

Chirurgisches Forum 2000

05

für experimentelle und klinische Forschung

117. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie
Berlin, 02.05.–06.05.2000

Herausgeber

A. Encke
Präsident des 117. Kongresses
der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

M. Rothmund
Vorsitzender der Sektion Chirurgische Forschung

W. Hartel
Generalsekretär der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Schriftleitung

H. G. Beger unter Mitarbeit von
D. Birk und L. Staib

Forum-Ausschuß:

A. Encke, Frankfurt
(Vorsitzender)
W. Hartel, Westerstetten
M. Rothmund, Marburg
K. Schönleben,
Ludwigshafen/Rh.

H. G. Beger, Ulm
(Vorsitzender des
Wissenschaftlichen Beirates)
M. H. Büchler, Bern
V. Bühren, Murnau
U. T. Hopt, Rostock
M. D. Menger, Homburg
K. Meßmer, München
E. Neugebauer, Köln
R. Rieger, Linz
L. Sunder-Plassmann, Ulm

Selektive Apoptoseinduktion in Pankreaskarzinomzelllinien durch NSC-631570

Selective induction of apoptosis in pancreatic cancer cell lines by NSC-631570

M. Ramadani, S. Gansauge, H. Braumüller, S. Schlosser, H. G. Beger und F. Gansauge

Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Chirurgie I, Universität Ulm

Einleitung

Schöllkraut wird seit mehr als 3000 Jahren in der Naturmedizin wegen seiner zytostatischen Wirkung bei verschiedenen Krebsarten und gutartigen Geschwülsten eingesetzt. Traditionell ist Schöllkraut auch in Mitteleuropa als alternatives Mittel zur Behandlung von Warzen bekannt.

NSC-631570 ist eine, bei 370 nm fluoreszierende, halbsynthetische Verbindung des Alkaloid-Derivates Chelidonin aus *Chelidonium majus*. Chelidonin gehört zur Gruppe der Benzophenanthridin-Alkaloide [1]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es NSC-631570 hinsichtlich seiner wachstumshemmenden Wirkung auf maligne Zellen zu untersuchen. Zur Abschätzung der Toxizität auf nicht entartete Zellsysteme sollten zudem Proliferationsversuche mit humanem Blut durchgeführt werden.

Methodik

Untersucht wurde die zytostatische Wirkung von NSC-631570 auf die Zelllinien Jurkat, THP-1, MIA PaCa2, BxPC3 und AsPC1. Die Zelllinien wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10% fetalem Kälberserum kultiviert. Vor der Inkubation mit NSC-631570 in den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml wurden die Zellen für 24 Stunden mit FCS-freiem Medium synchronisiert. Die Zellzyklusanalyse bei 24 und 48 Stunden Inkubation wurde bei allen Karzinomzelllinien durchgeführt. Zur Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung von NSC-631570 wurde die Zellzyklusanalyse an AsPC1-Zellen im vierstündigen Intervall bei einer Inkubation mit 10 µg/ml NSC-631570 durchgeführt. Parallel zur Zellzyklusanalyse erfolgte die Proliferationsmessung mittels BrdU-Inkorporationsassay. Zudem wurden die Mitosephasen nach Giemsa-Färbung im Phasenkontrastmikroskop bestimmt.

Desweiteren wurden von gesunden Blutspendern Blutproben mit 10 µg/ml NSC-631570 für 4 Stunden inkubiert, anschließend 72 Stunden lang mit Phytohämagglutinin (PHA) oder anti-CD3-Antikörpern stimuliert und die Blastenformation nach Propidiumiodid-Färbung bestimmt.

Tabelle 1. Zellzyklusanalyse von AsPC1 bei Inkubation mit 10 µg/ml NSC-631570

Zeitpunkt	Apoptose	G1-Phase	S-Phase	G2/M-Phase
0 h	2,33% ± 0,82%	63,73% ± 1,58%	14,19% ± 4,74%	18,24% ± 3,24%
4 h Kontrolle	2,37% ± 0,61%	61,56% ± 2,20%	17,40% ± 2,97%	17,07% ± 0,77%
4 h NSC-631570	2,59% ± 0,70%	55,60% ± 2,61% ^a	19,65% ± 3,66%	20,39% ± 0,83% ^a
8 h Kontrolle	2,55% ± 0,79%	62,22% ± 2,95%	16,44% ± 2,59%	17,38% ± 1,12%
8 h NSC-631570	3,36% ± 0,60%	48,92% ± 6,28% ^a	18,12% ± 3,05%	29,02% ± 4,65% ^a
12 h Kontrolle	2,69% ± 0,57%	60,15% ± 5,71%	19,75% ± 5,03%	16,20% ± 1,57%
12 h NSC-631570	3,67% ± 0,96%	41,29% ± 4,96% ^a	22,58% ± 3,21%	30,95% ± 2,87% ^a
16 h Kontrolle	2,72% ± 0,51%	55,58% ± 5,95%	24,66% ± 4,48%	15,76% ± 1,95%
16 h NSC-631570	5,26% ± 1,10% ^a	27,86% ± 10,6% ^a	28,88% ± 4,88%	36,18% ± 6,68% ^a
20 h Kontrolle	2,54% ± 0,74%	53,78% ± 2,64%	22,82% ± 0,95%	18,94% ± 4,48%
20 h NSC-631570	6,79% ± 2,64%	21,17% ± 7,32% ^a	24,42% ± 0,99%	45,68% ± 10,16% ^a
24 h Kontrolle	2,64% ± 0,69%	53,87% ± 1,94%	21,12% ± 1,52%	20,88% ± 4,22%
24 h NSC-631570	9,74% ± 2,57% ^a	15,89% ± 8,00% ^a	20,26% ± 0,91%	52,00% ± 10,19% ^a

Die Angaben bezeichnen die Mittelwerte ± Standardabweichung, ^asignifikant: $p < 0,05$

Ergebnisse

Unter verschiedenen Kulturbedingungen zeigte sich die Aufnahme von NSC-631570 als Kalzium-, Magnesium- und pH-unabhängig. Bei der Inkubation der Zelllinien mit den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml zeigte sich ein deutlicher G2/M-Arrest in allen Zelllinien bei 10 µg/ml (NSC-631570 vs. Kontrolle – Jurkat: 47,92% vs. 17,62%, $p < 0,01$, THP-1: 32,55% vs. 26,15%, $p < 0,05$, Mia PaCa2: 31,14% vs. 17,62%, $p < 0,01$, BxPC3: 12,17% vs. 7,72%, $p < 0,01$, AsPC1: 52,00% vs. 20,88%, $p < 0,01$). Weiter zeigte sich bei dieser Konzentration ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate (Jurkat: 33,68% vs. 6,29%, $p < 0,01$, THP-1: 33,48% vs. 9,94%, $p < 0,01$, MiaPaCa2: 31,76% vs. 20,23%, $p < 0,05$, AsPC1: 9,74% vs. 2,64%, $p < 0,05$).

Die zeitabhängige Untersuchung der Wirkung von NSC-631570 in der Konzentration von 10 µg/ml zeigte den sehr frühen Beginn der zytostatischen Wirkung auf AsPC1-Zellen in der Zellzyklusanalyse. Bereits nach 4 Stunden zeigte sich ein signifikanter Anstieg der G2/M-Phase und ein konsekutiver Rückgang der G1-Fraktion (Tabelle 1). Der prozentuale Anteil der Zellen der G2/M-Phase stieg während des Experiments bis zu einem prozentualen Anteil von 52% an. Bereits nach 8 Stunden Inkubation kam es ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der Apoptosefraktion, der nach 16 Stunden Inkubation statistische Signifikanz erreicht (Abb. 1).

Der parallel durchgeführte BrdÜ-Inkorporationsmessung zeigte eine signifikante antiproliferative Wirkung von NSC-631570 bereits bei der Konzentration von 0,1 µg/ml (Optische Dichte 0,537 vs. 0,980, $p < 0,001$). Diese signifikante Proliferationshemmung zeigte sich ebenfalls in den Dosierungen 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml (jeweils $p < 0,001$).

Der Grund für den in der Zellzyklusanalyse gezeigten G2/M-Arrest unter Inkubation mit NSC-631570 zeigte sich in der Mitosephasenanalyse nach Giemsa-Färbung. Bereits nach 4 Stunden kam es zu einem signifikanten Ansteigen der Zellen in der Metaphase und nach 8 Stunden ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der Prophase (Tabelle 2). Nach 20 Stunden zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Abfall der Zellen in der Anaphase.

Interessanterweise war die Apoptoserate bei der Stimulation von Vollblut mit einer Konzentration von 10 µg/ml NSC-631570 im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinträchtigt. Die

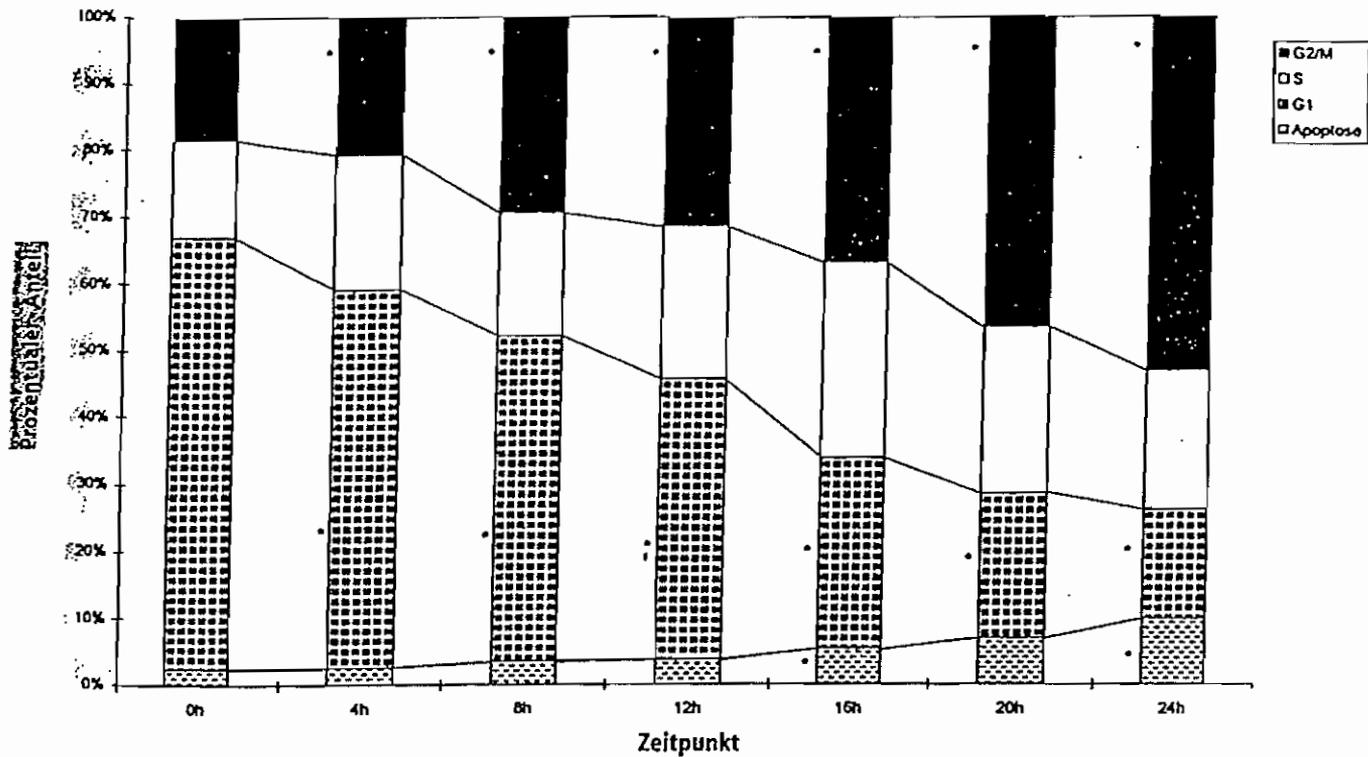


Abb. 1. Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen von AsPC1-Zellen bei Inkubation mit 10 µg/ml NSC-631570 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. *: $p < 0,05$

Tabelle 2. Mitosephasenanalyse von AsPC1 bei Inkubation mit 10 µg/ml NSC-631570

Zeitpunkt	Prophase	Metaphase	Anaphase
0h	1,57% ± 1,16%	0,64% ± 0,60%	0,29% ± 0,34%
4h Kontrolle	1,95% ± 0,95%	0,67% ± 0,42%	0,09% ± 0,17%
4h NSC-631570	3,50% ± 1,95%	1,22% ± 0,54% ^a	0,15% ± 0,21%
8h Kontrolle	2,67% ± 1,05%	1,07% ± 0,63%	0,36% ± 0,43%
8h NSC-631570	5,24% ± 2,76% ^a	4,29% ± 1,40% ^a	0,16% ± 0,22%
12h Kontrolle	3,02% ± 0,69%	1,07% ± 0,63%	0,36% ± 0,43%
12h NSC-631570	11,82% ± 2,85% ^a	4,29% ± 1,40% ^a	0,16% ± 0,22%
16h Kontrolle	3,14% ± 0,68%	0,74% ± 0,68%	0,26% ± 0,23%
16h NSC-631570	14,80% ± 5,23% ^a	7,88% ± 2,78% ^a	0,19% ± 0,28%
20h Kontrolle	3,10% ± 1,26%	1,26% ± 0,73%	0,26% ± 0,23%
20h NSC-631570	16,65% ± 5,05% ^a	6,32% ± 3,28% ^a	0,00% ± 0,00% ^a
24h Kontrolle	2,54% ± 0,64%	1,22% ± 0,74%	0,33% ± 0,22%
24h NSC-631570	19,24% ± 5,35% ^a	8,81% ± 3,19% ^a	0,10% ± 0,18% ^a

Die Angaben bezeichnen die Mittelwerte ± Standardabweichung, ^asignifikant: $p < 0,05$

Blastenformation auf Stimulation mit PHA oder anti-CD3-Antikörpern war nach Vorinkubation sogar signifikant erhöht (NSC-631570 vs. Kontrolle; PHA: $p < 0,01$; anti-CD3-Ak: $p < 0,05$).

Diskussion

Diese Daten zeigen, daß NSC-631570 eine starke zytostatische Wirkung auf die Zelllinien Jurkat, THP-1, MIA PaCa2, BxPC3 und AsPC1 hat. Interessanterweise sind die zytostatischen

Effekte bereits nach einer Inkubationsdauer von 4 Stunden anhand eines signifikanten G₂/M-Arrests nachweisbar. Diese durch die Zellzyklusanalyse gewonnenen Erkenntnisse konnten durch BrdU-Inkorporationsassay gestützt werden. Durch die Mitoseanalyse konnten wir zeigen, daß NSC-631570 zu einem Arrest in der Pro- und Metaphase der Mitose führt. Diese Eigenschaft ist ebenfalls von den Vinkaalkaloiden und Taxoiden bekannt [2, 3]. Interessant ist allerdings die Tatsache, daß sich eine zytostatische Hemmung auf die blastogene Proliferation von stimuliertem Vollblut mit NSC-631570 nicht nachweisen läßt.

Zusammenfassung

Hintergrund: Aus Pflanzen gewonnene Chemotherapeutika werden in der modernen Onkologie eingesetzt. NSC-631570 ist eine halbsynthetische Verbindung des Alkaloid-Derivates Chelidonin aus *Chelidonium majus*.

Methoden: Das zytostatische Potential von NSC-631570 zu untersuchen wurden die Zelllinien Jurkat, THP-1, MIA PaCa2, BxPC3 and AsPC1 mit zunehmenden Konzentrationen von NSC-631570 unter verschiedenen Kulturbedingungen inkubiert. Die Proliferationsrate wurde mittels BrdU-Assay bestimmt und die Zellzyklusanalyse erfolgte durch Propidiumiodid-Färbung und durchflußzytometrischer Messung. Zur Mitosephasenbestimmung wurden die Zellen nach Giemsa gefärbt.

Ergebnisse: Wir fanden eine Dosis- und Zeit-abhängige Wirkung von NSC-631570 auf den Zellzyklus der getesteten Zelllinien. Die Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit 10 µg/ml NSC-631570 für 24 Stunden zeigte einen deutlichen G₂/M-Arrest und eine erhöhte Apoptoserate bei den behandelten Zellen (AsPC1: Apoptose: 9,74% vs. 2,64%, $p < 0,05$; G₂/M: 52,00% vs. 20,88%, $p < 0,05$). Die Giemsa-Färbung zeigte eine Akkumulation der Zellen in der Pro- und der Metaphase (Prophase: 19,24% vs. 2,54%, $p < 0,01$; Metaphase: 8,81% vs. 1,22%, $p < 0,01$). Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied in der Apoptoserate von behandelten peripheren mononukleären Zellen verglichen mit unbehandelten. Die blastogene Antwort von mitogenstimulierten Lymphozyten war sogar signifikant erhöht (NSC-631570 vs. Kontrolle: PHA: $p < 0,01$; anti-CD3-Ak: $p < 0,05$).

Schlußfolgerung: NSC-631570 führt in den untersuchten Zelllinien über einen Pro- und Metaphasen-Arrest zur Apoptose, während periphere mononukleäre Zellen keinen Unterschied in der Apoptoserate und der Zellzyklusanalyse zeigen.

Abstract

Background: Several plant-derived drugs are used in medical oncology. NSC-631570 is a semisynthetic compound of alkaloid chelidonine from the plant *Chelidonium majus*.

Methods: To examine the cytostatic potential of NSC-631570 we incubated the tumor cell lines Jurkat, THP-1, MIA PaCa2, BxPC3 and AsPC1 with increasing concentrations of NSC-631570 under different culture conditions. Proliferation rate was measured by BrdU assay, and cell cycle analysis was performed by propidium iodide staining and FACS analysis. To specify the mitose phases, giemsa staining was done.

Results: We found a dose-dependent and time-dependent influence of NSC-631570 on the cell cycle of the tested tumor cells. The cell cycle analysis after 24 h of incubation with 10 µg/ml revealed a clear G₂/M arrest and a high apoptosis rate in the treated cells versus

control (AsPC1: apoptosis 9.74% vs 2.64%, $P < 0.05$; G2/M 52.00% vs 20.88%, $P < 0.05$). The Giemsa staining showed a high accumulation of treated cells in prophase and metaphase (NSC-631570 vs control: prophase 19.24% vs 2.54%, $P < 0.01$; metaphase 8.81% vs 1.22%, $P < 0.01$). Interestingly, the apoptosis rate of peripheral mononuclear cells did not show any differences between treated and untreated cells. The blastogenic response of mitogen-stimulated lymphocytes was even increased (NSC-631570 vs control: PHA $P < 0.01$; anti-CD3-mAb $P < 0.05$).

Conclusion: NSC-631570 leads to apoptosis by pro- and metaphase arrest in the investigated malignant cell lines, while peripheral mononuclear cells show no differences in apoptosis rate and cell cycle analysis.

Literatur

- 1. Wolff J, Knipling L (1993) Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids. *Biochemistry* 32: 13334-13339
- 2. Bensch KG, Malawista SE (1968) Microtubule crystals: a new biophysical phenomenon induced by Vinca alkaloids. *Nature* 218: 1176-1177
- 3. Pazdur R, Kudelka AP, Kavanagh JJ, Cohen PR, Raber-MN (1993) The taxoids: paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere). *Cancer Treat Rev* 19: 351-386

Korrespondenzadresse: Marco Ramadani, Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Chirurgie I, Steinhövelstraße 9, 89075 Ulm, Telefon: 0731-502-7226, Fax: 0731-502-1593, e-mail: marco.ramadani@medizin.uni-ulm.de