

JOURNAL FÜR MENOPAUSE

VIERECK V, GRÜNDKER C, FROSCH KH, NISSLEIN T, HOFBAUER LC, EMONS G
*Ein isopropanolischer Extrakt der Traubensilberkerze (iCR)
stimuliert die Expression von Osteoprotegerin in primären humanen
Osteoblasten*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Deutschland)
18-21*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1-2) (Ausgabe für Österreich)
8-12*

Journal für Menopause 2007; 14 (1) (Ausgabe für Schweiz), 12-16

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



Ein isopropanolischer Extrakt der Traubensilberkerze (iCR) stimuliert die Expression von Osteoprotegerin in primären humanen Osteoblasten

V. Viereck¹, C. Gründker¹, K.-H. Frosch², Th. Nißlein³, L. C. Hofbauer⁴, G. Emons¹

Ein standardisierter Pflanzenextrakt (iCR, Remifemin®) aus der Traubensilberkerze wird seit vielen Jahren als bewährtes pflanzliches Medikament zur Behandlung klimakterischer Beschwerden eingesetzt. Trotz erster positiver Ergebnisse aus Osteoporose-Tiermodellen und klinischen Studien ist der Effekt von iCR auf den Knochenmetabolismus noch ungeklärt. Der „receptor activator of nuclear factor- κ B ligand“ (RANKL) ist unabdingbar für die Bildung und Aktivierung von Osteoklasten, während Osteoprotegerin (OPG) die Effekte von RANKL antagonisiert. Hier ermittelten wir nun die Effekte von iCR auf OPG und RANKL in primären menschlichen Osteoblasten. Für beide Parameter wurden die mRNA-Steady-State-Level und die Proteinkonzentrationen quantifiziert. Nach 24–48 h iCR-Behandlung zeigten sich für OPG dosisabhängig gesteigerte mRNA-Level und Proteinkonzentrationen. Die Expression von RANKL wurde durch iCR nicht moduliert. Interessanterweise steigerte iCR jedoch die Aktivität an alkalischer Phosphatase (AP) sowie die Expression von Osteocalzin (OCN), die beide als Differenzierungsmarker für Osteoblasten gelten. Die iCR-vermittelten Effekte waren durch den vollständigen Estrogenantagonisten ICI 182,780 aufhebbar, was auf einen Estrogenrezeptor- (ER-) vermittelten Effekt hinweist. Ferner zeigte sich, daß iCR in der Lage war, die negativen Effekte von Kortikosteroiden auf den Knochenstoffwechsel, d. h. die Glukokortikoid-induzierte OPG-Hemmung, zu antagonisieren. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, daß iCR die Bildung von OPG in Osteoblasten auf verschiedenen Ebenen moduliert, was zur Hemmung des Knochenabbaus durch Osteoklasten beitragen könnte. Da die Bildung von OPG gleichzeitig mit der Reifung der Osteoblasten assoziiert ist, könnte unsere Beobachtung mit der durch iCR gesteigerten Differenzierung von Osteoblasten in Zusammenhang stehen.

Schlüsselwörter: Actaea/Cimicifuga racemosa, Traubensilberkerze, Osteoprotegerin, Osteoblasten, zelluläre Differenzierung

An Isopropanolic Extract of Black Cohosh (iCR) Stimulates Osteoprotegerin Production by Human Osteoblasts. An isopropanolic extract (iCR) from the rhizome of black cohosh is used in the treatment of menopausal symptoms. Whereas animal studies in rats also suggest positive skeletal effects for iCR, the mechanism of its actions on bone cells remains unclear. RANKL is essential for osteoclast formation and activation, while osteoprotegerin (OPG) neutralises RANKL. Therefore, we assessed the effects of iCR on OPG and RANKL mRNA steady state levels by semiquantitative RT-PCR and on protein production by an ELISA system in primary human osteoblasts (hOBs). Treatment with iCR increased OPG mRNA levels and protein secretion of hOBs by 2- to 3-fold in a dose-dependent manner, with a maximum effect at a 10^6 -fold dilution of iCR ($p < 0.001$) after 24–48 h. Time-course experiments indicated a stimulatory effect of iCR on osteoblastic OPG protein secretion by 3- to 5-fold ($p < 0.001$) as early as 12 h, whereas RANKL expression was very low and was not found to be modulated by iCR. Moreover, iCR enhanced two osteoblastic differentiation markers, bone-specific alkaline phosphatase activity and osteocalcin expression, by up to 4- and 3-fold, respectively ($p < 0.001$). Interestingly, the pure estrogen receptor antagonist ICI 182,780 abrogated the stimulatory effect of iCR on OPG production. This proposes estrogen receptor-mediated pathways for black cohosh and iCR could thus qualify as a tissue specific estrogen agonist and/or antagonist. Our data suggest that iCR enhances differentiation and increases the OPG-to-RANKL ratio of normal human osteoblasts. These effects may contribute to the positive skeletal effects of black cohosh. **J Menopause 2006; 13 (1): 18–21.**

Key words: black cohosh, osteoprotegerin, osteoblasts, osteoblastic differentiation

Trotz nachgewiesener positiver Effekte auf das Knochengewebe werden synthetische Hormonersatzpräparate nicht mehr zur Vorbeugung oder Therapie einer postmenopausalen Osteoporose empfohlen [1]. Die Ursache dafür liegt in der nach langjähriger Anwendung gesteigerten Häufigkeit von kardiovaskulären und thromboembolischen Erkrankungen sowie von Brustkrebs. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein standardisierter isopropanolischer Extrakt (iCR, Remifemin®) aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Actaea*, syn. *Cimicifuga racemosa*) über Eigenschaften verfügt, die ihn als selektiven Estrogenrezeptor-Modulator (SERM) ausweisen. Dazu gehört eine positive Beeinflussung von Wechseljahresbeschwerden, wie Hitzewallungen und Schweißausbrüchen, eine Verminderung von pathologisch gesteigertem Knochenabbau, und die gleichzeitige Abwesenheit von unerwünschten, potentiell gefährlichen Nebenwirkungen an Uterus oder Brust [2].

Abkürzungen:

iCR: isopropanolischer Extrakt aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Actaea*, syn. *Cimicifuga racemosa*); OPG: Osteoprotegerin; hOB: humane Osteoblasten

Aus der ¹Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, der ²Klinik für Unfallchirurgie, Plastische und Wiederherstellungschirurgie, Georg-August-Universität Göttingen, ³Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Salzgitter, und der ⁴Abteilung Endokrinologie/Diabetologie, Philipps-Universität Marburg.

Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. med. Volker Viereck, Leitender Arzt der Frauenklinik am Kantonsspital Frauenfeld, Postfach, CH-8501 Frauenfeld, Schweiz; E-Mail: volker.viereck@stgag.ch

Der „receptor activator of nuclear factor- κ B ligand“ (RANKL) wird von Osteoblasten/-vorläuferzellen sezerniert und führt zur Stimulation seines Rezeptors RANK, der sich wiederum auf Osteoklasten/-vorläuferzellen findet. Die Effekte von RANKL werden durch den löslichen Rezeptor OPG antagonisiert, der ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird. Osteoklasten-Differenzierung, -Aktivierung und -Turnover-Rate werden durch RANKL beschleunigt und durch OPG blockiert [3]. Für verschiedene knochenaktive Substanzen, wie 17 β -Estradiol und Raloxifen, wurde ein Wirkmechanismus über RANKL und OPG gezeigt.

In den hier vorgestellten Untersuchungen sollte nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit primäre humane Osteoblasten potentielle Zielzellen für iCR darstellen. Des weiteren sollte untersucht werden, ob OPG, mittels modulierter Genexpression und Proteinsekretion, für die beobachteten Effekte von iCR auf den Knochenstoffwechsel (mit-) verantwortlich ist, ob etwaige Effekte ER-vermittelt sind und ob auch kortikosteroidinduzierte „osteoporotische“ Veränderungen zu beeinflussen wären [4]. Hierzu quantifizierten wir die Effekte von iCR auf OPG und RANKL in primären menschlichen Osteoblasten. Mittels semiquantitativer oder Real-time-RT-PCR bestimmten wir die mRNA-Steady-State-Level sowie mittels ELISA die Proteingehalte [5].

Material und Methoden

Für die Zellkulturversuche wurden primäre, trabekuläre, humane Osteoblasten (hOB) verwendet, die im Rahmen

rekonstruktiver Eingriffe am Skelett anfielen [6]. Der isopropanolische Extrakt (75 mg/ml Trockenmasse) aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (iCR) wurde von der Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

Als Referenzsubstanzen wurden hOB-Kulturen mit dem vollständigen ER-Antagonisten ICI 182,780 oder dem Glukokortikoid Dexamethason behandelt. mRNA-Quantifizierung von OPG, OCN und AP wurde mittels semi-quantitativer, kompetitiver RT-PCR (Clontech, Palo Alto, USA) vorgenommen. mRNA-Quantifizierung von RANKL sowie ER-alpha wurde auf einem ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, USA) mittels Real-time-RT-PCR durchgeführt.

OPG-Protein aus konditioniertem Zellkulturmedium wurde mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim) quantifiziert. Auch AP und OCN wurden mittels kommerziell erhältlichem ELISA quantifiziert [6].

Ergebnisse

Unter serumfreien Bedingungen steigert die iCR-Behandlung von hOB sowohl den mRNA-Level als auch die Proteinkonzentration von OPG um das 2–3fache. Dieser Effekt ist dosisabhängig und zeigt ein Maximum bei einer 10^{-6} -fachen Verdünnung (75 ng/ml) von iCR ($p < 0,001$)

nach 24–48 h. Versuche zur Kinetik zeigen, daß die Steigerung der OPG-Proteinbiosynthese in Osteoblasten um das 3–5fache ($p < 0,001$) bereits nach 12 h festzustellen ist (Abbildung 1). Nach 48 h iCR-Behandlung werden ferner die mRNA-Level für ER-alpha um das 5fache gesteigert (Daten nicht gezeigt).

Sowohl Enzymaktivität (nach 48 h) als auch mRNA-Level (nach 12 h) von alkalischer Phosphatase werden durch iCR (max. 10^{-6} -fache Verdünnung) statistisch signifikant um das ca. 4fache gesteigert. Die Expression von Osteokalzin wird nach 48 h auf das 2fache gesteigert (Abbildung 2).

Dosisabhängig antagonisiert der ER-Antagonist ICI die durch eine 10^{-6} -fache Verdünnung von iCR gesteigerte OPG-Expression (Abbildung 3).

Dosisabhängig antagonisiert iCR die durch Glukokortikoide (10^{-8} M Dexamethason) induzierte OPG-Hemmung (Abbildung 4).

Diskussion

Extrakte der Traubensilberkerze werden in zunehmendem Maße als Therapieoption zur Behandlung menopausaler Beschwerden eingesetzt [2]. Die positiven Effekte gegen Hitzewallungen und Schweißausbrüche sind nicht mit ne-

Die entsprechende Abbildung
entnehmen Sie bitte der Print-Ausgabe.

gativen Effekten an Uterus oder Brust vergesellschaftet. Tierexperimentelle Befunde bei pathologisch gesteigertem Knochenabbau sind vielversprechend, die Humandaten zur Beeinflussung metabolischer Knochenmarker sind uneinheitlich, Ergebnisse zur Frakturreduktion oder BMD (Bone Mineral Density) liegen nicht vor [7–9].

Wir zeigen hier, daß ein isopropanolischer Traubensilberkerzenextrakt (iCR) die Produktion von OPG in menschlichen Osteoblasten steigert und gleichzeitig die Expression deren zellulärer Differenzierungsmarker OCN und AP erhöht.

Der Anstieg der OPG-Produktion ist dosis- und zeitabhängig, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene nachweisbar, deutlich ausgeprägt und durch den reinen Estrogenantagonisten ICI 182,780 aufhebbar. Des weiteren ist iCR in der Lage, die Absenkung der OPG-Spiegel durch Glukokortikoide zu verhindern. Somit ist durch iCR auch eine Verhinderung des pathologischen Knochenabbaues als Folge einer Kortikosteroidbehandlung denkbar.

Die hier verwendeten hOB-Zellen weisen das Standardrepertoire an Differenzierungsmarkern auf. Diese Marker (Typ-I-Kollagen, OCN, AP) spiegeln die phänotypische Dif-

ferenzierung der Zellen wider und werden auch z. B. durch Dexamethason und Vitamin D gesteigert. Unsere Genexpressionsdaten zeigen außerdem, daß iCR die OPG-Produktion vor allem in ER-alpha-positiven Osteoblasten anregt. Dies stimmt mit unseren früheren Ergebnissen zur Stimulierung von OPG durch therapeutisch relevante Osteoanabolika unter den beschriebenen In-vitro-Bedingungen überein [10, 11]. Viele derartige Therapieoptionen verbieten sich jedoch bei Patientinnen, die unter Brustkrebs leiden. Geeignete Alternativen sollten idealerweise ein SERM-Profil mit ausgeprägten estrogenagonistischen Effekten am Knochen und am Vasomotorenzentrum und keinen bzw. estrogenantagonistischen Effekten am Uterus, dem Blutgefäßsystem und der Brust aufweisen. Als typischer Pflanzenextrakt ist iCR ein Vielstoffgemisch mit einer Reihe pharmakologisch aktiver Substanzen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß das Wachstum der ER-positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 durch den iCR-Gesamtextrakt sowie durch dessen beide Hauptinhaltsstoffgruppen, die Triterpenglykoside und die Zimtsäureester, gehemmt wird. Programmierter Zelltod, Apoptose, wird hierfür verantwortlich gemacht [12, 13]. Weitere präklinische Befunde sprechen aber auch für dopaminerge und serotoninerge Effekte als zusätzlichen Wirkmecha-

Die entsprechende Abbildung
entnehmen Sie bitte der Print-Ausgabe.

Die entsprechende Abbildung
entnehmen Sie bitte der Print-Ausgabe.

**Die entsprechende Abbildung
entnehmen Sie bitte der Print-Ausgabe.**

nismus [14]. Weitere, vor allem humanpharmakologische Untersuchungen sollten zur Aufklärung des Wirkmechanismus sowie zu den Einsatzmöglichkeiten von iCR bei pathologisch gestörtem Knochenstoffwechsel beitragen.

Schlußfolgerung

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, daß ein isopropanolischer Extrakt der Traubensilberkerze die Bildung von OPG in Osteoblasten auf verschiedenen Ebenen moduliert, was zur Hemmung des Knochenabbaues durch Osteoklasten beitragen könnte. Da die Bildung von OPG gleichzeitig mit der Reifung der Osteoblasten assoziiert ist, könnte unsere Beobachtung mit der durch iCR gesteigerten Differenzierung von Osteoblasten in Zusammenhang stehen [6].

Literatur:

1. Cheung AM, Feig DS, Kapral M, Diaz-Granados N, Dodin S, and the Canadian Task Force on Preventive Health Care. Prevention of osteoporosis and osteoporotic fractures in postmenopausal women: Recommendation statement from the Canadian Task Force on Preventive Health Care. *Can Med Assoc J* 2004; 170: 1665–7.
2. Viereck V, Emons G, Wuttke W. Black cohosh – just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 214–21.
3. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y-X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165–76.
4. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: Potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999; 140: 4382–9.
5. Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002; 84: 725–35.
6. Viereck V, Gründker C, Friess S, Frosch K-H, Raddatz D, Schoppet M, Nißlein T, Emons G, Hofbauer LC. Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 2036–43.
7. Nißlein T, Freudenstein J. Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2003; 21: 370–6.
8. Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W. Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: Bone, fat and uterus. *Maturitas* 2003; 44: S39–S50.
9. Wuttke W, Seidlová-Wuttke D, Gorkow C. The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: Effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 2003; 44: S67–S77.
10. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4367–70.
11. Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Niederckle B, Siggelkow H, Frosch KH, Raddatz D, Emons G, Hofbauer LC. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4206–13.
12. 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.
13. Hostanska K, Nißlein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R. Evaluation of cell death caused by triterpene glycosides and phenolic substances from *Cimicifuga racemosa* extract in human MCF-7 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 1970–75.
14. Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR, Bolton JL. Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 5661–70.

PD Dr. med. Volker Viereck

Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe. Habilitation 2004; Oberarzt der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Georg-August-Universität Göttingen bis 2005.

Wissenschaftliche Schwerpunkte: Zellbiologische Aspekte der postmenopausalen Osteoporose, Endokrinologie, Urogynäkologie und plastische Beckenbodenrekonstruktion.

Seit 2005 Leitender Arzt der Frauenklinik, Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz.



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