

JOURNAL FÜR MENOPAUSE

NISSLEIN T, FREUDENSTEIN J, SALLER R, HOSTANSKA K
*Apoptoseinduktion durch Triterpenglykoside und Zimtsäureester
aus einem Extrakt von Actaea racemosa in menschlichen
Brustkrebszellen*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Deutschland)
24-26*

*Journal für Menopause 2006; 13 (1-2) (Ausgabe für Österreich)
13-15*

Journal für Menopause 2006; 13 (1) (Ausgabe für Schweiz), 8-11

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



Apoptoseinduktion durch Triterpenglykoside und Zimtsäureester aus einem Extrakt von *Actaea racemosa* in menschlichen Brustkrebszellen

Th. Nißlein¹, J. Freudenstein¹, R. Saller², K. Hostanska²

In einer Vielzahl von Publikationen wurde vom antiproliferativen Effekt eines isopropanolischen Extraktes (iCR) aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze auf die menschliche, estrogenabhängige Brustkrebszelllinie MCF-7 berichtet. Diese Proliferationshemmung ist auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen und hier sollte nun untersucht werden, inwieweit die beiden Hauptfraktionen aus iCR, die Triterpenglykoside (TTG) und die Zimtsäureester (CAE), an diesem Effekt beteiligt sind. Die antiproliferative Wirkung wurde mittels des enzymbasierten WST-1-Assays, die Apoptose anhand von Lichtstreuverhalten und der Bindung von Annexin V an (apoptosetypische) Phosphatidylserinreste in MCF-7-Zellen quantifiziert.

Eine 72stündige iCR-Behandlung führte zu einer dosisabhängig reduzierten Zellproliferation, mit einer IC_{50} von 55,3 µg/ml Trockenrückstand, d. h. theoretisch 19,3 µg/ml TTG oder 2,7 µg/ml CAE. Die proliferationsinhibierende IC_{50} für TTG lag bei 59,3 µg/ml und für CAE bei 26,1 µg/ml. Apoptose wurde durch TTG ab einer Konzentration von 25 µg/ml verursacht und durch CAE ab einer Konzentration von 5 µg/ml. Somit zeigte diese Studie erstmals, daß TTG und CAE die Proliferation estrogenabhängiger Brustkrebszellen über Apoptoseinduktion hemmen. Zwar erschienen die Zimtsäureester als die wirksamere der beiden Fraktionen, jedoch kommt den TTG durch ihre deutlich höheren Gehalte vermutlich eine zumindest ebenso große Bedeutung zu.

Schlüsselwörter: Apoptose, Traubensilberkerze, *Actaea/Cimicifuga racemosa*, Brustkrebszelllinie, Triterpenglykoside, Zimtsäureester

Induction of Apoptosis by Triterpene Glycosides and Cinnamic Acid Esters from an Isopropanolic Extract of Black Cohosh in Human MCF-7 Breast Cancer Cells. An isopropanolic-aqueous extract of black cohosh (iCR) exerts antiproliferative effects on estrogen-receptor positive human breast cancer cells MCF-7 via the induction of apoptosis. Here we tested whether apoptosis induction is attributable to one of the two major fractions of iCR, the triterpene glycosides (TTG) or the cinnamic acid esters (CAE). The antiproliferative activity of TTG and CAE on MCF-7 cells were investigated by WST-1 assay. Apoptosis was detected and quantified by flow cytometry using light scatter characteristics and Annexin V binding.

72 h iCR treatment induced a dose-dependent down regulation of cell proliferation with an IC_{50} of 55.3 µg/ml dry residue which corresponds to 19.3 µg/ml TTG and 2.7 µg/ml CAE. Both, isolated TTG and CAE fractions inhibited cell growth, the IC_{50} being 59.3 µg/ml and 26.1 µg/ml, respectively. Interestingly, whereas IC_{50} and apoptosis induction correspond well for the whole extract, TTG and CAE fractions induced apoptosis at concentrations (25 and 5 µg/ml) well below those required for significant growth inhibition. Observations in this study firstly showed that TTG and CAE compounds significantly contribute to iCR's apoptotic effect. Even though CAE is the more potent inhibitor of proliferation and apoptosis inducer, TTG – due to its quantitative predominance – is at least as important as the former for iCR's net effect. **J Menopause 2006; 13 (1): 24–6.**

Key words: apoptosis, black cohosh, breast cancer cell, triterpene glycoside, cinnamic acid ester

Ein isopropanolischer Extrakt aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (iCR) (*Actaea*, syn. *Cimicifuga racemosa* [L.] Nutt., Remifemin®) dient seit langem als Phytotherapeutikum zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden [1]. iCR reduziert das Wachstum menschlicher Brustkrebszellen sowohl in der estrogenabhängigen Linie MCF-7 als auch in der estrogenunabhängigen Linie MDA-MB231 [2, 3]. iCR ist ein komplexes Vielstoffgemisch, welches eine Reihe verschiedener pharmakologisch aktiver Inhaltsstoffe enthält. Die beiden Hauptgruppen sind Triterpenglykoside (TTG, z. B. Actein, 26-Deoxyactein, Cimigenol, Cimircemosid) sowie Zimtsäureester (CAE, z. B. Fukinolensäure, Cimicifugensäuren A-H) [4, 5]. Es konnte gezeigt werden, daß die Proliferationshemmung, die iCR in Brustkrebszellen verursacht, auf die Induktion von Apoptose, d. h. programmierten Zelltod, zurückzuführen ist [3]. Darauf aufbauend sollte in unserer Studie in ER+ MCF-7-Zellen untersucht werden, inwieweit die beiden iCR-Hauptfraktionen, TTG und CAE, an der Apoptoseinduktion beteiligt sind.

Material und Methoden

TTG und CAE wurden durch chromatographische Trennung aus iCR (Trockensubstanzgehalt 77,4 mg/ml) gewonnen und in Ethanol 60 % (v/v) gelöst. Die Konzentration von TTG betrug 27 mg/ml, der Gehalt von CAE 3,7 mg/ml. Tamoxifencitrat (TAM) und Cyclophosphamid (CPA) wur-

den in den Proliferationsassays als Kontrollsubstanzen verwendet. WST-1 zur Überprüfung der Zellproliferation wurde von Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz) bezogen.

Die Assays auf Zytotoxizität und Apoptose wurden in phenolrotfreiem DMEM, mit 5 % „estrogenfreiem“ Kälberserum (CCS, Sigma) und Antibiotika durchgeführt. Zellen, die für 24 h in diesem Testmedium zur Entfernung rest-estrogenener Aktivität vorinkubiert worden waren, wurden bei einer Dichte von 3000 bzw. 20.000/well für 72 h mit den Testsubstanzen inkubiert.

Proliferation oder Zelltod wurden mittels Kristallviolett-färbung (CV; colorimetrische Bestimmung der Zellzahl) oder WST-1-Assay (Umwandlung des Tetrazoliumsalses WST-1 zu Formazan durch metabolisch aktive Zellen) bestimmt. TAM (50 µM) diente als Positivkontrolle, Testmedium als Negativkontrolle; das direkte/intrinsische reduktive Potential der Testsubstanzen wurde im zellfreien System getestet.

Früh-Apoptose wurde mittels Annexin-V-FITC-Färbung (Roche Diagnostics) detektiert. Zellgröße und Granularität dienten als Hilfsparameter. Die Durchlässigkeit der Plasmamembran wurde mittels Propidiumjodid-Färbung (PI) als Indiz für Nekrose gewertet. Alle Versuche wurden mindestens 3x durchgeführt und im FACScalibur Durchflußzytometer (B-D, Mountain View, CA) ausgewertet. Der zweiseitige t-Test mit einem Signifikanzlevel von $\leq 0,05$ wurde zur Überprüfung der statistischen Signifikanz herangezogen. IC_{50} -Werte wurden mittels linearer oder exponentieller Regressionsanalyse in MS Excel errechnet. Der Vergleich zweier Histogramme wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (two samples test for overlaid histograms) ausgewertet.

¹Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Salzgitter, Deutschland, und
²Universitätsspital Zürich, Abteilung für Innere Medizin, Zürich, Schweiz

Korrespondenzadresse: Dr. Katarina Hostanska, Universitätsspital Zürich, Innere Medizin – Naturheilkunde, CH-8091 Zürich, Rämistraße 100; E-Mail: katarina.hostanska@hotmail.com

Ergebnisse

Eine 72-h-Inkubation von MCF-7-Zellen mit 50 μM TAM reduzierte die Proliferation um 79 %. TTG (10–100 $\mu\text{g/ml}$) führte zu einer starken, dosisabhängigen Inhibierung der Zellproliferation, die gut mit dem mikroskopischen Zustand der Zellen übereinstimmte. Die IC_{50} für TTG betrug $59,3 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$.

Eine Behandlung der Zellen mit CAE (5–50 $\mu\text{g/ml}$) führte zu Schrumpfung und Ablösung der Zellen, ohne daß im WST-1-Assay zytotoxische Effekte zu sehen waren. Erst die CV-Färbung wies eine dosisabhängig reduzierte Zellzahl nach (IC_{50} : $26,1 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$). Zur Vergleichbarkeit mit den WST-1- IC_{50} wurden die iCR- und TTG-Testreihen mittels CV-Färbung erneut bewertet. Verglichen mit der CV-Färbung erwies sich der WST-1-Assay als sensitiver (Abbildung 1).

Um den Anteil von TTG und CAE an der durch iCR in MCF-7-Zellen induzierten Apoptose zu ermitteln, wurden die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin (PS) und die intrazelluläre Aufnahme von PI quantifiziert. In Zwei-Parameter-Histogrammen zeigte sich die geringere Größe und erhöhte Granularität von TTG-, CAE- und iCR-behandelten MCF-7-Zellen. Diese morphologischen Veränderungen frühapoptotischer Zellen wurden durch die Bindung von Annexin V – FITC bestätigt. Diese war nach Behandlung mit 25 $\mu\text{g/ml}$ TTG [3,2 % vs. 68,5 %] oder 5 $\mu\text{g/ml}$ CAE [3,2 % vs. 74,1 %] signifikant erhöht (Tabelle 1). Die PI-Positivität von MCF-7-Zellen war nach 72 h 25 $\mu\text{g/ml}$ TTG (30,7 %) bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ TTG (33,4 %), verglichen mit unbehandelten Kontrollen (25,4 %), nicht signifikant verändert. Mit steigenden CAE-Konzentrationen nahmen die PS-exprimierenden Zellen nicht zu, wogegen eine Zunahme der PI-positiven Zellen (28,7, 40,7 bzw. 48,6 % bei Konzentrationen von 5, 10 bzw. 25 $\mu\text{g/ml}$) zu beobachten war. Die Anzahl der permeablen Zellen war bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ CAE, verglichen mit Kontrollzellen, fast verdoppelt (48,6 % vs. 25,4 %). Die ebenfalls erhöhte PI-Aufnahme zeigte jedoch, daß es sich hier um spätapoptotische oder nekrotische Zellen handelte (Tabelle 1).

Diskussion

Pflanzenextrakte wie iCR stellen ein Vielstoffgemisch mit einer Reihe pharmakologisch aktiver Substanzen dar. Die pharmakologischen Eigenschaften der Traubensilberkerze werden charakterisiert durch die (schwache) Bindung an Estrogenrezeptoren und die dosisabhängige Hemmung der Proliferation humaner Brustkrebszellen [6]. Apoptoseinduktion und Zellzyklusabbruch in der G1- und G2/M-Phase wurden kürzlich für letzteres verantwortlich gemacht [3, 7]. Untersuchungen an den beiden iCR-Hauptinhaltsstoffgruppen, TTG und CAE, zeigen, daß MCF-7-Zellen ca. 4x empfindlicher auf CAE (13,0 $\mu\text{g/ml}$) als auf TTG (55,9 $\mu\text{g/ml}$) reagieren. TTG (25 $\mu\text{g/ml}$) und CAE (5 $\mu\text{g/ml}$) steigerten den Anteil apoptotischer Zellen auf ca. 70 %, wobei CAE schon in geringeren Dosierungen fortgeschrittene Apoptosestadien induziert. Bereits bei Substanzkonzentrationen, die in vitro noch keine Zellzahlreduktion bewirken, ist die Apoptoseinduktion nachweisbar. Neben eventuell estrogenrezeptorvermittelten Wirkungen sprechen weitere präklinische Befunde auch für dopaminerge und serotoninerge Effekte als zusätzlichen Wirkmechanismus [8]. Weitere, vor allem humanpharmakologische Untersuchungen sollten nun zur Aufklärung des Wirkmechanismus sowie zu den Einsatzmöglichkeiten von iCR bei Risikopatienten mit z. B. hormonabhängigen Tumorerkrankungen beitragen.

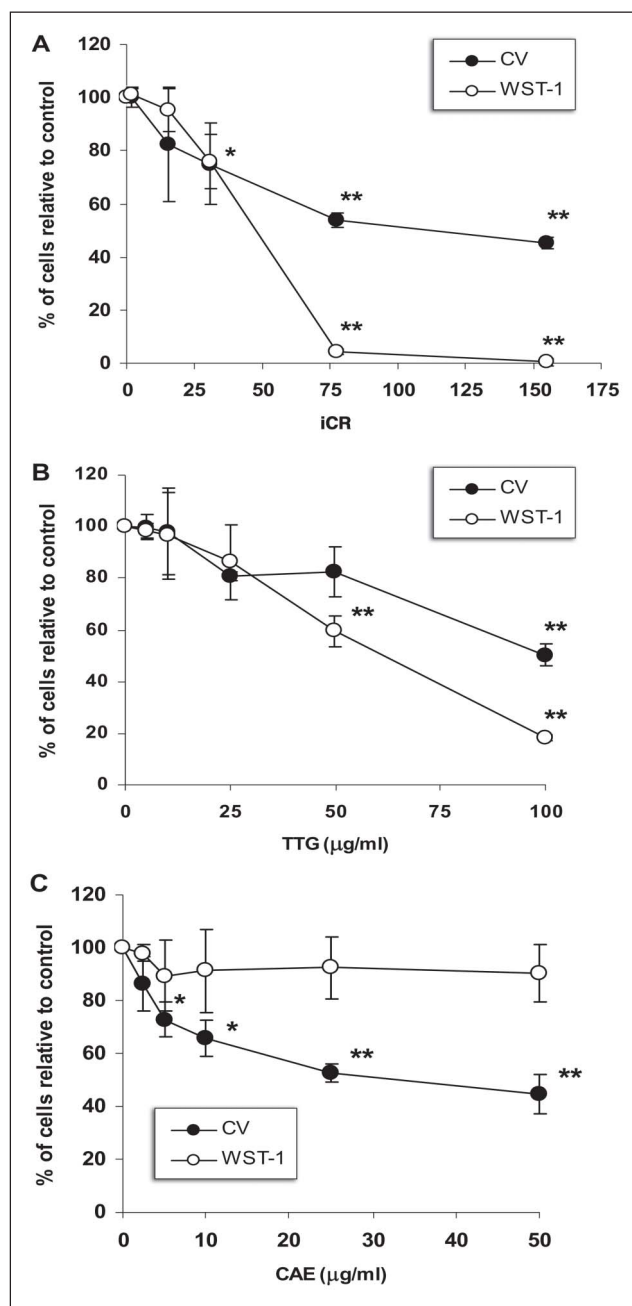


Abbildung 1 A–C: Hemmung des Zellwachstums humaner Brustkrebszellen durch iCR (A), TTG (B) und CAE (C), bestimmt durch WST-1-Spaltung (WST-1) bzw. Kristallviolett-Färbung (CV) (Published with permission of the Pharmaceutical Society of Japan). iCR: isopropanolischer Extrakt aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (*Actaea, syn. Cimicifuga racemosa*); TTG: Triterpenglykoside; CAE: Zimtsäureester; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Tabelle 1: Durchflußzytometrische Analyse von morphologischen Veränderungen und der gesteigerten Expression von Phosphatidylserin (PS) als Zeichen von Apoptose. PI: Propidiumjodid-Färbung

Testsubstanz	Gefärbte Zellen (%)	
	PI	Annexin V – FITC
Unbehandelte Kontrollen	25,4	3,2
5 $\mu\text{g/ml}$ CAE	28,7	74,1
10 $\mu\text{g/ml}$ CAE	40,7	70,5
25 $\mu\text{g/ml}$ CAE	48,6	68,9
25 $\mu\text{g/ml}$ TTG	30,7	68,5
50 $\mu\text{g/ml}$ TTG	33,4	77,5
77,4 $\mu\text{g/ml}$ TTG	35,9	48,2

Schlußfolgerungen

Unsere Studie zeigte erstmals, daß die beiden Hauptinhaltsstoffgruppen von iCR, TTG und CAE, unabhängig voneinander die Proliferation estrogenabhängiger Brustkrebszellen hemmen und daß die Induktion von Apoptose ein hierbei zugrundeliegender Mechanismus ist. Sowohl was die Hemmung der Zellproliferation als auch was die Induktion von Apoptose angeht, stellten sich die Zimtsäureester (CAE) als die wirksamere der beiden Fraktionen heraus. Unter Berücksichtigung der deutlich höheren Gehalte an TTG im Gesamtextrakt kommt diesen aber vermutlich eine zumindest ebenso große Bedeutung zu. Die hohe Sensitivität gegen TTG und v. a. CAE der minimal invasiven, p53-Wildtyp-positiven und Caspase-3-defizienten MCF-7-Linie, die vergleichsweise resistent gegen andere Chemotherapeutika ist [9], empfiehlt weitere Studien mit diesen Substanzgruppen bei Patienten mit therapieresistenten malignen Erkrankungen.

Literatur:

1. Liske E, Hänggi W, Henneicke von Zepelin HH, Boblitz N, Wüstenberg P, Rahlfs VW. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* rhizoma): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *J Womens Health Gend Based Med* 2002; 11: 163–74.
2. Bodinet C, Freudenstein J. Influence of *Cimicifuga racemosa* on the proliferation of estrogen receptor positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 76: 1–10.
3. 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.
4. Chen SN, Li W, Fabricant DS, Santarsiero BD, Mesecar A, Fitzloff JF, Fong HH, Farnsworth NR. Isolation, structure elucidation, and absolute configuration of 26-deoxyactein from *Cimicifuga racemosa* and clarification of nomenclature associated with 27-deoxyactein. *J Nat Prod* 2002; 65: 601–5.
5. Li W, Sun Y, Liang W, Fitzloff JF, Van Breemen RB. Identification of caffeic acid derivatives in *Actaea racemosa* (*Cimicifuga racemosa*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 978–82.
6. Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80: 125–30.
7. Einbond LS, Shimizu M, Xiao D, Nuntanakorn P, Lim JTE, Suzui M, Seter C, Pertel T, Kennelly EJ, Kronenberg F, Weinstein IB. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 83: 221–31.
8. 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.
9. Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 2001; 61: 348–54.



Dr. Katarina Hostanska

Dr. K. Hostanska, 1968 bis 1973 Studium der Chemie an der Chemisch-technologischen Fakultät der Universität Bratislava, Slowakei. Staatliche Abschlußprüfung in organischer, analytischer und physikalischer Chemie. Anschließend Promotion über Eigenschaften und Anwendung modifizierter poly-ε-Kaprolactam-Fasern. Acht Jahre Tätigkeit im Immunologielabor des Vereins für Krebsforschung in Arlesheim, Schweiz. Drei Jahre Tätigkeit in der Onkologischen Arbeitsgruppe des Kantonsspitals Basel (Leitung: Prof. Dr. med. R. Herrmann). Seit 1995 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Departement für Innere Medizin, Institut für Naturheilkunde (Leitung: Prof. Dr. med. R. Saller) am Universitätsspital Zürich. Forschungsschwerpunkte sind vor allem immunologische und klinische Untersuchungen zu Lektinen aus Mistelextrakten sowie die Aufklärung antiproliferativer und apoptoseinduzierender Effekte alkoholischer Pflanzenextrakte sowie aktiver Fraktionen und Substanzen daraus. Preisträgerin des Forschungspreises der Paul-Martini-Stiftung der Medizinisch-Pharmazeutischen Studiengesellschaft 1990, des Sir-Frank-Macfarlane-Burnet-Gedächtnispreises für klinische Tumormimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Onkologie 1991 und des Alfred-Vogel-Sonderpreises der Schweizerischen Medizinischen Gesellschaft für Phytotherapie 2002.



Dr. med. vet. Thomas Nißlein

Fachtierarzt für Virologie, 1985 bis 1991 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Staatsexamen und Approbation. Anschließend Promotion auf dem Gebiet der Tollwutforschung am Institut für Tropentierhygiene (Leitung: Prof. Dr. H. S. H. Seifert) der Georg-August-Universität in Göttingen. Vier Jahre HIV-Forschung zu Pathogenese und Impfstoffentwicklung in der Abteilung Virologie (Leitung: Prof. Dr. G. Hunsmann) des Deutschen Primatenzentrums in Göttingen. Seit 1998 Tätigkeit in der präklinischen Forschung des pharmazeutischen Unternehmens Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG in Salzgitter. Forschungsschwerpunkte sind hier vor allem Untersuchungen zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik endokriner aktiver Pflanzenextrakte sowie Modelle für osteoanabole und urodynamische Effekte komplexer Vielstoffgemische.

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](#)