

JOURNAL FÜR MENOPAUSE

SEEGER H, MUECK AO

*Wirkungen von Estradiol, Tamoxifen und 2-Methoxyestradiol auf
TNF-alpha-induzierte Veränderungen von Markern für Tumorwachstum
und Tumorinvasion von Brustkrebszellen*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Deutschland)
15-17*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1-2) (Ausgabe für Österreich)
16-18*

Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Schweiz), 12-14

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



Wirkungen von Estradiol, Tamoxifen und 2-Methoxyestradiol auf TNF- α -induzierte Veränderungen von Markern für Tumorwachstum und Tumorinvasion von Brustkrebszellen

H. Seeger, A. O. Mueck

Fragestellung: Tumorassoziierte Makrophagen setzen eine Reihe von Botenstoffen frei, die zum Wachstum und zur Invasion von Tumoren beitragen können, wie z. B. TNF- α . Dieses Chemokin induziert z. B. die Synthese von MCP-1, VEGF und MMPs, Stoffe, die die extrazelluläre Matrix umbauen bzw. die Bildung von neuen Blutgefäßen unterstützen können.

Methodik: Für die Zellkulturen wurde die MCF-7-Zell-Linie verwendet. Zunächst wurden Veränderungen von TNF- α und Estradiol (E2) allein und in Kombination auf die Marker MCP-1, VEGF und MMP-9 untersucht. Anschließend wurde die Wirkung von 4-Hydroxytamoxifen (4HT) und 2-Methoxyestradiol (ME) in den Konzentrationen 1 und 10 μ M in Gegenwart von TNF allein und in Kombination mit Estradiol getestet. Die Marker wurden im Zellüberstand mittels ELISA gemessen.

Ergebnisse: TNF bewirkte eine 3–4fache Erhöhung von MCP-1 gegenüber dem Kontrollwert, MMP-9 und VEGF wurden um 30 bzw. 40 % erhöht. E2 allein hatte keinen Effekt auf MCP-1, reduzierte leicht die Synthese von MMP-9 und erhöhte die Synthese von VEGF um 20 %. In Kombination mit TNF war durch E2 eine weitere Stimulierung von MCP-1 und VEGF zu verzeichnen, wohingegen die MMP-9-Synthese gegenüber dem Wert von TNF allein nicht verändert war. 4HT und ME beeinflussten die estradiolinduzierten Veränderungen in unterschiedlicher Weise.

Schlußfolgerung: Unsere Untersuchungen zeigen, daß Estradiol im Vergleich zu bestimmten Chemokinen wie TNF- α nur eine marginale Wirkung auf Tumorwachstum und Tumorinvasion ausübt. Dies weist darauf hin, daß ein unter Estrogentherapie in einigen epidemiologischen Studien beobachtetes erhöhtes Brustkrebsrisiko weniger auf die Estrogene zurückzuführen sein könnte, als vielmehr auf die Präsenz von tumorassoziierten Makrophagen und deren Fähigkeit, bestimmte Chemokine zu synthetisieren.

Schlüsselwörter: TNF- α , Estradiol, Tamoxifen, 2-Methoxyestradiol, humane Brustkrebszellen, Wachstum, Invasion

Effects of Estradiol, Tamoxifen and 2-Methoxyestradiol on TNF- α Induced Changes of Biochemical Markers for Growth and Invasion of Human Breast Cancer Cells. *Objectives:* Tumor-associated macrophages secrete chemokines such as TNF- α , which stimulate the synthesis of biochemical markers in tumor cells that facilitate tumor growth and spreading.

Methods: MCF-7 cells were used for the experiments. Estradiol (E2) was tested alone and in combination with TNF- α at a concentration of 0.1 nM, the antiestrogens 4-hydroxytamoxifen (4HT) and 2-methoxyestradiol (ME) were tested alone and in combination with E2 at 1 and 10 μ M, the incubation time was 96 h. The biochemical markers, monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured by ELISA in the cell supernatants.

Results: TNF- α elicited a 3–4 fold increase of MCP-1 as compared to the control value, MMP-9 and VEGF were enhanced by 30 to 40 %. E2 alone had no effect on MCP-1, slightly reduced the synthesis of MMP-9 and increased VEGF concentrations by about 20 %. In combination with TNF, E2 induced a further stimulation of MCP-1 and VEGF, whereby the MMP-9 synthesis was not changed. 4HT and ME differently reduced the E2-induced changes.

Conclusions: Our results suggest that estrogens may slightly increase tumor growth and spreading beyond the effect of chemokines such as TNF- α . However, the magnitude of this E2 effect seems to be marginally as compared to the effect of TNF- α alone. The risk of recurrence of breast cancer in patients taking hormone therapy after breast cancer may be slightly enhanced by estrogens, but seems mainly to be driven by the potency of still existing tumor cells to secrete chemokines which can stimulate tumor growth and spreading. *J Menopause* 2006; 13 (1): 15–7.

Key words: TNF- α , estradiol, tamoxifen, 2-methoxyestradiol, human breast cancer cells, growth, invasion

Estrogene sind ein wichtiger Wachstumsfaktor für normale Brustepithelzellen. Durch ihre hohe mitogene Aktivität sind Estrogene aber vermutlich auch an der Brustkrebsentwicklung beteiligt. Inwieweit allerdings Tumorwachstum und Invasion durch Estrogene negativ beeinflusst werden kann, ist im Moment noch unklar.

Tumorinvasion und Metastasierung werden hauptsächlich durch den Abbau der extrazellulären Matrix und der Bildung neuer Blutgefäße vorangetrieben [1]. Verschiedene biochemische Substanzen wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Chemokine wie MCP-1 sind daran beteiligt. Die Bildung dieser Faktoren wird wiederum durch aktivierte Makrophagen, die sich in der Umgebung des Tumors befinden, beeinflusst. Hier sind vor allem Chemokine zu nennen, die durch diese Makrophagen freigesetzt werden, wie z. B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).

In der vorliegenden Zellkultur-Studie haben wir die Wirkung von Estradiol auf die TNF- α -induzierte Synthese von MCP-1, MMP-9 und VEGF untersucht. Weiterhin wurden zwei antiestrogene Substanzen, 2-Methoxyestradiol und Tamoxifen, in die Untersuchungen mit eingeschlossen.

Material und Methoden

17 β -Estradiol (E2) und 2-Methoxyestradiol (ME) wurden von Steraloids, USA, bezogen. TNF- α und 4-Hydroxytamoxifen (4HT), ein aktiver Metabolit von Tamoxifen, wurden von Sigma Chemical, USA, bezogen. Die Testsubstanzen wurden in Ethanol gelöst und anschließend mit einem Ethanol/Puffer-Gemisch auf die entsprechenden Testkonzentrationen verdünnt.

MCF-7, eine humane estrogenrezeptorpositive Brustkrebszell-Linie, wurde für die Experimente verwendet. Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) unter Zusatz von 5 % (v/v) Kälberserum, 0,3 mg/ml Glutamin, 5 ng/ml Rinderinsulin und 100 U/ml Penicillin plus 100 μ g/ml Streptomycin kultiviert.

Für die Experimente wurden ca. 50.000 Zellen in 24er-Platten ausgesät und für zwei Tage mit estrogenfreiem Me-

Aus der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Schwerpunkt für Endokrinologie und Menopause

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Dr. Alfred O. Mueck, Schwerpunkt für Endokrinologie und Menopause der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, D-72076 Tübingen, Calwerstraße 7;
E-Mail: endo.meno@med.uni-tuebingen.de

dium behandelt. Anschließend wurden die Testsubstanzen zusammen mit TNF- α (10 ng/ml) hinzugefügt und für weitere vier Tage inkubiert. Die Konzentration für Estradiol war 1 pM und für die Antiöstrogene 1 und 10 μ M.

MCP-1, VEGF-Protein und MMP-9 wurden direkt im Zellüberstand mittels Enzymimmunoassay gemessen (R&D Systems).

Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA für die logarithmierten Werte durchgeführt, gefolgt von einem Dunnett's Test. Triplikate aus drei unabhängigen Experimenten wurden dabei verwendet. Der α -Wert lag bei 0,05.

Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse der Wirkung von TNF- α allein auf die Marker MCP-1, MMP-9 und VEGF im Vergleich zu den Kontrollwerten. Alle Marker außer VEGF wurden in MCF-7-Zellen in geringen Mengen konstitutiv synthetisiert. TNF- α stimulierte die Expression von MCP-1 3–4-fach und erhöhte die Konzentrationen von MMP-9 und VEGF um 30 bzw. 50. Estradiol ohne TNF- α zeigte keinen Effekt auf die MCP-1-Werte und reduzierte signifikant die MMP-9-Konzentrationen, erhöhte aber die Konzentrationen von VEGF.

Abbildung 2 zeigt, daß E2 in Kombination mit TNF- α die MCP-1-Synthese signifikant um 20 % gegenüber dem Kontrollwert (TNF- α allein) erhöhte. ME und 4HT bewirkten in Kombination mit E2 eine signifikante Reduktion der E2-induzierten Stimulation.

E2 in Kombination mit TNF- α verursachte einen Anstieg von MMP-9 um ca. 20 %. Für ME konnte in Kombination mit E2 eine Reduktion um ca. 10–15 % beobachtet werden, für 4HT eine Hemmung von ca. 40–60 %.

Die VEGF-Konzentrationen wurden durch E2, kombiniert mit TNF- α , signifikant um 50 % erhöht im Vergleich zu TNF- α allein (= Kontrolle). In Kombination mit E2 wurden für ME signifikante Hemmungen gefunden in der Größenordnung von 15–25 %. 4HT zeigte in Kombination mit E2 Reduktionen im Bereich von 40–50 % im Vergleich zu E2 allein.

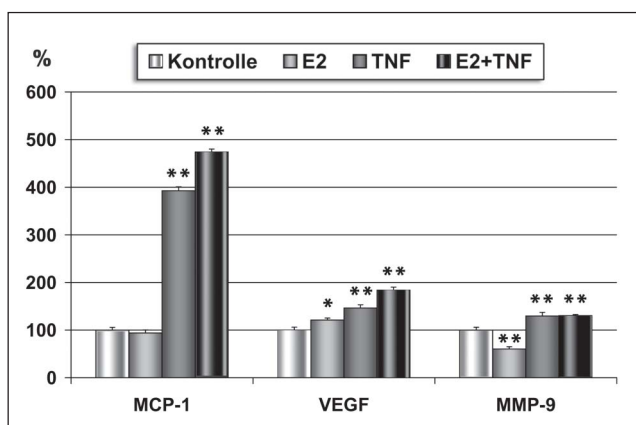


Abbildung 1: Prozentuale Veränderungen von MCP-1-, VEGF- und MMP-9-Konzentrationen in MCF-7-Zellen gegenüber dem Kontrollwert = 100 % nach Zugabe von TNF- α , Estradiol (E2) bzw. TNF- α plus E2. (Mittelwerte \pm SD, Triplikate aus 3 verschiedenen Experimenten). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle. MCP-1: Monocyte-chemoattracting Protein-1; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; MMP-9: Matrix-Metallo-Proteinase-9.

Diskussion

Im kombinierten Arm der Women's-Health-Initiative- (WHI)-Studie war die Metastasierung in den proximalen Lymphknoten in der Verumgruppe höher als in der Placebogruppe, die Tumorgöße war jedoch nicht unterschiedlich [2]. Demgegenüber fanden sich in Beobachtungsstudien keine Unterschiede hinsichtlich einer Metastasierung, es wurde sogar eine bessere Prognose bei Frauen unter Hormonbehandlung festgestellt [3]. Die Diskussion über eine Hormontherapie nach Brustkrebs und eine mögliche erhöhte Rezidivrate wird durch die kontroversen Daten zweier neuerer Studien zusätzlich angeheizt [4, 5].

Tumorassoziierte Makrophagen sezernieren verschiedene aktive Substanzen wie TNF- α , die *in vitro* die Tumorinvasivität erhöhen können [6]. Die Überexpression von TNF- α erhöhte die metastatische Aktivität von Tumorzell-Linien [7], und die Behandlung von Mäusen mit TNF- α resultierte in der Entwicklung von Lebermetastasen [8].

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, daß TNF- α die Synthese von verschiedenen Faktoren wie MCP-1, VEGF und MMP-9, welche beim Tumorwachstum und der Tumordinvasion beteiligt sind, in MCF-7-Zellen erhöhen kann. TNF- α bewirkte eine starke Stimulation der Synthese von MCP-1 und erhöhte die VEGF- und MMP-9-Konzentrationen um 50 bzw. 30 % in den MCF-7-Zellen.

Estradiol war teilweise in der Lage, die TNF- α -induzierten Veränderungen zu verstärken, wobei diese Effekte allerdings eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen gegenüber dem starken Effekt von TNF- α alleine. Die antiöstrogenen Substanzen Tamoxifen und 2-Methoxyestradiol konnten teilweise die zusätzlichen Effekte von Estradiol hemmen. 4-Hydroxytamoxifen war dabei stärker wirksam als 2-Methoxyestradiol, vermutlich aufgrund der höheren Rezeptoraffinität.

2-Methoxyestradiol ist ein endogener Estradiolmetabolit, der potente antiproliferative und antiangiogene Eigenschaften in verschiedenen Zell-Linien wie humane Brustkrebszellen, humane Ovarialkrebszellen und humane Endothelialzellen aufweist [9–11]. Dabei wurden unterschiedliche Wirkmechanismen festgestellt, wobei die mei-

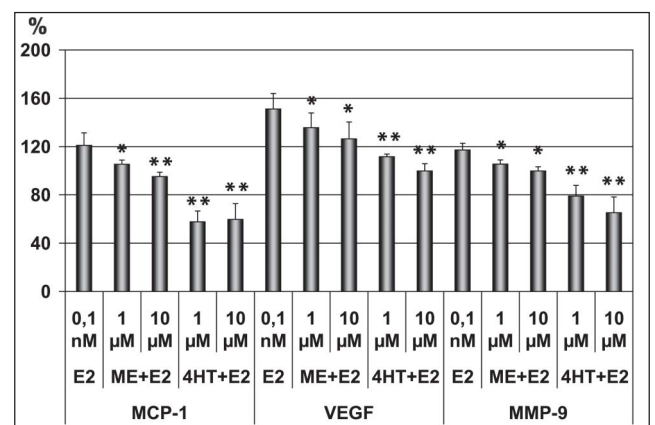


Abbildung 2: Prozentuale Veränderungen von MCP-1-, VEGF- und MMP-9-Konzentrationen in MCF-7-Zellen gegenüber dem Kontrollwert = 100 % nach Zugabe von Estradiol (E2) plus TNF- α und 4-Hydroxytamoxifen (4HT) bzw. 2-Methoxyestradiol (ME) kombiniert mit E2 plus TNF- α . (Mittelwerte \pm SD, Triplikate aus 3 verschiedenen Experimenten). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. E2.

sten allerdings estrogenrezeptorunabhängig sind [12]. Dieser Metabolit wird derzeit in klinischen Studien bei postmenopausalen Frauen mit refraktärem metastasierendem Brustkrebs untersucht [12].

Unsere Ergebnisse zeigen, daß das Chemokin TNF- α Tumorwachstum und -invasion stark beeinflussen kann. Estradiol hatte teilweise einen leicht verstärkenden Einfluß, allerdings waren diese Effekte eher marginal gegenüber dem Effekt von TNF- α alleine. Dies weist daraufhin, daß ein unter Estrogentherapie in einigen epidemiologischen Studien beobachtetes erhöhtes Brustkrebsrisiko weniger auf die Estrogene zurückzuführen sein könnte, als vielmehr auf die Präsenz von tumorassoziierten Makrophagen und deren Fähigkeit, bestimmte Chemokine zu synthetisieren.

Literatur:

1. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054s–9s.
2. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 2002; 288: 321–33.
3. Nanda K, Bastian LA, Schultz K. Hormone replacement therapy and the risk of death from breast cancer: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 325–34.
4. Holmberg L, Anderson H. HABITS steering and data monitoring committees; HABITS (hormonal replacement therapy after breast cancer – is it safe?), a randomised comparison: trial stopped. *Lancet* 2004; 363: 453–5.
5. Von Schoultz E, Rutqvist LE; Stockholm Breast Cancer Study Group. Menopausal hormone therapy after breast cancer: the Stockholm randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 533–5.
6. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1543–9.
7. Malik STA, Naylor S, East N, Olliff A, Balkwill FR. Cells secreting tumor necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur J Cancer* 1990; 26: 1031–4.
8. Orosz P, Kruger A, Hubbe M, Ruschoff J, Von Hoegen P, Mannel DN. Promotion of experimental liver metastasis by tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 1995; 60: 867–71.
9. Lippert C, Seeger H, Mueck AO, Lippert TH. The effects of A-ring and D-ring metabolites of estradiol on the proliferation of vascular endothelial cells. *Life Sci* 2000; 67: 1653–8.
10. Mueck AO, Seeger H, Huober J. Chemotherapy of breast cancer – additive anticancerogenic effect by 2-methoxyestradiol? *Life Sci* 2004; 75: 1205–10.
11. Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D, Huober J. Is the combination with 2-Methoxy-Estradiol able to reduce the dosages of chemotherapeutics in treatment on human ovary cancer? *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 699–701.
12. Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD. 2-Methoxyestradiol, a promising anticancer agent. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 165–72.

Privatdozent Dr. rer. nat. Diplom-Chemiker Harald Seeger

Geboren 1953 in Stuttgart. Studium der Chemie an der Universität Tübingen. Seit 1986 wissenschaftlicher Angestellter in der Sektion für Klinische Pharmakologie in Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Seit 1999 wissenschaftlicher Angestellter im Schwerpunkt für Endokrinologie und Menopause der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Habilitation und Venia legendi 2001 für das Fach „Experimentelle gynäkologische Endokrinologie“ an der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (Thema: Untersuchungen über den endogenen Estradiolmetabolismus und dessen Einfluß auf das Gefäßsystem). Wissenschaftliche Themenschwerpunkte: Grundlagenforschungen über direkte Gefäßwirkungen von Sexualsteroiden und Statin-Hormon-Kombinationen, Estrogene und Karzinogenese sowie Estradiolmetabolismus. Über 100 Publikationen in Fachjournalen.



Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD 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](#)