준비하여 아래와 같이 Western blot 분석을 수행하였다 (Lee 등, 2000). 그 과정을 간략히 기술하면 다음과 같다. 세포를 수확하여, 세포 침전물을 PBS로 세척한 후, 100°C의 ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM NaVO₃, 100 mM NaF, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 10 mM Na pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5)를 가해 30분 동안 세포를 용해시켰다. 용해된 시료를 원심분리 하고 Lowry 분석법 (Bio-rad, USA) (Lowry, 1951)으로 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 SDS-polyacrylamide gel로 전기영동 한 후, 전개된 단백질을 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Germany)에 80 mA로 2시간 동안 transfer (30 mA, Pharmacia Biotech, USA)하고 1차 항체로 anti-caspase-3 (Transduction Laboratory, USA) 또는 anti-PARP (Santa Cruz, USA)를 사용하였다. 면역학적 반응정도는 anti-mouse peroxidase-conjugated 2차 immunoglobulin G 항체를 (Santa Cruz, USA) 사용하였고, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, UK)를 이용해 단백질 발현 정도를 확인하였다. 모든 실험은 최소

3회 이상 반복하였으며, 재현성 있는 결과를 얻었다.

결 과

Resveratrol의 HOS 세포에 대한 세포독성 측정

Polyphenol계 화합물은 대개 phenylalanine에서 유래하며 반응성이 강한 하이드록실 그룹을 포함하는 방향족 고리구조를 가지고 있다. 본 연구에 사용된 resveratrol은 polyphenol계 화합물로서 아그로스로 stilbene에 속하며, 일반적으로 3,4',5-trihydroxystilbene으로 부르기도 한다. 이성질체로는 *trans*와 *cis* 두가지 형태가 있다. 대개 자연계에서는 *trans*형이 주로 발견되며, 연구 또한 *trans*형 중심으로 이루어지고 있다. 본 연구에 사용된 resveratrol 또한 *trans*형으로 그 화학적 구조는 Fig. 1과 같다.

Resveratrol의 HOS세포에 대한 세포독성을 MTT분석법으로 측정하였다. 배양 배지에 resveratrol의 농도를 0~100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 변화시키면서 첨가하여, 세포와 함께 48시간 동안 배양시킨 결과, 약물의 농도에 비례하여 HOS 세포의 증식이 급격히 감소하였다(Fig. 2). 약물 농도가 5, 20 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 으로 증가함에 따라 세포 생존율이 53.3,

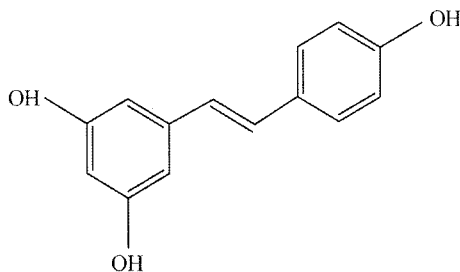


Fig. 1. Structure of resveratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilbene: 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol).

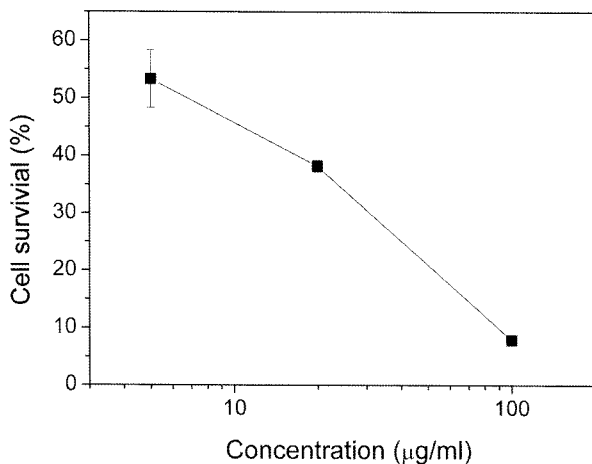


Fig. 2. Antiproliferative effect of resveratrol on HOS cells. Cells were incubated with 0, 5, 20 및 100 $\mu\text{g/ml}$ of resveratrol for 48 hr and cell survival was measured by the MTT assay.

38.2 및 7.9%로 농도의존적인 감소를 나타내었다. 이상의 결과에서 세포의 생존율을 50% 감소시키는데 필요한 농도 (IC_{50})를 분석한 결과 약 6 $\mu\text{g/ml}$ 으로 측정되었다. 약물이 포함되지 않은 용매만으로 처리한 대조군에서는 세포의 증식과 생존율 모두에 유의성 있는 변화를 초래하지 않았다.

Resveratrol의 DNA 분절 유도 효과

Resveratrol의 HOS 세포에 대한 세포독성 메커니즘을 규명하기 위하여 세포사멸과정, 즉 apoptosis의 생화학적 인 지표인 chromosomal DNA의 분절현상을 관찰하였다. HOS 세포에 resveratrol을 처리한 후, 농도를 변화시키거나 또는 처리 시간을 변화시키면서 DNA 분절현상의 유도를 관찰하였다. 먼저 resveratrol 농도를 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 고정시킨 후 처리 시간을 0, 24, 48 및 72시간으로 변화시켰을 때, chromosomal DNA의 강도가 점점 약해지며, 분절에 의한 smear 현상이 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 3A). 또한 resveratrol의 처리 농도를 0, 1, 2.5, 5, 10 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 고정시키고 72시간동안 처리하였을 때, 처리 농도가 증가함에 따라 chromosomal DNA를 나타내는 밴드의 강도가 점점 약해지며 아래쪽으로 DNA가 끌리는 smear현상이 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). 따라서 resveratrol은 HOS 세포에 시간의존적 및 농도의존적 DNA 분절현상을 유도하는 것을 알 수 있었다.

세포사멸 (apoptosis) 관련 단백질의 변화

DNA 분절은 apoptosis 유도 과정 중의 생화학적인 지표로 알려져 있다 (Kerr 등., 1994). 따라서 resveratrol 처리에 따른 세포사멸 기작 유도를 관찰하기 위해 세포사멸과 관계된 분자들의 발현 정도의 변화를 알아보았다. Fig. 4에서와 같이, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 resveratrol을 0, 24, 48 및 72 시간 동안 처리하였을 때, 처리 직후 caspase-3의 전구체인 pro-caspase-3의 양이 일시적으로 증가하였으며,

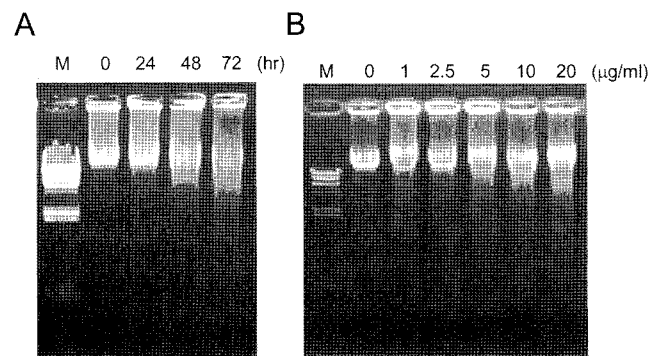


Fig. 3. Induction of nuclear DNA fragmentation by resveratrol treatment. Cells were incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of resveratrol for indicated times (A) or incubated for 72 hr at indicated concentrations of resveratrol. DNA was isolated from the cells and analyzed on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

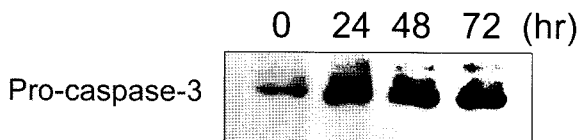


Fig. 4. Activation of caspase-3 by resveratrol treatment. HOS cells were treated with 10 /ml of resveratrol for 0, 24, 48 or 72 hrs and lysed as described in materials and methods section. The resulting cell lysate were subjected to immunoblot analysis with anti-caspase-3.

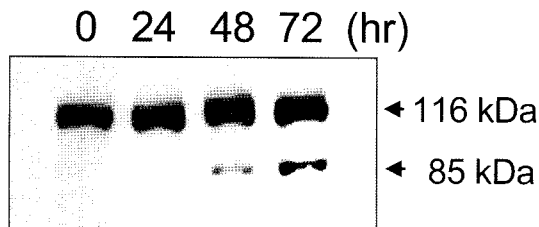


Fig. 5. Induction of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage by treatment of resveratrol. Cells were treated with 10 /ml of resveratrol for various time periods as indicated. The resulting cell lysate were subjected to immunoblot analysis with anti-PARP.

시간이 경과함에 따라 pro-caspase-3의 양이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 resveratrol의 처리에 의해 시간 경과에 따라 caspase-3의 절단, 즉 caspase-3의 활성화가 유도됨을 알 수 있었다.

Caspase-3의 활성을 확인하기 위하여 caspase-3의 기질이며, 세포사멸 유도과정에서 중요한 작용을 하는 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)의 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). PARP는 116 kDa의 단백질이며, caspase-3에 의하여 절단되어 85 kDa의 절단형단백질로 변화된다. Resveratrol (10 μ g/ml)를 처리한 후 24시간 이후부터 115 kDa인 전구체형에서부터 85 kDa의 PARP 절단형이 생성되었으며 시간이 경과할수록 절단형의 양이 증가하였다.

고 찰

세포사멸 (apoptosis)은 다양한 생리학적 및 병리학적 상태를 조절하는데 필수적인 역할을 하고 있으며, 화학요법제로 인한 세포독성 유도에도 관여한다고 알려져 있다. 세포들은 계획된 세포사 (programmed cell death)라는 세포사멸 과정을 거치기도 하는데, 이러한 세포사멸 기작은 발생과정 중에 일어나는 정상적인 과정 중 하나이다. 세포사멸은 감염 또는 유전적으로 변형이 된 세포들을 제거하기 위한 방어기전으로 특히 체세포에 돌연변이가 일어남으로 암세포로 전이 될 수 있는 잠재력을 가진 세포의 제거는 매우 중요하다. 세포사멸 (apoptosis)은 세포괴사 (necrosis)와 세포학적으로 확연히 구별이 되는데, 괴

사와는 달리 세포사멸 과정에서는 세포 내 단백질과 핵산을 분해시킬 수 있는 특이 단백질 분해효소나 nuclease가 선택적으로 유도된다 (Samuel R, 1996). 세포사멸은 정상적인 발생과정, 여러 스트레스에 노출시 또는 병리적인 과정에서 관찰되어지는 세포의 능동적인 사멸과정이다. 세포사멸 과정으로 사멸하는 세포는 염색체 밀집, 세포막의 blebbing 등의 형태학적인 특징 및 nucleosomal DNA fragmentation 등의 생화학적 특징을 보인다 (Mastrangelo 등, 1998; Thompson, 1995; Wyllie, 1994).

세포사멸은 크게 initiation, signalling, effector 및 degradation의 4단계의 과정을 거쳐 일어나는 과정이다. 개시 (initiation) 단계에서 세포는 다양한 자극 및 스트레스에 노출되게 된다. 이러한 자극이 신호전달단계 (signalling)을 거쳐 세포내의 기관에 전달된다. 신호전달 단계에서 자극을 전달하는 여러 경로가 소수의 effector 단계의 경로로 모아지게 되며, 이 경로에서 잘 알려진 세포사멸 (apoptosis) 관련 유전자들의 발현이 중요한 역할을 하게 된다 (Moll and Schram, 1998). Bcl-2의 발현의 증가는 세포사멸과정을 저해하게 되고 세포의 생존을 증가시킨다고 보고되었다 (Hockenbery 등, 1993). 이는 bcl-2의 절대적인 양 보다 bcl-2와 bax의 비율의 증가가 더 중요한 요인이다 (Sedlak 등, 1995). bcl-2는 미토콘드리아의 외막에 존재하며 미토콘드리아의 포텐셜 유지에 중요한 역할을 한다고 추측되어지며, 그 작용 중의 하나는 cytochrome c의 유리를 억제하는 것으로 생각되어진다 (Yang 등, 1997; Lui 등, 1996). Cytochrome c는 nuclear gene에 coding되었으며, 세포질에서 apocytochrome c로 생합성되어 미토콘드리아 내로 옮겨진 후 heme group이 결합하여 holocytochrome c로 전환된다 (Gonzales and Neupert, 1990). 세포질에 유리된 cytochrome c는 proteolytic enzyme인 caspase-3를 활성화시키고 (Nicholson 등, 1995; Schlegel 등, 1996), 활성을 얻은 caspase-3는 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)를 절단하게 된다. 중국에는 endonuclease 및 protease들이 활성화되어 apoptosis의 지표인 nucleosomal DNA degradation을 유발한다 (Tewari 등, 1995).

식물체가 환경적인 스트레스를 받거나 병리적인 상태에서 생성되어지는 resveratrol은 phytoalexin계 화합물로서, 식물체 내에서의 정확한 기능에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 프랑스인이 알콜의 소비가 높음에도 불구하고 심혈관계 질환의 발병빈도가 낮다는 역학적인 조사 (Renaud and DeLorgeril, 1992)는 일반적인 경향과는 반대인 결과로서 "French paradox"라고 불려지고 있다. 이러한 결과의 원인은 resveratrol의 다량 섭취에 기인한다고 분석되어지고 있으며, 이는 resveratrol이 세포 보호 및 조절 과정에 중요한 작용이 있음을 나타낸다. Resveratrol은 low density lipoprotein (LDL)의 산화를 저해하고 지질의 과산화를 억제하여 세포를 보호하는 효과를 나타낸다

고 생각되어지고 있다 (Frenkel 등, 1993). 최근 resveratrol의 항발암 작용에 대한 연구가 활발해지고 있다 (Dong 등, 2003). Cyclooxygenase-1을 저해함으로써 항염증 및 항발암 작용을 하며 (Jang 등, 1997), 활성산소종에 의하여 유도된 염증반응에서 백혈구의 밀집을 저해함으로써 항염증효과가 있음이 보고되었다 (Shigematsu 등, 2003). 또한 resveratrol은 활성산소종에 의한 세포사멸의 보호효과가 있고 (Jang and Surh, 2001; Sgambato 등, 2001), 치매의 원인물질로 알려진 β -amyloid에 의해 유도된 세포사멸의 보호효과가 있으며 (Jang and Surh, 2003), 비타민 E 및 C 등 다른 천연 항산화물질을 병용하여 사용 시 활성산소종에 의한 스트레스로부터의 상승적인 세포 보호 효과를 나타냄이 보고되었다 (Chanvitayapongs 등, 1997).

최근 resveratrol의 항암작용에 대해서도 관심이 높아져 이에 대한 연구가 활발해지고 있다 (for review, Signorelli and Ghidoni, 2005). 인체의 말초 혈액에서 DNA breakage를 일으키는 것으로부터 항암작용이 있음이 시사되었으며 (Azmi 등, 2005), 또한, resveratrol 및 그의 유도체가 인체의 promyelocytic leukemia (HL-60) cell에서 세포사멸을 유도하는 것이 보고되었다 (Surh 등, 1999; Kang 등, 2003). 인체의 U251 glioma 세포에서도 caspase-3 활성화와 PARP절단을 통한 세포사멸이 유도되었다 (Jiang 등, 2005). 본 연구에서는 resveratrol의 골육종세포주인 HOS 세포에서의 항암활성을 관찰하고 그 작용 메카니즘을 규명하고자 하였다. Resveratrol은 HOS 세포에서 세포증식을 억제하는 효과를 나타내었으며, 세포사멸 유도효과는 resveratrol에 의한 chromosomal DNA 분절 유도로서 확인되었다. 또한 resveratrol은 procaspase-3의 절단을 통한 caspase-3의 활성화를 유도하였다. Caspase-3는 세포 내에서 불활성 zymogen형인 procaspase-3 형태로 존재하는 cysteine protease이며, 32 kDa의 전구체가 aspartic acid 잔기에서 절단되어 각각 20과 12 kDa의 활성을 갖는 subunit로 전환되는 단계적 단백질 절단에 의해 활성화된다 (Nicholson 등, 1995). Resveratrol의 caspase-3 활성화는 시간 의존적 및 농도 의존적이었다. 또한 caspase-3의 기질이면서 동시에 apoptosis유도에 중요한 작용을 하는 PARP 절단이 유도 되는 것을 관찰하였다. 본 연구의 결과 항암 활성을 가지는 천연물질 resveratrol이 HOS 세포의 성장을 억제하였으며, caspase-3는 활성화시키고, PARP의 절단을 유도 하여 HOS 세포의 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 산업자원부 공동핵심과제에서 일부 지원되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Azmi, A.S., Bhat, S.H., and Hadi, S.M.: Resveratrol-Cu (II) induced DNA breakage in human peripheral lymphocytes: Implication for anticancer properties. *FEBS Lett.*, 579:3131-3135, 2005.
- Bomser, J., Madhavi, D.L., Singletary, K., and Smith, M.A.L.: *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica*, 62: 212-216, 1996.
- Chanvitayapongs, S., Draczynska-Lusiak, B., and Sun, A.Y.: Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *Neuroreport*, 8:1499-1502, 1997.
- Dong, Z.: Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mut. Res.* 523:145-150, 2003.
- Gonzales, D.H., and Neupert, W.: Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22:753-768, 1990.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J.: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75: 241-251, 1993.
- Howard, S.P., Park, S.J., Hghes-Davies, L., Coleman, C.N., and Price, B.D.: Suramin increases p53 protein levels but does not activate the p53-dependent G1 checkpoint. *Clin. Cancer Res.* 2:269-276, 1996.
- Hyun, S.J., Yoon, M.Y., Kim, T.H., and Kim, J.H.: Enhancement of mitogen-stimulated proliferation of low dose radiation-adapted mouse splenocytes. *Anticancer Res.* 17:225-230, 1997.
- Jang, J.H., and Surh, Y.J.: Protective effect of resveratrol on beta-amyloid -induced oxidative PC12 cell death. *Free. Radic. Biol. Med.* 34:1100-1110, 2003.
- Jang, J.H., and Surh, Y.J.: Protective effects of resveratrol on hydrogenperoxide -induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat. Res.* 496:181-190, 2001.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., and Pezzuto, J.M.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275:218-220, 1997.
- Jiang, H., Zhang, L., Kuo, K., Gautam, S.C., Groc, L., Rodriguez, A.I., Koubi, D., Hunter, T.J., Corcoran, G.B., Seidman M.D., Levine, R.A.: Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Mol. Cancer Res.* 4:554-561, 2005.
- Ju, E.M., Lee, S.E., Hwang H.J., and Kim, J.H.: Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. japonica. *Life Sci.* 74: 1013-1026, 2004.
- Kang J.H., Park, Y.H., Choi, S.W., Yang E.K., and Lee W.J.: Resveratrol derivatives potentially induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Exp. Mol. Med.* 35:467-474, 2003.
- Kerr J.F., Winterford C.M., and Harmon, B.V.: Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73:2013-2026, 1994.
- Kim, J.H., Ju, E.M., Lee, D.G., and Hwang, H.J.: Induction of apoptosis by momordin I in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Anticancer Res.* 22: 1885-1890, 2002.
- Koki, A.T., and Masferrer, J.L.: Celecoxib: A specific COX-2 inhibitor with anticancer properties. *Cancer Control*, 9:28-

- 35, 2002.
- Lee, E. and Surh, Y.J.: Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloid, [6]-gingerol and [6]-parpadol. *Cancer Lett.* 134:163-168, 1998.
- Lee, S.J., Lo, W.K., Kim, J.H., Sung, J.H., Lee, J.H., Moon, C.K., Lee, B.H.: Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease. *Biochem. Pharmacol.* 60:677-685, 2000.
- Lowry, O.H., Rosenberg, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- Lu, J., Kunitomo, S., Yamazaki, Y., Kaminish, M. and Esumi, H.: Kigamicin, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation. *Cancer Sci.* 95:547-552, 2004.
- Lui, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X.: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86:147-157, 1996.
- Malet-Martino, M., and Martino, R.: Clinical studies of three prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A review. *The Oncologist*, 7: 288-323, 2002.
- Marttila, R.J., Lorenz H., and Rinne, U.K.: Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 86:321-325, 1988.
- Mastrangelo A.J., and Betenbaugh, M.: Overcoming apoptosis: New methods for improving protein-expression systems. *TIBTECH*, 16:88-95, 1998.
- Mattivi, R.: Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196:522-525, 1993.
- Moll, U.M., and Schram, L.M.: p53-an acrbat in tumorigenesis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 9:23-37, 1998.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., and Miller, D.K.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376:37-43, 1995.
- Nicholson, W.D., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T.T., Yu, V.L., and Miller, D.K.: Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 326:37-43, 1995.
- Samuel, R.D., and John, T.I.: Programmed cell death (apoptosis) and cancer chemotherapy, *Cancer Control*, 3: 303-309, 1996
- Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D.K., Thornberry, N.A., Yamin, T.T., and Nicholson, W.D.: CPP32/Apopain is a key interleukin 1 β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 271:1841-1844, 1996.
- Sedlak, T.W., Olvati, Z.N., Yang, E., Ang, K., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J.: Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerization with bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7834-7838, 1995.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F., and Cittadini, A.: Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 496:171-180, 2001.
- Shigematsu, S., Ishida, S., Hara, M., Takahashi, N., Yoshimatsu, H., Sakata, T., and Korthuis, R.J.: Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia / reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free. Radic. Biol. Med.* 34:810-817, 2003.
- Signorelli, P., and Ghidoni, R.: Resveratrol as an anticancer nutrients: molecular basis, open questions and promises. *J. Nut. Biochem.* 16: 449-466, 2005.
- Stoner, G.D., and Mukhtar, H.: Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cellular. Biochem.* 22:169-180, 1995.
- Surh, Y.J., Hurh, Y.J., Kang, J.Y., Lee, E., Kong G., and Lee S.J.: Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Lett.* 140:1-10, 1999.
- Tewari, M., Quan, L., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M.: Yama/Cpp32 β , a mammalian homolog of ced-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase. *Cell*, 81:801-809, 1995.
- Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267:1456-1462, 1995.
- Wang, T.H., Popp, D.M., Wang, H.S., Saitoh, M., Mural, J.G., Henley, D.C., Ichijo, H., and Wimalasena, J.: Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathway in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 274:8208-8216, 1999.
- Wyllie, A.H.: Death gets a brake. *Nature*, 369:272-273, 1994.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., and Wang, X.: Prevention of apoptosis by bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275:1129-1132, 1997.