

Resveratrol의 항산화 및 산화촉진 활성이 세포독성에 미치는 영향

김다람 · 홍정일*

서울여자대학교 자연과학대학 식품과학부

Modulation of Cytotoxic Effects of Resveratrol by Its Anti- or Pro-oxidant Properties

Daram Kim and Jungil Hong*

Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University

Abstract Resveratrol is a polyphenolic compound frequently found in the diet, and its physiological actions have been extensively investigated. In the present study, modulation of the antioxidant and cytotoxic properties of resveratrol at different pHs by various antioxidants were investigated. To measure its antioxidant effects, resveratrol was incubated at different pHs, including 6.5, 7.4, and 8.0. Resveratrol incubated at pH 6.5 showed significantly higher DPPH radical scavenging activity, whereas resveratrol incubated at pH 8.0 did not show antioxidant effects. Resveratrol produced much higher amounts of H₂O₂ at pH 8.0 than 7.4. The cytotoxic effects of resveratrol on HeLa cells were significantly enhanced by several antioxidants, including superoxide dismutase, N-acetyl cysteine, glutathione, and ascorbic acid. The present results suggest that resveratrol shows anti- or pro-oxidant effects in different cellular organelles according to the pH conditions, and blocking of reactive oxygen species from resveratrol enhances its cytotoxic effects.

Keywords: resveratrol, antioxidant, prooxidant, cytotoxicity, reactive oxygen species

서 론

Resveratrol(*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene, C₁₄H₁₂O₃)은 정상적인 식이 중에 빈번히 섭취될 수 있는 폴리페놀성 물질로서, 식물이 다양한 스트레스를 받을 때 생성하는 파이토알레신이다. 포도, 오디, 크렌베리와 같은 베리류나 땅콩 등을 포함하여 많은 식물의 껍질부위에 많이 함유되어 있으며, 물보다는 알코올에 더 잘 녹는 성질을 가졌기 때문에 식품 중 적포도주에 상당한 양이 함유되어 있다. 육류 및 지방질 식사를 많이 하는 프랑스인들에게 심혈관계 질환 발병률이 상대적으로 낮은 French paradox 현상은 적포도주와 이에 함유된 다량의 resveratrol 섭취에서 기인하는 것으로 알려졌다(1,2). 또한, resveratrol은 식물성 에스트로겐으로 알려져 있으며 구조적으로 에스트로겐과 유사하여 체내에서 에스토겐 유사활성을 갖는다고 알려졌다(3,4). 이와 관련하여 resveratrol이 에스트로겐 수용체 또는 합성에스토로겐의 존재 유무 등에 따라 에스트로겐의 agonist 또는 antagonist로서 작용한다는 연구 결과가 보고되었다(4,5). 이 밖에도 resveratrol은 다양한 기작을 통한 항염증 효과와 항암, 항산화 및 항질소판 응고 작용 등도 보고되었다(6-9).

Resveratrol의 항산화 작용과 관련하여 각종 라디칼 소거능 및

지질산화 억제 효과에 대한 많은 보고가 있지만(10-12), 일련의 연구에서는 resveratrol의 처리 농도 및 세포 종류 등 특정 조건에 따라서 산화촉진을 유발한다는 결과도 발표된 바 있다(13-15). 이상의 결과들을 종합하여 볼 때 resveratrol은 antioxidant 또는 prooxidant로서 모두 작용할 수 있으며, 이러한 특성들이 세포 내의 다양한 환경, 특히 reduction-oxidation(redox) state에 따라 다르게 발현될 수 있음을 시사하고 있다(16). Resveratrol을 비롯한 다양한 식이 폴리페놀성 화합물들의 항산화 및 산화촉진 작용이 보고되었으며, 이와 같은 작용에 의한 reactive oxygen species(ROS) level의 변화가 직간접적으로 세포사멸 및 세포성장 촉진 또는 억제 등의 조절에 관여하거나, 세포 내 redox state을 조절하여 관련 신호전달체계 및 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(16).

건강에 대한 대중의 관심이 높아지면서 다양한 식이 폴리페놀의 생리활성 효능 및 활성 기작에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데, 이들이 세포 내에서 어떻게 항산화 또는 산화촉진 활성을 나타낼 것인지, 또 이러한 활성이 세포성장에 어떻게 영향을 미칠 것인지에 대한 의문점은 아직 해결되지 않고 있다. 특히 resveratrol을 포함한 대부분의 폴리페놀성 물질들이 pH 환경에 따라 반응성 및 산화환원 특성의 차이를 보일 수 있다는 점을 고려하면, 세포 내의 가능한 여러 pH 조건 하에서 이들의 활성 및 행태변화에 대한 연구는 필수적으로 이루어져야 한다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는, 세포 내 각 부분에서 나타날 수 있는 pH 조건을 조성하여 각 조건에서 resveratrol이 antioxidant 및 prooxidant 활성을 갖는지의 여부를 측정하였으며, resveratrol에 의해 발생되는 ROS가 세포성장에 미치는 영향을 각종 antioxidant와 복합 투여한 후에 나타난 세포독성 변화 여부로 조사하였다.

*Corresponding author: Jungil Hong, Department of Food Science and Technology, College of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Tel: 82-2-970-5639

Fax: 82-2-970-5977

E-mail: hjil@swu.ac.kr

Received October 25, 2010; revised November 18, 2010;
accepted November 19, 2010

재료 및 방법

실험재료 및 시약

실험에 사용된 resveratrol은 순도 99%의 제품을 사용하였으며, 이를 포함한 ascorbic acid, 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH), 3,3-bis[N,N-bis(carboxy-methyl)aminomethyl]-o-cresolsulfonephthalain tetrasodium salt(xylenol orange), superoxide dismutase(SOD, from bovine erythrocyte), catalase(from bovine liver), glutathione, 그리고 N-acetylcysteine(NAC)는 Sigma-Aldrich chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterrazolium bromide(MTT) 시약은 Amresco Inc. (Solon, OH, USA)에서 구입하여 사용하였고, 그 외에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

세포주 및 세포 배양

인간 자궁경부암 세포 HeLa는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양에 사용된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 및 항생제(10,000 unit/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin)는 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS)은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 세포 배양을 위한 DMEM 배지에는 10% FBS과 1% 항생제가 첨가되었고, 온도 95%, 온도 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포의 confluence가 약 80%에 도달하였을 때 계대배양하였고 20-40 passage의 세포를 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

다양한 pH 조건 하에서 시간의 경과에 따른 resveratrol의 항산화 활성 변화는 DPPH 라디칼 소거활성을 통하여 측정하였다(17). Resveratrol을 pH 6.5, 7.4, 및 8.0의 0.1 M phosphate buffer에 각 100 μM의 농도로 녹여 37°C에서 0.5, 1, 2, 3, 6, 8 시간 동안 반응시켰다. 시간별, pH별로 처리한 각 시료 40 μL에 600 μM DPPH methanol 용액 100 μL를 혼합하여 30분간 암소에서 반응시킨 후 microplate reader(SpectraMax 250, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

H₂O₂ 생성량 측정

서로 다른 pH 조건 하에서 시간에 따른 resveratrol로부터의 H₂O₂ 생성량은 ferrous oxidation-xylenol orange(FOX) assay를 통해 측정하였다(18). 상기 조건에서 처리된 100 μM resveratrol 시료 40 μL를 100 μM xylenol orange, 200 mM D-sorbitol, 그리고 500 μM ammonium ferrous sulfate가 포함된 FOX working solution 160 μL와 혼합하여 37°C, 암소에서 45분간 반응시켰다. 흡광도는 microplate reader(Triad LT, DYNEX Technologies Inc, Chantilly, VA, USA)를 사용하여 550 nm의 파장에서 측정하였다.

Resveratrol의 세포독성에 미치는 antioxidant들의 영향평가

상기 조건에서 배양된 세포를 trypsin-EDTA로 처리하여 단일 세포 혼탁액으로 만든 후, 96-well plate에 well당 약 10⁴ 세포씩 분주하여 약 24시간 동안 배양하였다. 이 후, resveratrol 및 antioxidant를 각각의 처리 농도로 serum free 배지에 희석하여 well 당 200 μL씩 단독 또는 복합 처리하였다. Resveratrol 및 다양한 antioxidant 처리 후에 나타나는 세포독성 또는 세포성장변화는 MTT assay를 통하여 측정하였다. 세포를 24시간 처리 후, 처리 물질을 포함한 배지는 제거하고 MTT 시약의 최종 농도가 0.5

mg/mL이 되도록 serum free 배지에 희석하여 각 well당 100 μL씩 첨가하였다. 이를 37°C에서 60-90분 정도 반응시켰다. 생성된 보라색의 MTT formazan은 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well 당 100 μL씩 첨가하여 용해시킨 후 microplate reader(Triad LT)를 사용하여 550 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

통계처리

모든 측정값은 3회 이상 분석하여 평균±표준편차로 나타내었고, 각 실험군별 유의차 분석은 Student's t-test 또는 one-way ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하여 95% 또는 99%의 유의 수준에서 검정하였다. IC₅₀값은 resveratrol과 각 antioxidant의 단독 또는 복합처리에 따른 농도별 세포사멸 결과로부터 직선부위에 대한 선형회귀식을 구하고 50% 사멸을 유도하는 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

pH 조건에 따른 resveratrol의 항산화 활성 변화

Resveratrol은 주로 유리라디칼 scavenger로서 작용하여 antioxidant로서의 역할을 하는데, 이러한 특성을 폴리페놀 물질이 가지고 있는 폐활성 수산화그룹의 전자공여능에서 기인하는 것으로 알려졌다(Fig. 1A)(12). Resveratrol의 항산화 작용에 대하여 많은 연구가 이루어졌는데, 대표적으로 superoxide anion, 또는 hydroxyl radical을 직접적으로 소거하거나 Fenton reaction에 의해 유도되는 지질 과산화를 억제한다고 보고되었다(13,19-21). 그러나 resveratrol이 세포 종류나 농도 등의 조건에 따라서 산화 촉진 효과를 갖기도 하는데, mitochondria에서 superoxide anion을 생성하여 결장 암세포의 사멸을 유도하며, rat liver의 microsomal system 상에서 hydroxyl radical을 생성한다는 연구 보고가 있다(22,23). 본 실험에서는 resveratrol이 세포 내 환경에서 antioxidant 또는 prooxidant로 활성을 나타내는지 알아보기 위해, 세포 내에 조성될 수 있는 약산성, 중성, 약알칼리 조건(pH 6.5, 7.4, 및 8.0)에서의 DPPH 라디칼 소거능과 H₂O₂ 생성량을 측정하였다. Resveratrol은 pH 조건에 따라서 항산화 효과의 변화를 나타내었는데, pH 6.5에서의 resveratrol은 저장시간에 관계없이 약 20%정도의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. pH 7.4에 저장시 1-2시간 이내에서 10% 내외의 미미한 활성을 나타내었고, pH 8에서는 항산화 활성을 나타내지 않았다(Fig. 1B). 대부분 폴리페놀성 물질들이 산성 pH 조건에서 안정하다고 알려진 바, resveratrol도 pH 6.5의 약산성 조건에서 안정하여 고유의 항산화 활성을 유지할 수 있는 것으로 사료되며, pH가 상승함에 따라 화학안정성이 저하되면서 항산화 활성을 상실하게 되는 것으로 보인다. 일반적으로 산소존재 하에 폐활성 물질의 산화는 ROS의 생성을 유발하는데, 이를 확인하기 위하여 동일 조건에서 resveratrol에 의한 H₂O₂ 생성량을 조사하였다. 예상대로 resveratrol에 의한 H₂O₂의 생성량은 pH의 상승 및 반응시간에 의존하여 증가하였다(Fig. 1C). 특히 pH 8.0 환경에서 resveratrol의 H₂O₂ 생성량은 현저하게 높은 산화촉진 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 세포질을 비롯한 대부분의 세포 소기관이 pH 7.2-7.4를 유지하는 반면, 골지체를 비롯한 운반 vesicle, lysosome, endosome 등은 pH 5-6.5의 약산성 환경으로 알려졌고, 미토콘드리아에서는 pH 8정도의 약알칼리 조건이 조성될 수 있다(24). 따라서 이상의 결과는 resveratrol을 비롯한 폐활성 성분들의 세포 내 위치에 따라 항산화 효과 또는 산화촉진 효과를 나타낼 수 있음을 의미하는데, 특히 미토콘드리아를 중심으로 폐활성 성분들이 현저한 산화촉진 효과를 나타내며 과량 생성된 ROS가

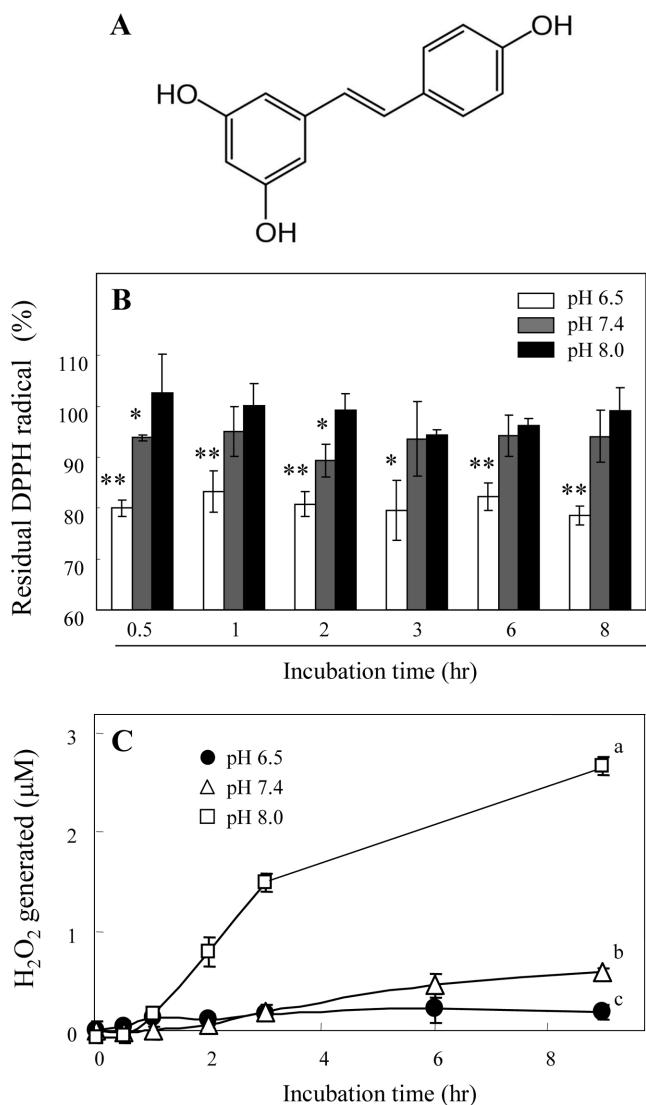


Fig. 1. Structure of resveratrol (A), changes in DPPH radical scavenging activities (B), and H_2O_2 generation (C) of resveratrol at different pH conditions. Resveratrol (100 μM) was incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5, 7.4, and 8.0). At each time point, 40 μL of each resveratrol solution was mixed with 100 μL of 600 μM DPPH solution or 160 μL of FOX working solution. Each value represents the mean \pm SD ($n=3$). *, **; significantly different from control without resveratrol according to Student's *t*-test (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$) (in B). Different letters indicate a significant difference ($p<0.01$) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (in C).

세포에 전체적인 영향을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

다양한 antioxidant 존재 하에서의 resveratrol의 세포독성 변화

일부 소기관을 제외한 세포 내 환경은 pH 7.0 이상의 비교적 약알칼리성으로 resveratrol이 prooxidant로 작용하여 ROS를 생성하는 효과를 나타낼 것으로 예상되는 바, 각종 antioxidant의 처리에 의해 ROS를 제거한 후, 세포독성의 변화 여부를 조사하였다. 사용된 각 antioxidant는 처리농도에서 세포성장에 영향을 미치지 않았으며, resveratrol과 antioxidant를 함께 처리한 경우, resveratrol 단독으로 처리하였을 때 보다 세포독성이 유의적으로 증대되었다(Fig. 2). 고농도의 ROS는 세포사멸 및 세포 senescence

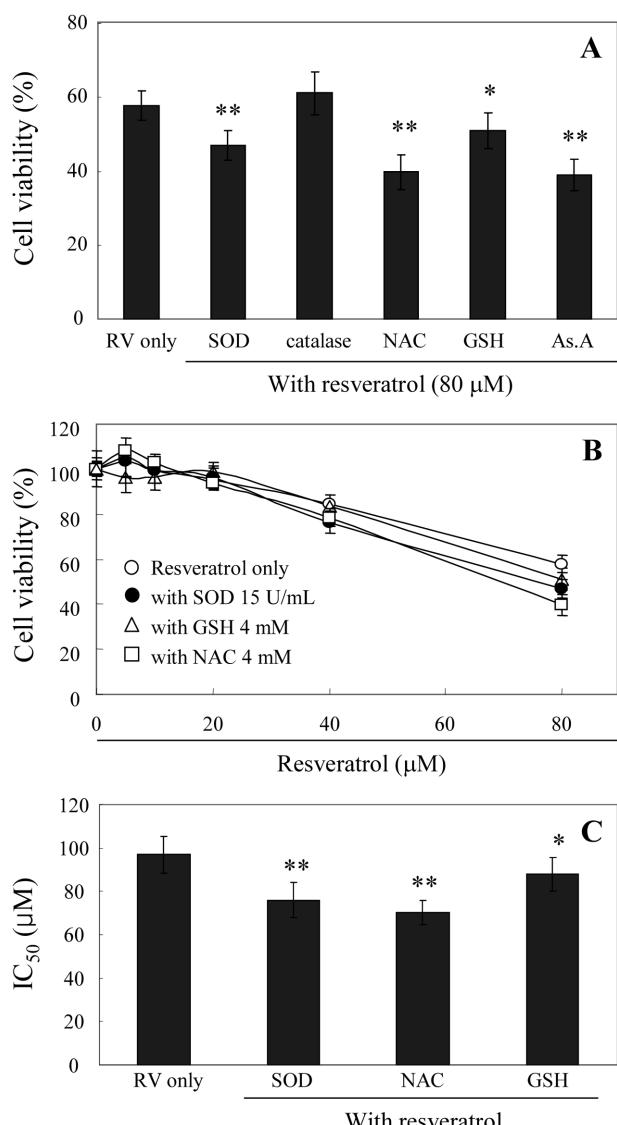


Fig. 2. Changes in cytotoxic effects of resveratrol by different types of antioxidants. HeLa cells were incubated with resveratrol in the absence or presence of 15 unit/mL SOD, 30 unit/mL catalase, 4 mM NAC, 4 mM glutathione, or 1 mM ascorbic acid for 24 hr. Viable cells were analyzed using the MTT assay. Changes in IC₅₀ values of resveratrol for HeLa cell growth by different antioxidants were also calculated (C). Each value represents the mean \pm SD ($n=8$). *, **; significantly different from its corresponding control according to Student's *t*-test (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$).

를 유도하는 반면, 반면 저농도의 ROS에 의해 세포성장이 촉진된다는 다양한 결과들이 보고된 바 있다(25). 본 결과에서 100 μM resveratrol에 의해 생성되는 H_2O_2 의 양은 pH 8에서도 최대 3 μM 이하로 세포사멸이나 세포노화를 초래할 수 있는 농도에 크게 미치지 못하며, 세포성장 촉진요인으로 작용한 것으로 예상된다. 따라서 생성된 ROS가 같이 첨가된 NAC, glutathione, 및 ascorbic acid 등의 antioxidant에 의해 제거되면서 resveratrol의 독성증가현상을 야기한 것으로 보인다. 한편 catalase의 처리는 resveratrol의 세포독성을 증가시키지 못했는데, catalase는 다른 antioxidant들과는 달리 효소 단백질로서 세포막 통과가 어렵고, 세포 내로 이행된 resveratrol로부터 발생되는 ROS를 제거할 수

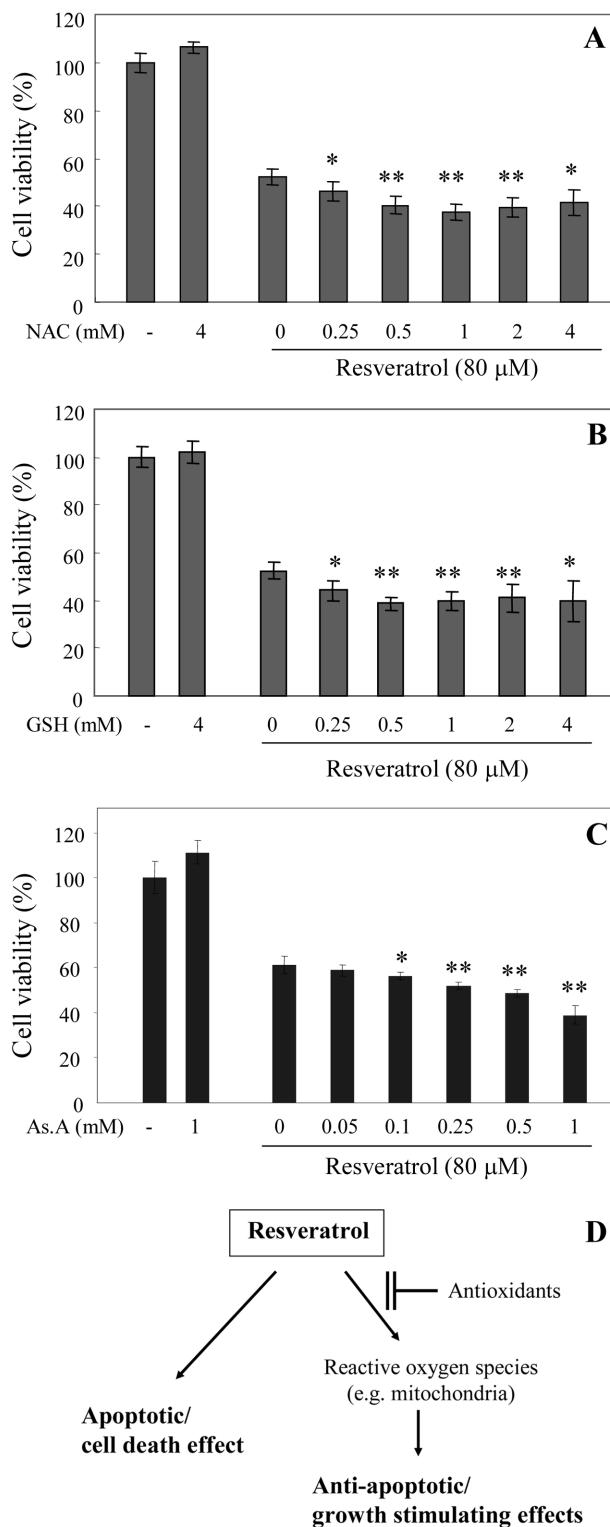


Fig. 3. Modulation of cytotoxic effects of resveratrol by different concentrations of NAC (A), glutathione (B), or ascorbic acid (C), and possible mechanisms for presenting cytotoxicity of resveratrol (D). Each value represents the mean \pm SD ($n=8$). *, **, significantly different from its corresponding control according to Student's *t* test (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

없기 때문에 사료된다. 하지만 또 다른 효소 단백질인 SOD의 존재 하에서는 resveratrol의 세포독성이 유의적으로 증가하는 것

으로 나타났다(Fig. 2A). 세포배양 환경에서 다양한 폴리페놀성 화합물들이 산화되며 화학안정성이 저하되는데, epigallocatechin-3-gallate와 같은 폐놀성 물질은 고유의 환원성질에 의해 분자산소를 superoxide anion으로 전환하며, 이 superoxide와 전자를 잃은 폐놀성 물질 간의 radical 연쇄반응에 의해 산화가 진행되는 기작이 제시된 바 있다(26). 이 과정에서 SOD는 연쇄반응의 원인이 되는 superoxide를 막고 ROS 생성을 초기에 제거하여 resveratrol의 배양환경 상에서의 화학안정성을 증대시키는 역할을 할 수 있는 반면, catalase는 Fenton reaction 등에 의해 이차적으로 생성된 H_2O_2 를 제거하지만 resveratrol의 산화과정 억제에는 직접적으로 관여하지 못하기 때문에 화학안정화 효과는 나타내지 못하는 것으로 사료된다. 따라서 세포 내 이행이 어려운 단백질인 SOD는 catalase와는 달리 배양액 상에서 화학안정성 조절을 통해 resveratrol의 세포독성을 강화시키는 것으로 보인다.

NAC, glutathione, 및 ascorbic acid의 농도변화에 따른 resveratrol의 독성변화를 평가하기 위하여, resveratrol의 농도를 $80\ \mu M$ 로 고정하고 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위 내에서 antioxidant들의 농도를 조절하여 처리하였다. 그 결과, $0.25\ mM$ 의 NAC와 glutathione에 의해서도 resveratrol의 세포독성이 증대되었으며 이를 antioxidant 농도증가에 따른 독성강화현상은 나타나지 않았다 (Fig. 3A and B). 하지만 ascorbic acid는 $0.1\ mM$ 의 농도에서도 유의적으로 resveratrol의 세포독성을 증가시켰으며, 농도 의존적으로 독성을 강화하는 경향을 나타냈다(Fig. 3C). 결론적으로 resveratrol 처리 세포에서는 resveratrol이 자체적으로 나타내는 세포독성과, 세포 내 환경에 따라 resveratrol에 의해 발생된 ROS에 의해 세포독성을 감소시키거나 세포성장을 촉진시키는 상충적인 작용이 동시에 일어나며, antioxidant에 의해 ROS가 제거됨에 따라 독성의 강화현상이 나타나는 것으로 사료된다(Fig. 3D). 이상의 결과는 resveratrol을 비롯한 다양한 식이 폴리페놀 성분들이 pH 환경요인에 따라 antioxidant 또는 prooxidant로 작용할 수 있으며, 세포 및 세포 소기관에 따라 화학적, 생리적 활성에 차이를 나타낼 수 있음을 시사한다. 또한 antioxidant의 존재 여부 또는 세포 내의 다양한 산화, 환원효소의 양도 resveratrol의 활성을 영향을 미칠 수 있으며, 향후 지속적인 연구를 통해 resveratrol을 비롯한 식이 폴리페놀의 관련기작 규명과 기능성 소재로서의 이용 가치를 향상시켜야 할 것으로 보인다.

요약

본 연구에서는 다양한 생리활성이 보고된 폴리페놀 화합물인 resveratrol의 항산화 활성과 산화촉진 작용을 세포 내에 조성될 수 있는 여러 pH 조건에서 시간별로 분석하고, resveratrol의 세포독성에 미치는 antioxidant들의 작용을 조사하였다. Resveratrol을 pH 6.5에서 저장하였을 경우 pH 7.4에서 저장하였을 때보다 유의적으로 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다. Resveratrol을 pH 8.0에서 저장시 항산화 활성을 나타내지 않았으며, 오히려 다른 조건에서 보다 현저히 많은 H_2O_2 를 생성하는 산화촉진 효과를 나타내었다. Resveratrol의 HeLa 세포에 대한 독성은 SOD, NAC, glutathione, ascorbic acid 등과 같은 antioxidant 존재하에 유의적으로 증가하였으며, 이러한 독성의 강화는 첨가된 antioxidant의 농도에는 크게 영향 받지 않았다. 본 결과는 resveratrol이 세포 내 pH 환경에 따라 antioxidant 또는 H_2O_2 와 같은 활성산소종을 생성하는 prooxidant로 작용할 수 있으며, resveratrol로부터 생성되는 활성산소종의 제거가 세포독성을 증가시킬 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2010년 서울여자대학교 교내학술특별연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

1. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'. *Eur. J. Endocrinol.* 138: 619-620 (1998)
2. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A molecule whose time has come? and gone? *Clin. Biochem.* 30: 91-113 (1997)
3. Lobo RA. Benefits and risks of estrogen replacement therapy 1. *Obstet. Gynecol.* 173: 982-989 (1995)
4. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14138-14143 (1997)
5. Bhat KPL, Pezzuto JM. Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells. *Cancer Res.* 61: 6137-6144 (2001)
6. Holmes-McNary M, Baldwin AS. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the I_KB kinase. *Cancer Res.* 60: 3477-3483 (2000)
7. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220 (1997)
8. Frankel E, Parks E, Xu R, Schneeman B, Davis P, German J. Effect of n-3 fatty acid-rich fish oil supplementation on the oxidation of low density lipoproteins. *Lipids* 29: 233-236 (1994)
9. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 17: 1-3 (1995)
10. Stojanovi S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 391: 79-89 (2001)
11. Murcia MA, Martinez-Tome M. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J. Food Protect.* 64: 379-384 (2001)
12. Mahal H, Mukherjee T. Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: Antioxidant effect. *Res. Chem. Intermediat.* 32: 59-71 (2006)
13. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* 59: 865-870 (2000)
14. Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis* 22: 1111-1117 (2001)
15. Ahmad KA, Clement V, Pervaiz S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1010: 365-373 (2003)
16. Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. T.* 35: 1156-1160 (2007)
17. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1699-1203 (1958)
18. Waslidge NB, Hayes DJ. A colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity suitable for use in a high throughput assay format. *Anal. Biochem.* 231: 354-358 (1995)
19. Zini R, Morin C, Bertelli A, Bertelli AA, Tillement JP. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drug Exp. Clin. Res.* 25: 87-97 (1999)
20. Leonard SS, Xia C, Jiang BH, Stinefelt B, Klandorf H, Harris GK, Shi X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 309: 1017-1026 (2003)
21. Losa G. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 33: 818-823 (2003)
22. Juan ME, Wenzel U, Daniel H, Planas JM. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells. *J. Agr. Food Chem.* 56: 4813-4818 (2008)
23. Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate-and Fe-microsomal systems. *Biochem. Pharmacol.* 66: 1127-1137 (2003)
24. Demaurex N. pH homeostasis of cellular organelles. *News Physiol. Sci.* 17: 1-5 (2002)
25. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13 (2004)
26. Hou Z, Sang S, You H, Lee MJ, Hong J, Chin KV, Yang CS. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: Auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res.* 65: 8049-8056 (2005)