

레스베라트롤에 의한 골육종 Saos-2 세포의 세포고사

이현장¹ · 양재현¹ · 최익준¹ · 최이천¹ · 김용권¹ · 임창인¹ · 윤재도¹ · 김호찬¹ · 원진숙² · 박래길*
¹원광대학교 의과대학 미생물학교실, ²전북대학교 의과대학 생화학교실

Resveratrol Induces the Apoptosis of Osteosarcoma Saos-2 Cells

Hyun-Jang Lee¹, Jae-Hyun Yang¹, Ik-Jun Choi¹, Yee-Cheon Choi¹, Yong-Kweon Kim¹, Chang-In Lim¹,
Jae-Do Yun¹, Ho-Chan Kim¹, Jean-Sook Won² and Rae-Kil Park*

¹Department of Microbiology, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 570-749 Korea

²Department of Biochemistry, Chonbuk University School of Medicine Jeonju, Chonbuk 561-756, Korea

(Received April 1, 2002)

(Accepted August 12, 2002)

ABSTRACT : Resveratrol, a phytoalexin found in grapes, berries, and peanuts, is one of the most promising agents for cancer prevention. Recent studies show that the antitumor activity of resveratrol occurs through p53-mediated apoptosis. This study demonstrated the mechanism that resveratrol induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells lacking p53. Treatment of osteosarcoma Saos-2 cells with resveratrol resulted in decrease of cell viability, which was revealed as apoptosis characterized by activation of caspase-3 protease as well as cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) with change of mitochondrial membrane potential transition. These results suggest that resveratrol may be potentially useful to treat osteosarcoma via activation of caspase protease and mitochondrial dysfunction.

Key Words : Resveratrol, Osteosarcoma, p53, Apoptosis

I. 서 론

레스베라트롤(resveratrol)은 포도 등 여러 식물에서 자연적으로 생성되는 피토알렉신(phytoalexin)의 일종으로 종양의 발생, 동기, 진행 등의 과정에 예방효과가 있다(Jang 등, 1997; Mgbonyebi 등, 1998; Jang과 Pezzuto, 1999). 이 물질은 혈소판의 응고, 저분자량 단백질의 산화, 세포의 증식, 그리고 DNA의 산화적 손상 등을 방지한다고 보고되었다(Sgambato 등, 2001). 또한 레스베라트롤은 지방산을 감소시켜 심장병과 암을 예방하는 작용이 최근 밝혀지면서 그 약리 효능에 대한 연구가 국제적으로 활발하게 이루어지고 있는 천연 생약자원이다. 또한 최근에는 레스베라트롤의 화학적 암예방효과는 세포고사(apoptosis) 유도기전에 의함이 보고되었다(Fontecave 등, 1998; Ragione 등, 1998). 다양한 암세포주에서 레스베라트롤은 세포고사를 유도하였으며, 세포고사 유도기전에 p53이 관여하고 있다고 알려져 있다(She 등, 2001).

세포고사는 유전자 활성화에 의하여 조절 받는 세포괴사

(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 생리과정으로, 세포질 응축, 염색질 주변의 응축, 세포막 수포화 현상, DNA의 분절 등이 수반되는데, 이러한 현상은 세포 내부의 정교한 신호전달에 의해서 조절된다(Wyllie 등, 1980; Searle 등, 1982; Cohen, 1993; Schulze-Osthoff 등, 1998).

p53은 발암과정을 억제하는 대표적인 유전자로서 DNA 손상, 종양의 형성, 성장인자의 상실 등의 세포내 기능변화에 의하여 활성화된다(Levine, 1997). p53은 다양한 항암제나 γ -irradiation 등에 의해 유도되는 세포고사 과정에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나(Lowe 등, 1993), p53에 의한 세포고사 유도기전에 대해서는 정확한 작용기전이 밝혀지지 않았다. 또한 p53은 일반 암세포나 대장암 세포에서 종종 돌연변이를 일으켜 항암치료에 대한 저항을 갖게 하기도 한다(Mahyar-Roemer 등, 2001).

레스베라트롤에 대한 많은 연구결과에도 불구하고 골의 가장 흔한 악성 종양인 골육종(osteosarcoma) 세포에 대한 연구는 보고되지 않았다. 골육종은 대표적인 골의 악성 종양이고 골성 종양의 약 10%를 차지하고 있으나 그 원인에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다(Friedman과

*To whom correspondence should be addressed

Carter, 1972).

골육종 Saos-2 세포에는 정상 세포의 세포 주기 진행에 중요한 역할을 하는 ritinoblastoma protein이 non-functional form으로 존재한다고 보고되어져 있고, 또한 p53이 결여된 세포로서 세포주기의 연구와 p53에 관한 실험 모델로 널리 사용되고 있다(Lauricella 등, 2001).

본 연구에서는 Saos-2 세포에 레스베라트롤을 처리한 뒤 세포 생존율, caspase 활성화 및 미토콘드리아의 기능등을 조사하여 레스베라트롤에 의해 유도된 세포고사 유도기전을 밝히고, 더불어 p53을 과발현 시킨 Saos-2 세포에서 레스베라트롤에 의한 세포고사 유도기전을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 배양

골육종 세포주인 Saos-2 세포는 한국 세포주은행(KNCC, 서울대학교)에서 분양, 계대 배양하면서 생화학적 및 분자생물학적 실험을 실시하였다.

Saos-2 세포는 10% 우태아혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 세포 배양액으로 5% CO₂, 95% 대기 조건의 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 48시간 간격으로 trypsin/EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포를 사용하였다.

2. 시약 및 기기

실험에 사용한 레스베라트롤(trans-3,4',5-trihydroxystilbene; 순도 > 99%), 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), sodium dodesyl sulfate, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma Chemical사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. DMEM, 우태아혈청, 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. JC-1은 Molecular probes사로부터 구입하였다. Caspase-3 protease 기질인 Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methyl coumarin (Ac-DEVD-AMC)는 Calbiochem사(San Diego CA, USA)로부터 구입하였으며, p53, Fas, PARP 및 Bcl₂ 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

3. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay(Kim 등, 1997)를 사용하였다. Saos-2 세포를 24 well 세포 배양판에 1×10^5 cells/ml씩

분주하여 16시간 CO₂ 배양기에서 안정화시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 레스베라트롤을 처리한 다음 MTT 100 μ /m/을 첨가하여 3시간 반응시켰다. 살아있는 세포에 의해 MTT로부터 생성된 보라색 불용성 formazan은 DMSO로 용해하여 540 nm 파장에서 분광광도계(Thermomax, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율로 표시하였다.

4. Caspase계 cysteine protease 활성화 측정

Saos-2 세포를 4°C에서 20분 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid, 1 mM phenylmethanymethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/m/ aptotinin, 1 μ g/m/ leupeptin, 2 mM dithiothreitol, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)로 용해한 후 14,000 rpm으로 15분 원심분리를 하였다. 이때 얻어진 상층액은 bicinchroninic acid (BCA) 용액과 30분 반응시켜 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 정량하였다. 세포 파쇄액은 caspase assay buffer (100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1 mM PMSF, 1 μ g/m/ aprotinin, 1 μ g/m/ leupeptin, 2 mM DTT, pH 7.5)로 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 caspase 활성도를 측정하였다. Caspase-3에 의한 AMC-DEVD의 절단능력은 excitation wave length(380 nm)/emission wavelength(460 nm)에서 측정하였다.

5. 미토콘드리아 막전위 측정

미토콘드리아의 막전위 변화를 관찰하고자 JC-1(2 μ M)로 세포를 염색하였다. 레스베라트롤을 처리한 세포는 배양액을 제거한 후 냉 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.9)로 세척하였으며, JC-1과 세포 배양기에서 20분 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척한 후 역상 형광 현미경의 10 \times 40 배율로 사진을 촬영하였다.

6. Transfection

Saos-2 세포에 GENE PULSER(Bio-Rad)를 이용하여 p53 유전자를 함유하고 있는 pcDNA-p53 plasmid를 transfection하였다. Transfection된 세포들은 2일(48 hr) 동안 안정화시킨 후, resveratrol을 처리하여 실험을 진행하였다. transfection의 효율은 β -galactosidase expression plasmid와 실험을 병행하여 측정하였다.

7. Western blotting

배양된 Saos-2 세포에 레스베라트롤을 처리한 후 세포

를 포함한 다음 lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7.6, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin, 1% aptotinin)를 혼합하여 4°C에서 30분 용해한 다음, 12,000 rpm, 4°C, 15분의 조건으로 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA용액에 30분 반응시켜 단백질을 정량하였다. 정량한 세포부유액은 2×sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질을 변성시킨 후, 12.5% sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30 V로 16시간 transfer한 후 blocking buffer(10% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. Anti-poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 및 anti-p53 항체는 0.05%의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample saline(TBS-T)에 1 : 1,000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응한 다음 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase(TBS-T로 1 : 3,000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응 후, enhanced chemiluminescence(ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 현상하였다.

8. 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과로서 통계 처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.001 이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 레스베라트롤이 세포 생존율에 미치는 효과

Saos-2 세포에 50, 75 및 100 μ M 농도의 레스베라트롤을 48시간 처리한 후 세포 생존율(%)을 MTT 방법으로 측정하였다.

레스베라트롤은 농도와 처리시간에 비례하여 Saos-2 세포의 생존율을 감소시켰다. 저농도인 50 및 75 μ M 레스베라트롤은 처리 36시간 후에 대조군에 비교하여 약 30% 이상 감소된 세포 생존율을 나타냈다. 또한 100 μ M 레스베라트롤 처리군은 24시간 후에 30%, 그리고 36시간 이후에서 50% 이상의 세포생존율 감소를 나타냈다(Fig. 1).

2. 레스베라트롤이 caspase 활성화에 미치는 영향

레스베라트롤이 Saos-2 세포의 caspase family cysteine protease-3, 8 및 9 protease의 효소적 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Saos-2 세포에 레스베라트롤을 100 μ M 처리한 후, 시간경과에 따른 caspase 활성을 측정하였

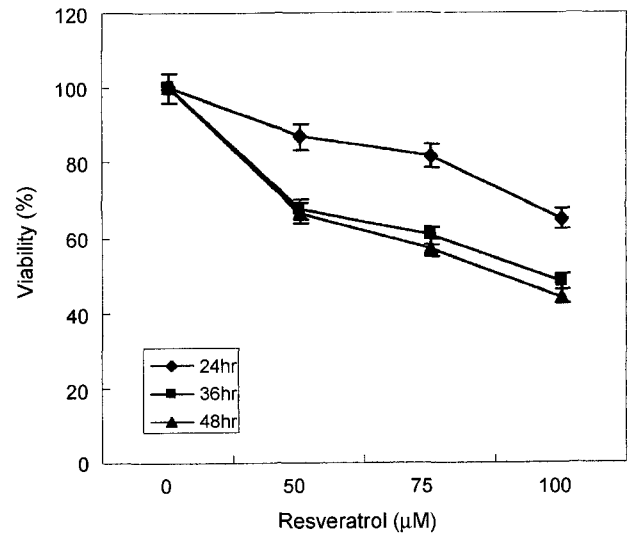


Fig. 1. Resveratrol decreased the viability of Saos-2 cells. Cells were treated with various concentrations of resveratrol for 48 hrs. Then, viability was determined by MTT assay. Results represent the mean \pm standard deviation (SD) of quadruplicates. * $p < 0.001$ by comparing to proportions.

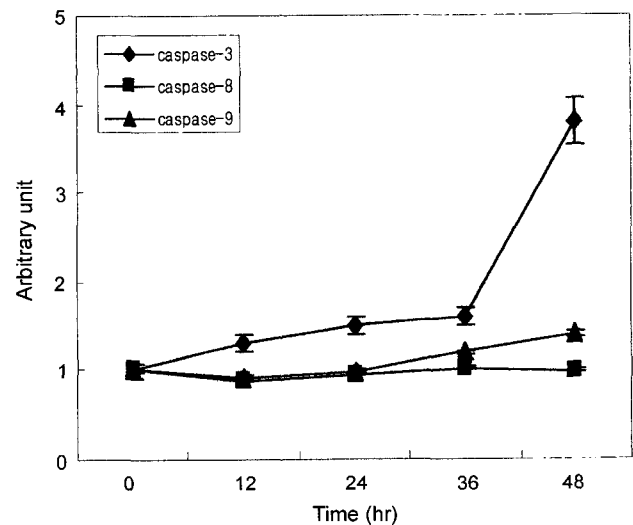


Fig. 2. Resveratrol induced the catalytic activation of caspase-3 protease. Cells were treated with 100 μ M resveratrol for the different time periods. Lysate was used to measure the activity of caspase family proteases including caspase-3, caspase-8 and caspase-9 proteases by using fluorogenic tetra peptides as substrates. Results represent the mean (%) \pm SD of quadruplicates. * $p < 0.001$ by comparing to proportions.

다. Caspase-3 protease의 활성화는 레스베라트롤 처리 36시간 후에 증가하기 시작하여 48시간에는 대조군에 비교하여 약 4배의 활성 증가를 나타냈으나 caspase-8 및 caspase-9 protease 활성의 유의한 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 또한 caspase-3 protease의 세포내 활성화 여부를 확인하기 위하여 caspase-3 protease 기질의 하나인 PARP의 분절을

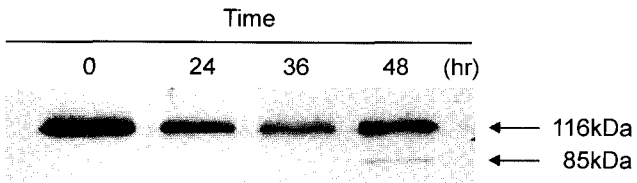


Fig. 3. Treatment with resveratrol resulted in cleavage of PARP of Saos-2 cells. Cells were treated with 100 μ M of resveratrol for the indicated time periods. Lysate was separated on 12.5% SDS-PAGE and probed for using anti-PARP antibody. The immunoreactive band was visualized by ECL kit.

조사하였다. Saos-2 세포의 PARP는 레스베라트롤 처리 48시간 후 116 kDa의 완전한 형태의 단백질이 86 kDa로 분절되었다(Fig. 3).

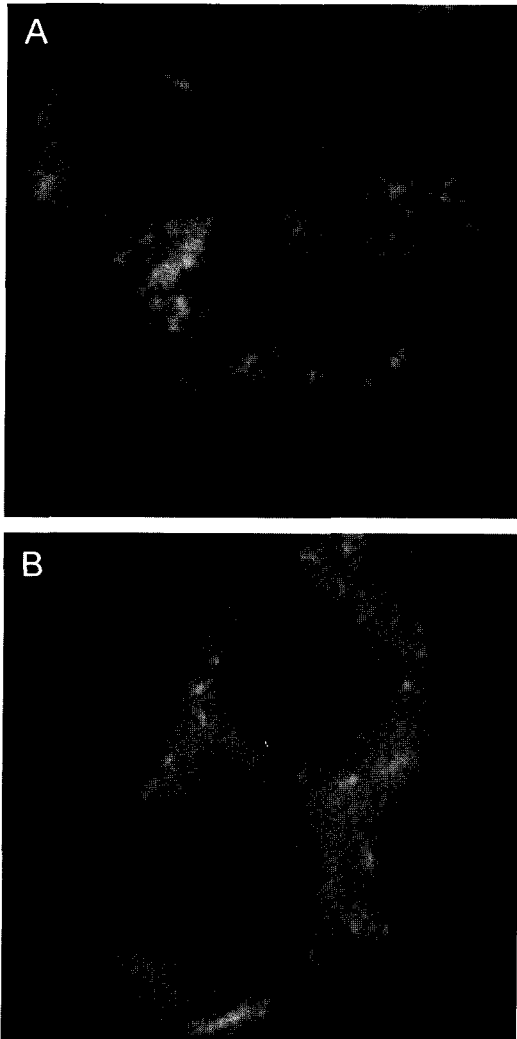


Fig. 4. Resveratrol induced the changes of the mitochondrial membrane potential transition. Cells were treated with (B) or without 100 μ M resveratrol (A), for 24 hr. Then, cells were stained with JC-1 for 30 min and visualised under inverted fluorescent microscope (10 \times 40).

4. 레스베라트롤이 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향

레스베라트롤에 의해 유도된 Saos-2 세포의 생존율 감소와 미토콘드리아의 막전위변화의 연관성을 조사하기 위하여 JC-1으로 세포를 염색한 후 형광현미경으로 미토콘드리아의 막전위차 변화를 측정하였다.

정상 세포의 경우 미토콘드리아는 세포질에 주로 과립형(punctuated form)으로 분포되어 있으며 JC-1의 형광이 오렌지를 띄고 있지만(Fig. 4A), 100 μ M 레스베라트롤을 처리한 24시간 후 실험군 세포의 미토콘드리아가 핵과 세포질에 균일하게 미만형(diffuse form)으로 분포하며 녹색의 형광으로 변화하였다(Fig. 4B). 이상의 결과는 레스베라트롤에 의해 미토콘드리아의 막전위 변화가 유발되었음을 의미하였다.

5. p53을 transfection시킨 Saos-2 세포에서 레스베라트롤에 의한 세포생존율의 감소

p53 null type인 Saos-2 세포에 p53 유전자를 transfection시킨 후 레스베라트롤을 다양한 농도로 처리하여 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. Saos-2 세포에 p53 유전자의 transfection은 48시간 경과 후 Western blotting으로 확인하여 p53 단백질의 발현 증가를 확인하였다(Fig.

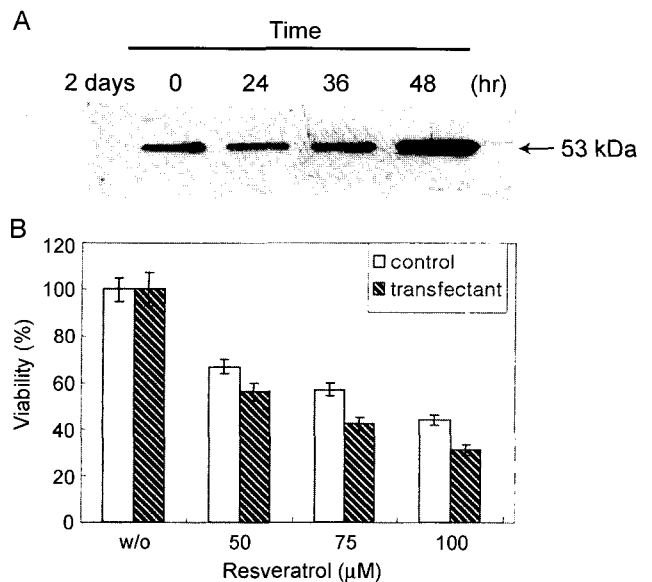


Fig. 5. Transfection of Saos-2 cells with p53 (wt) enhanced the cytotoxicity of resveratrol. Expression of p53 in Saos-2 transfectant as measured by Western blotting with specific antibodies for wild type p53 (A). Cells were treated with various concentrations of resveratrol for the indicated periods (B). Viability was measured by MTT assay. Results represent as the means \pm SD of quadruplicates. * $p < 0.001$ by comparing to proportions.

5A). 또한 대조군 Saos-2 세포와 p53 transfected Saos-2 세포의 레스베라트롤에 대한 생존율을 비교하였다. p53 transfected Saos-2 세포는 레스베라트롤 처리 농도에 관계 없이 대조군 Saos-2 세포군에 비교하여 유의한 생존율의 감소를 나타냈다(Fig. 5B). 이상의 결과는 p53 유전자의 발현이 레스베라트롤에 의한 세포독성을 증가시킴을 의미하였다.

6. p53을 transfection시킨 Saos-2 세포에서 레스베라트롤이 caspase 활성에 미치는 영향

p53을 transfection 시킨 Saos-2 세포의 레스베라트롤에 대한 세포독성 증가와 caspase family cystein protease의 활성과의 연관성을 조사하였다. 대조군 Saos-2 세포와 p53 transfected Saos-2 세포군에서 레스베라트롤 100 μ M을 처리한 후 다양한 시간 동안 caspase-3 protease의 활성을 측정하였다. 레스베라트롤 처리 12시간 실험군의 caspase-3 protease의 활성은 두 세포군에서 유사하였으나 24시간 이후부터는 p53 transfected Saos-2 세포군의 caspase-3 protease의 효소적 활성이 대조군 세포에 비교하여 유의한 증가를 나타내었다(Fig. 6). 또한 p53 transfected Saos-2 세포군의 PARP의 분절은 대조군 Saos-2 세포에 비교하여 더욱 빠른 시간인 36시간 실험군에서 관찰되었다(Fig. 7). 이상의 결과는 p53에 의한 레스베라트롤의 세포독성의 증가는 부분적으로 caspase-3 protease의 활성화에 기인하였음을 시사하였다.

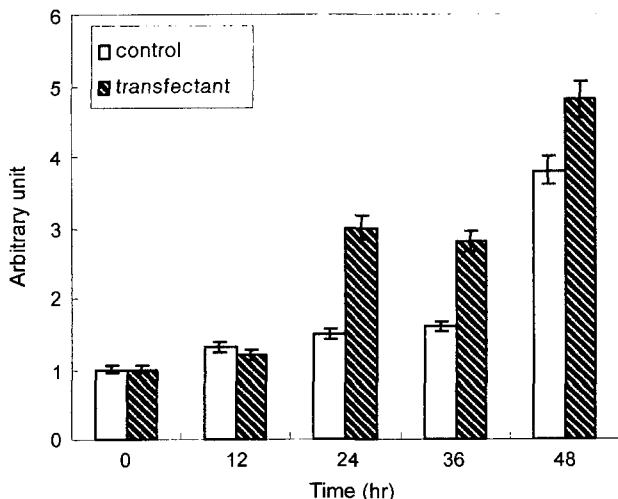


Fig. 6. Overexpression of p53 augmented the catalytic activity of caspase-3 protease by resveratrol in Saos-2 cells. Cells transfected with p53 were treated with 100 μ M resveratrol for the different time periods. Lysate was used to measure the catalytic activity of caspase-3 protease using fluorogenic peptide Ac-DEVD-AMC as a substrate. Results represent as the mean(\pm)SD of quadruplicates. * $p < 0.001$ by comparing to proportions.

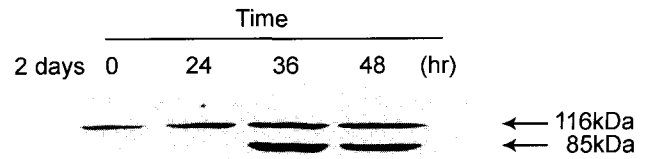


Fig. 7. PARP cleavage was early detected in p53-transfected Saos-2 cells. Cells were treated with 100 μ M of resveratrol for the various periods. Lysate was separated on 12.5% SDS-PAGE. PARP was probed with anti-PARP antibody and immunoreactive band was visualized by ECL kit.

IV. 고 찰

포도 등 천연물에서 추출한 레스베라트롤의 화학적 예방효과는 최근 많이 보고되고 있다. 다양한 암세포주에서 레스베라트롤의 항암효과를 실험한 결과 레스베라트롤을 처리한 세포에서 세포고사 기전의 활성화와 관계가 있고 (Fontecave 등, 1998; Ragione 등, 1998), 특히 세포고사 기전에 p53의 관여 여부는 여전히 관심의 대상이다 (She 등, 2001; Mahyar-Roemer 등, 2001).

본 연구에서는 p53이 결여된 Saos-2 세포에 레스베라트롤을 처리하여 레스베라트롤에 의해 유도되는 caspase 활성의 변화와 미토콘드리아의 기능장애를 통해 세포고사 과정을 밝히고자 하였다. 먼저 레스베라트롤에 의해 Saos-2 세포는 시간, 농도 의존적으로 생존율이 감소하였다. 레스베라트롤 100 μ M을 처리한 Saos-2 세포에서 caspase-3 protease의 활성이 48시간에 증가하는 것을 관찰하였고, 활성화된 caspase-3 protease는 PARP의 cleavage를 유도하였다. 이는 레스베라트롤에 의한 세포고사에서 caspase-3 protease가 활성화된다는 보고와 일치하였다 (Pervaiz, 2001). Caspase-3 protease의 활성화에 관여하는 caspase 상방 효소인 caspase-8과 caspase-9 protease의 활성은 별다른 변화를 관찰할 수 없었다. 지금까지 보고된 연구자료에 의하면 Saos-2 세포의 세포고사에 caspase-3 protease의 활성화와 PARP의 cleavage는 보고되어 있으나 다른 caspase들의 활성화에 관한 연구는 보고되지 않았다. 본 연구에서도 caspase-3 protease의 활성을 제외한 다른 caspase들의 활성은 관찰하지 못하였으나 PARP의 cleavage는 확인하였다. 레스베라트롤을 처리한 Saos-2 세포에서 미토콘드리아의 막전위차 변화를 관찰할 수 있었다.

레스베라트롤에 의한 암세포의 세포고사 기전에 p53이 관여하는지 여부를 관찰하기 위한 p53 transfected Saos-2 세포의 세포 생존율 실험은 대조군의 Saos-2 세포에 비교하여 약 20% 정도 더 감소한 결과를 보였으며, caspase-3 protease의 활성이 좀더 이른 시간에 증가하였고 PARP의 cleavage 또한 36시간부터 유도됨을 관찰할 수 있었다.

이상의 실험결과로 레스베라트롤에 의해 Saos-2 세포는

caspase 활성의 변화와 미토콘드리아의 기능장애로 인해 세포고사가 이루어짐을 알 수 있었고, p53을 transfection 하면 보다 활발한 세포고사가 유도됨을 확인할 수 있었다.

골육종은 골의 가장 흔한 악성 종양으로서 연골육종이나 섬유 육종에 비해 alkaline phosphatase의 함량이 높은 종양 세포를 가지며 골모 세포로부터 기원된다. 원인에 대해서는 잘 알려져 있지 않으나 상대적으로 미분화된 골형성 간엽조직에서 기원하는 것으로 생각되고 있다(Pucci 등, 1999; Orme 등, 2000; Meyers와 Gorlick, 1997; Bruland와 Pihl, 1997; Davis 등, 1994). 이 질병은 최근 팔, 다리를 절단하지 않고 종양부위만을 제거하는 치료법이 시술되고는 있으나 전체 골육종 환자의 40% 이상은 이런 치료법으로 치료되지 않아 팔, 다리를 잘라내야 할 뿐 아니라 재발이 잘되는 등 치료하기 힘든 질병이다.

따라서 골육종 세포에서 세포고사 기전의 상방인자들에 대한 연구가 좀더 이루어 진다면 세포고사에 의한 질병의 예방과 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bruland, O.S. and Pihl, A. (1997): On the current management of osteosarcoma. A critical evaluation and a proposal for a modified treatment strategy, *Eur. J. Cancer.*, Oct.; **33**(11), 1725-1731.
- Cohen, J.J. (1993): Apoptosis: the physiologic pathway of cell death, *Hosp Pract (Off Ed.)*, Dec. 15; **28**(12), 35-43.
- Davis, A.M., Bell, R.S. and Goodwin, P.J. (1994): Prognostic factors in osteosarcoma: a critical, *J. Clin. Oncol.*, Feb.; **12**(2), 423-431.
- Fontecave, M., Lepoivre, M., Elleingand, E., Gerez, C. and Guittet, O. (1998): Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase, *FEBS Lett.*, Jan. 16; **421**(3), 277-279.
- Friedman, M.A. and Carter, S.K. (1972): The therapy of osteogenic sarcoma: current status and thoughts for the future, *Journal of Surgical Oncology*, **4**(5), 482-510.
- Jang, M. and Pezzuto, J.M. (1999): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **25**(2-3), 65-77.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, Jan. 10; **275**(5297), 218-220.
- Kim, Y.M., Talanian, R.V. and Billiar, T.R. (1997): Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms, *J. Biol. Chem.*, Dec. 5; **272**(49), 31138-31148.
- Lauricella, M., Calvaruso, G., Carabillo, M., D'Anneo, A., Giuliano, M., Emanuele, S., Vento, R. and Tesoriere, G. (2001): pRb suppresses camptothecin-induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting c-Jun N-terminal kinase, *FEBS Lett.*, Jun. 15; **499**(1-2), 191-197.
- Levine, A.J. (1997): p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell.*, Feb. 7; **88**(3), 323-331.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. (1993): p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents, *Cell.*, Sep. 24; **74**(6), 957-967.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. and Jacks, T. (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes, *Nature*, Apr. 29; **362**(6423), 847-849.
- Mahyar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P. and Roemer, K. (2001): Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse, *Int. J. Cancer.*, Dec. 1; **94**(5), 615-622.
- Meyers, P.A. and Gorlick, R. (1997): Osteosarcoma, *Pediatr Clin. North. Am.*, Aug.; **44**(4), 973-989.
- Mgbonyebi, O.P., Russo, J. and Russo, I.H. (1998): Anti-proliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells, *Int. J. Oncol.*, Apr.; **12**(4), 865-869.
- Orme, L., Gorlick, R., Meyers, P.A., Athanasian, E. and Huvos, A.G. (2000): Osteosarcoma associated with absent thumbs: a report of two cases, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, Jan.-Feb.; **22**(1), 73-77. Review.
- Pervaiz, S. (2001) Resveratrol-from the bottle to the bedside? *Leuk. Lymphoma.*, Feb.; **40**(5-6), 491-498.
- Pucci, B., Bellincampi, L., Tafani, M., Masciullo, V., Melino, G. and Giordano, A. (1999): Paclitaxel induces apoptosis in Saos-2 cells with CD95L upregulation and Bcl-2 phosphorylation, *Exp. Cell. Res.*, Oct. 10; **252** (1), 134-143.
- Ragione, F.D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V.D., Racioppi, L., Soldati, G., Manna, C., Galletti, P. and Zappia, V. (1998): Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Sep. 8; **250**(1), 53-58.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, Jun. 15; **254**(3), 439-459.
- Searle, J., Kerr, J.F. and Bishop, C.J. (1982): Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance, *Pathol. Annu.*, 17 Pt **2**, 229-259.

- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I. and Cittadini, A. (2001): Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage, *Mutat. Res.*, Sep. 20; **496**(1-2), 171-180.
- She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y. and Dong, Z. (2001): Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase, *Cancer Res.*, Feb. 15; **61**(4), 1604-1610.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.