

JOURNAL FÜR MENOPAUSE

BODINET C, FREUDENSTEIN J

*Einfluß verschiedener pflanzlicher Menopausepräparate auf die
Tamoxifen-induzierte Inhibition der Proliferation menschlicher
Brustkrebszellen in vitro*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Deutschland)
11-14*

Homepage:

www.kup.at/menopause

**Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche**

ZEITSCHRIFT FÜR DIAGNOSTISCHE, THERAPEUTISCHE UND PROPHYLAKTISCHE ASPEKTE IM KLIMAKTERIUM

Erschaffen Sie sich Ihre ertragreiche grüne Oase in Ihrem Zuhause oder in Ihrer Praxis

Mehr als nur eine Dekoration:

- Sie wollen das Besondere?
- Sie möchten Ihre eigenen Salate, Kräuter und auch Ihr Gemüse ernten?
- Frisch, reif, ungespritzt und voller Geschmack?
- Ohne Vorkenntnisse und ganz ohne grünen Daumen?

Dann sind Sie hier richtig



Einfluß verschiedener pflanzlicher Menopausepräparate auf die Tamoxifen-induzierte Inhibition der Proliferation menschlicher Brustkrebszellen in vitro

C. Bodinet, J. Freudenstein

Alternative Therapien zur Behandlung klimakterischer Beschwerden beinhalten pflanzliche Produkte auf der Basis von Traubensilberkerze (*Actaea*, syn. *Cimicifuga racemosa*), Rotklee (*Trifolium pratense*) und Soja (*Glycine max*). Obwohl die klinische Wirksamkeit von Soja und Rotklee im Unterschied zu *Cimicifuga* zweifelbehaftet ist, kommen auch diese Präparate zunehmend zur Anwendung, insbesondere bei Brustkrebspatientinnen, die unter natürlichen oder durch die Therapie mit Tamoxifen induzierten menopausalen Beschwerden leiden. Angesichts dieser Tatsache ist es von enormer Wichtigkeit, pflanzliche Wechseljahrestherapeutika hinsichtlich ihrer möglichen Interaktionen mit Tamoxifen und ihrer potentiellen estrogenartigen Effekte auf Brustkrebszellen zu untersuchen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß verschiedener kommerziell verfügbarer pflanzlicher Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von Soja und Rotklee sowie von Arzneimitteln aus *Cimicifuga racemosa* auf die Proliferation estrogenrezeptor-positiver Brustkrebszellen in einem etablierten In-vitro-Brustkrebsmodell (MCF-7) untersucht. Um eine postmenopausale Situation zu simulieren, wurden die Experimente primär unter Estrogenmangelbedingungen durchgeführt. Um eine mögliche Beeinflussung der Tamoxifenwirkung zu evaluieren, wurden parallel Tests unter gleichzeitiger Anwesenheit von Estradiol und Tamoxifen durchgeführt. Unter Estrogenmangelbedingungen förderten die Soja und Rotklee enthaltenden Präparate das Wachstum der humanen Brustkrebszellen. Darüber hinaus antagonisierten sie die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen.

Im Unterschied dazu stimulierte das auf Basis eines isopropanolischen Spezialextraktes hergestellte *Cimicifuga-racemosa*-Präparat (iCR, Remifemin®) die Proliferation von humanen Brustkrebszellen nicht und verstärkte sogar die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen. iCR zeigte demnach das beste Sicherheitsprofil in dieser Studie. Dies steht im Einklang mit aktuellen klinischen Daten und sollte bei der Auswahl von Behandlungsmethoden für die klimakterischen Beschwerden von Brustkrebspatientinnen berücksichtigt werden.

Schlüsselwörter: *Actaea* = *Cimicifuga racemosa*, Traubensilberkerze, iCR, Rotklee, Soja, Phytoestrogene, Brustkrebs, MCF-7, Menopause, Phytotherapie

Influence of Various Herbal Preparations on the Tamoxifen-induced Suppression of Breast Cancer Cell Growth in Vitro. Alternative therapies used for menopause symptom relief include herbal preparations of *Actaea* syn. *Cimicifuga racemosa* (CR, black cohosh), *Trifolium pratense* (red clover) and *Glycine max* (soy). Despite the varying levels of scientific evidence supporting the clinical efficacy of these herbs, there is an overall increase in use particularly in women with breast cancer experiencing naturally occurring or tamoxifen related menopausal symptoms. While considering their demands, it is important to carefully evaluate the potential of these herbal preparations to exert estrogen-agonistic effects on estrogen-dependent breast cancer or to interfere with the antineoplastic action of tamoxifen. In the present study we investigated the effects of commercially available herbal menopause preparations containing red clover, soy or black cohosh on the proliferation of estrogen receptor-positive human breast cancer cells (MCF-7) in vitro. The experiments were performed in a low-estrogen environment designed to mimic a postmenopausal hormone status as well as in the presence of tamoxifen and estradiol in order to evaluate interference with tamoxifen.

The soy and red clover-containing preparations significantly stimulated MCF-7 cell proliferation and antagonised the tamoxifen-induced suppression of tumor cell growth. The isopropanolic black cohosh – extract (iCR, Remifemin®), however, did not enhance but even decreased the proliferation of the breast cancer cells and even augmented the tamoxifen effect. Thereby also supporting recent clinical data, iCR showed the best safety-profile in this study. These head-to-head comparative data should be considered when selecting alternative therapy options for breast cancer patients with menopausal complaints. *J Menopause* 2006; 13 (1): 11–4.

Key words: *Actaea* = *Cimicifuga racemosa*, black cohosh, iCR, red clover, soy, phytoestrogens, breast cancer, MCF-7, menopause, herbal therapy

Die Zweifel an der Sicherheit der Hormonersatztherapie lassen viele Frauen nach alternativen Therapien suchen. Arzneimittel aus Traubensilberkerze (*Actaea*, syn. *Cimicifuga racemosa*) haben eine lange Tradition in der Behandlung klimakterischer Beschwerden. Auch andere Pflanzen wie Soja oder Rotklee, deren Wirksamkeit im Unterschied zu *Cimicifuga* zweifelbehaftet ist und die meist nur als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet werden, sind inzwischen weit verbreitet. Vor allem Brustkrebspatientinnen, die unter natürlichen oder durch die Therapie mit Tamoxifen induzierten menopausalen Beschwerden leiden, benötigen wirksame Präparate mit gut dokumentierter Verträglichkeit. Angesichts dieser Tatsache ist es von enormer Wichtigkeit, Wechseljahrestherapeutika hinsichtlich ihrer möglichen Interaktionen mit Tamoxifen und ihrer potentiellen estrogenartigen Effekte auf Brustkrebszellen zu untersuchen.

Daher wurde der Einfluß verschiedener kommerziell verfügbarer pflanzlicher Nahrungsergänzungsmittel auf der Basis von Soja und Rotklee sowie von Arzneimitteln aus

Cimicifuga racemosa auf die Proliferation von Brustkrebszellen in einem etablierten In-vitro-Brustkrebsmodell (MCF-7) untersucht. Bei den Zellen handelt es sich um eine estrogen-sensitive humane Brustkrebszell-Linie, die von der Lungeneffusion eines metastasierenden Adenokarzinoms abstammt. MCF-7-Zellen exprimieren signifikante Mengen an Estrogen-Rezeptoren. In Gegenwart estrogenagonistisch wirkender Substanzen setzt ein verstärktes Wachstum der Zellen ein und die Proliferationsrate erhöht sich. Der Einfluß der Präparationen auf die Proliferation der MCF-7-Zellen wurde durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin bestimmt. Um eine postmenopausale Situation zu simulieren, wurden die Experimente primär unter Estrogenmangelbedingungen durchgeführt. Um eine mögliche Beeinflussung der Tamoxifenwirkung zu evaluieren, wurden parallel Tests unter gleichzeitiger Anwesenheit von Estradiol und Tamoxifen durchgeführt.

Material und Methode

Probenvorbereitung

Von jedem Menopausepräparat wurde eine der empfohlenen Tagesdosis entsprechende Menge (Tab. 1) mit 10 ml Isopropylalkohol (40 Vol.-%) für 30 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Die Extrakte wurden durch einen

Schaper & Brümmer GmbH & Co.KG, Salzgitter
Korrespondenzadresse: Dr. rer. nat. Cornelia Bodinet,
Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, D-38259 Salzgitter,
Bahnhofstraße 35; E-Mail: cornelia.bodinet@schaper-bruemmer.de

Tabelle 1: Menopausepräparate

Produktname/Charge	Produktstatus	Verzehrempfehlung/ Tagesdosis	Aktive Inhaltsstoffe
ALSI/604074	Nahrungsergänzungsmittel	1 Kapsel pro Tag	125 mg Soja-Extrakt, darin enthalten Soja-Isoflavone 50 mg
MENO/20074V/B	Nahrungsergänzungsmittel	1–2 Kapseln pro Tag	Rotklee-Extrakt (64 %), 40 mg Isoflavone pro Kapsel
YM/0412701	Nahrungsergänzungsmittel	2–4 Kapseln pro Tag	Yams-Extrakt 300 mg/2 Kapseln, Soja-Extrakt 86 mg/2 Kapseln, Hopfen-Extrakt 50 mg/2 Kapseln, Melonen-Extrakt 2,8 mg/2 Kapseln
PhytoS/M01722	Nahrungsergänzungsmittel	2 Kapseln pro Tag	Soja-Extrakt – 17,5 mg Isoflavone/Kapsel
HW/30C203	Nahrungsergänzungsmittel	1 Kapsel pro Tag	320 mg Soja-Extrakt (55 mg Isoflavone und > 15 % Saponine)
PM/9KV0442	Nahrungsergänzungsmittel	1 Kapsel pro Tag	Rotklee-Extrakt (40 mg Isoflavon-Phytoestrogene)
ORTHO/L220H66002	Ergänzende bilanzierte Diät	2 Kapseln pro Tag	Soja-Extrakt, darin enthalten Isoflavone 40 mg, Vitamine und Spurenelemente, Carotinoide 3 mg, essentielle Fettsäuren
REM/423260	Pflanzliches Arzneimittel	2 Kapseln pro Tag	0,018–0,026 ml Flüssigextrakt aus Cimicifuga-Wurzelstock (0,78–1,14:1) entspr. 20 mg Droge (Auszugsmittel Isopropylalkohol 40 Vol.-%)

0,2-µm-Membranfilter sterilfiltriert und bis zum Einsatz in den Test bei 4 °C aufbewahrt.

Zellkultur

Estrogenrezeptorpositive MCF-7-Zellen (ATCC HTB 22) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und in Eagle's MEM supplementiert mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat, 10 µg/ml Insulin, 10 % FKS und Pen./Strep. kultiviert.

Toxizitätsassay

Vor dem Einsatz der Testextrakte in den MCF-7-Assay wurden sie auf zytotoxische Effekte in einem Fluoreszenzassay mit 4-MeUH als fluorogenem Substrat für zelluläre Esterasen überprüft (Testbeschreibung siehe [1]).

MCF-7-Assay

Um Estrogenmangelbedingungen zu simulieren, wurde das FKS im Zellkulturmedium durch Charcoal-gestripptes FKS (CSF Sigma C-1696) ersetzt. Je 200 µl einer MCF-7-Zellsuspension, eingestellt auf 5×10^4 Zellen/ml, wurden in die Kavitäten einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und 150 µl frisches Testmedium zupipettiert. Die Testextrakte wurden 1:1000 in Testmedium verdünnt und es wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe angelegt. Je 50 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden zu 4 Parallelen pipettiert. Um eine mögliche Beeinflussung des Tamoxifen-Effektes festzustellen, wurden zusätzlich je 4 Kavitäten mit den Testextraktverdünnungen plus Estradiol 10⁻⁸ M plus Tamoxifen 10⁻⁶ M pipettiert. Auf jeder Platte wurden folgende Kontrollen mitgeführt: Testmedium, Lösungsmittelkontrolle, Estradiol 10⁻⁸ M als estrogenagonistische Positivkontrolle, Estradiol 10⁻⁸ M plus Tamoxifen 10⁻⁶ M als Kontrolle für den Tamoxifen-Effekt.

Die Mikrotiterplatten wurden 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dann für 8 h mit 25 µl/Vertiefung 6-³H-Thymidin (spez. Aktivität: 2 Ci/mMol, 0,25 µCi/Vertiefung) gepulst. Im Anschluß wurden die Zellen auf Glasfaserfilter geerntet (Cell Harvester Inotech) und die Einbauraten (counts per minute [cpm]) in einem Flüssigszintillationszähler (Wallac) gemessen.

Auswertung und Statistik

Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Testansätze wurden berechnet und daraus wurde der jeweilige Stimulationsindex (SI) errechnet: Stimulationsindex (SI) = cpm Testansatz/cpm Mediumkontrolle. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-t-Test ermittelt.

Ergebnisse

Validierung des MCF-7-Testsystems (Abb. 1)

Mediumkontrolle und Lösungsmittelkontrolle induzierten vergleichbare basale Einbauraten. Estradiol induzierte in der eingesetzten Konzentration von 10⁻⁸ M eine Erhöhung der Einbauraten von ca. 2000 auf 12.000 cpm, was einer Proliferationssteigerung um 600 % entspricht. Tamoxifen (10⁻⁶ M) bewirkte eine signifikante Antagonisierung des Estradioleffektes um ca. 50 %.

Test auf estrogenagonistische Aktivität

In Abbildung 2 sind die ermittelten Stimulationsindizes für die einzelnen Präparate in den jeweiligen Verdünnungen graphisch dargestellt. Bezugsgröße ist hier die Proliferationsrate der Mediumkontrolle. SI > 1 bedeutet Proliferationssteigerung, SI < 1 zeigt Proliferationshemmung. Unter Estrogenmangelbedingungen förderten die Soja und Rot-

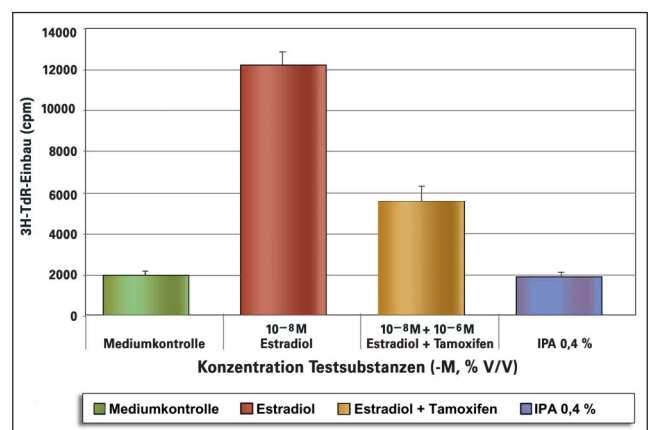


Abbildung 1: Validierung des MCF-7-Assays

kleen enthaltenden Präparate das Wachstum der humanen Brustkrebszellen. Die maximalen Stimulationsindizes lagen im Bereich um 5–7, was einer der Estradiolwirkung vergleichbaren Wachstumssteigerung entspricht. Die Präparate ALSI/604074, MENO/20074V/B, HW/30C203 und PM/9KV0442 induzierten noch in einer 1:32.000-Verdünnung eine gegenüber der Mediumkontrolle signifikant erhöhte Proliferationsrate. Im Unterschied dazu stimulierte das auf Basis eines isopropanolischen Spezialextraktes hergestellte Cimicifuga-racemosa-Präparat (REM/423260, Remifemin®-Tabletten) die Proliferation von humanen Brustkrebszellen nicht, sondern bewirkte bis zu einer Verdünnung von 1:16.000 eine signifikante Proliferationshemmung, die auf Apoptoseinduktion zurückzuführen ist [2]. Von den getesteten Extrakten zeigten HW/30C203 und PM/9KV0442 in der höchsten im Toxizitätsassay getesteten Konzentration zytotoxische Effekte.

Test auf Beeinflussung der Tamoxifen-Aktivität

In diesem Test wurden die jeweiligen Extraktverdünnungen zusammen mit einer konstanten Menge an Estradiol (10^{-8} M) und Tamoxifen (10^{-6} M) zu den MCF-7-Zellen gegeben. In Abbildung 3 sind die Stimulationsindizes für die einzelnen Testansätze graphisch aufgetragen. Bezugsgröße

ist hier der SI-Wert der Tamoxifenkontrolle (E2 + T, grüner Balken). Tamoxifen bewirkte eine ca. 50%ige Hemmung des Estradioleffektes (Estradiolkontrolle [E2], roter Balken). Wie aus der Graphik ersichtlich ist, schwächten alle Soja und Rotklee enthaltenden Präparate dosisabhängig die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen. Im Unterschied dazu verstärkte das Cimicifuga racemosa enthaltende Präparat (REM/423260) die Wirkung von Tamoxifen und bewirkte zusammen mit Tamoxifen eine max. 85%ige Hemmung der estradiolinduzierten Proliferationssteigerung.

Diskussion und Schlußfolgerungen

Unter Estrogenmangelbedingungen förderten die Soja und Rotklee enthaltenden Präparate das Wachstum der humanen Brustkrebszellen. Darüber hinaus antagonisierten sie die proliferationshemmende Wirkung von Tamoxifen. Im Unterschied dazu stimulierte das auf Basis eines isopropanolischen Spezialextraktes hergestellte Cimicifuga-racemosa-Präparat (Remifemin®) die Proliferation von humanen Brustkrebszellen nicht und verstärkte sogar die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen.

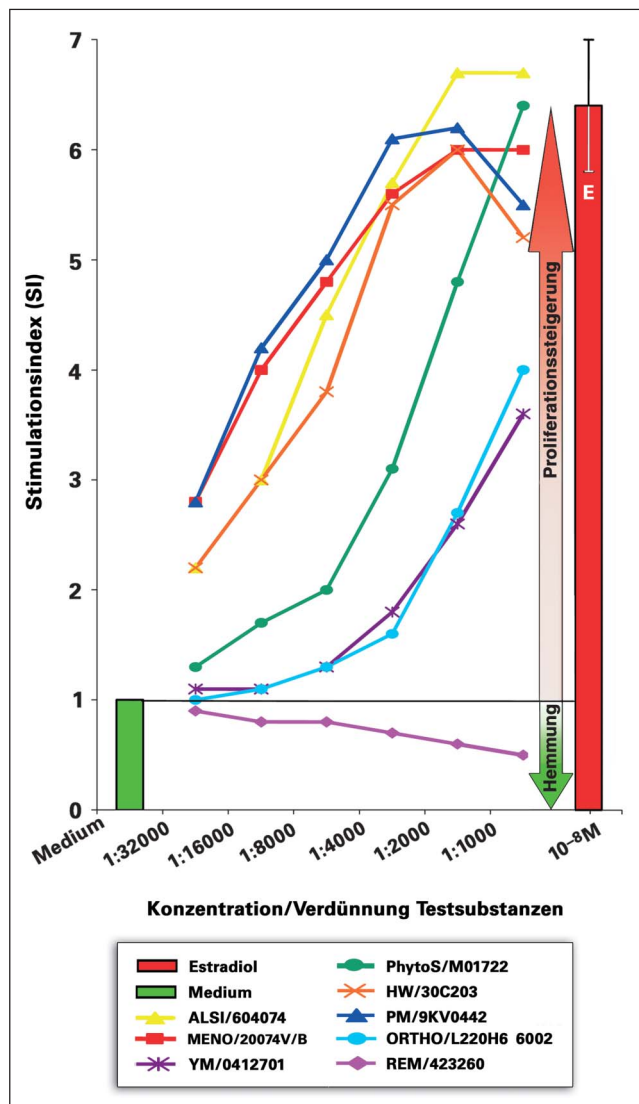


Abbildung 2: Einfluß der Präparate auf die Proliferation von MCF-7-Zellen/ Test auf estrogenagonistische Aktivität

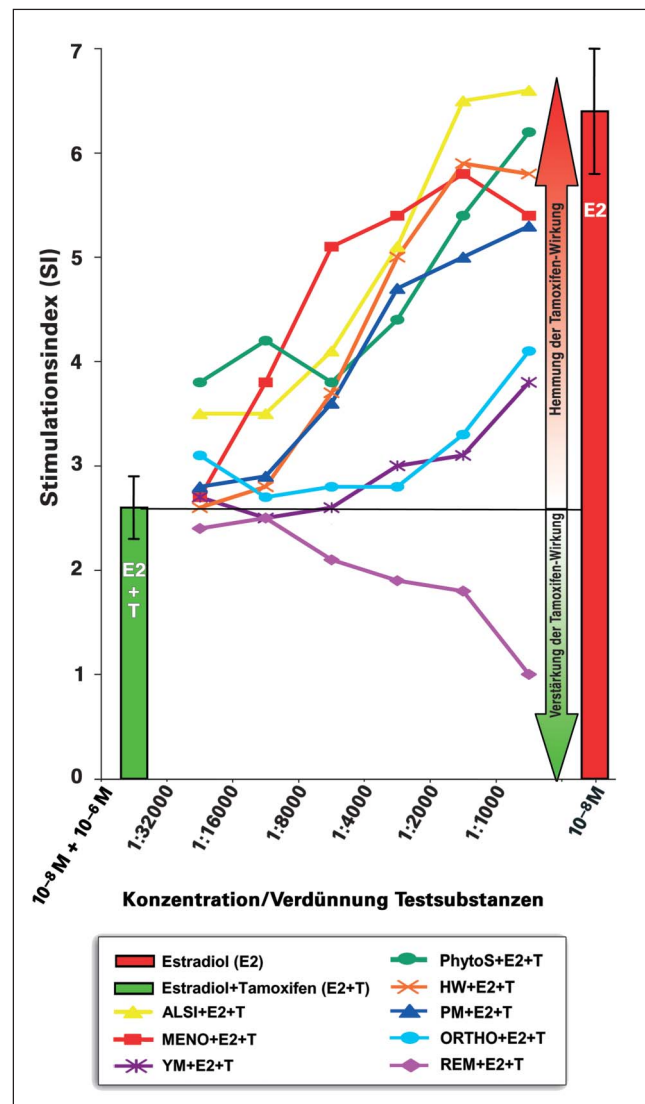


Abbildung 3: Einfluß der Präparate auf die Tamoxifen-induzierte Suppression der Proliferation von MCF-7-Zellen

Im Unterschied zu *Cimicifuga racemosa* enthalten Soja und Rotklee Isoflavon-Phytoestrogene wie Genistein und Daidzein. Diese ähneln in ihrer Struktur den Estrogenen und weisen einen den Estrogenen vergleichbaren Wirkmechanismus auf, sodaß auch mit estrogenähnlichen Nebenwirkungen zu rechnen ist. Dies wurde durch die vorliegenden MCF-7-Ergebnisse bestätigt. Im Vergleich dazu zeigt der iCR-Spezialextrakt (Remifemin®) bei gesicherter klinischer Wirksamkeit ein deutlich besseres Sicherheitsprofil. Dies sollte bei der Auswahl alternativer Behand-

lungsmethoden für Brustkrebspatientinnen mit klimakterischen Beschwerden berücksichtigt werden.

Literatur:

1. Bodinet C, Freudenstein J. Influence of marketed herbal menopause preparations on MCF-7 cell proliferation. *Menopause* 2004; 11: 281–9.
2. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R. *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84: 151–60.



Dr. rer. nat. Cornelia Bodinet

Diplom-Biologin, 1980 bis 1985 Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes, Schwerpunkt Mikrobiologie, 1999 Promotion auf dem Gebiet „Pflanzliche Immunmodulatoren“ am Institut für pharmazeutische Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald unter Leitung von Frau Prof. Dr. Ulrike Lindequist. Seit 1986 Tätigkeit im Bereich „Forschung & Entwicklung“ bei der Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, seit 1994 Leitung der Abteilung „Mikrobiologie“, seit 2004 Leitung der Abteilung „Pharmaceutical Laboratories“.

Forschungsschwerpunkte: Etablierung von In-vitro-Testmodellen zur Pharmakodynamik endokrin, immunmodulatorisch und antiviral aktiver Pflanzenextrakte, Pflanzliche Immunmodulatoren.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

Impressum

Disclaimers & Copyright

Datenschutzerklärung