

International Symposium
**NEW DIRECTIONS IN
CANCER MANAGEMENT**
Academia Nacional de
Medicina Buenos
Aires, 6-8 June 2007

MEDICINA (Buenos Aires) 2007;
67 (Supl. II): 85-89

EFFECTOS DE REGRESIÓN DE LOS TUMORES EN EL EMPLEO
DE LAS PREPARACIONES DE VISCUM ALBUM
EXPLORACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOMODULADORES

SRIRAMULU ELLURU^{a, b, c, d}, **JEAN-PAUL DUONG VAN HUYEN**^{a, b, c, e},
BHARATH WOOTLA^{a, b, c, d},
SANDRINE DELIGNAT^{a, b, c}, **FABIENNE PROST**^{a, b, c}, **VIR-SINGH
NEGI**^f, **SRINI V. KAVERI**^{a, b, c}

^aCentre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris; ^bUniversité Paris Descartes, Paris; ^cEquipe 16-INSERM, Paris; ^dUniversité de Technologie, Compiègne, France; ^eDepartment of Pathology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris; ^fDepartment of Medicine, Pondicherry, India

Abstract *Viscum album* is a parasitic plant that grows on apple or pine trees. It is commonly known as European mistletoe. *Viscum album* (VA) preparations are the aqueous extracts used as a complementary medicine in cancer therapy. Various clinical studies have shown that VA preparations improve the quality of life in different cancer patients. Biologically active components of VA extracts include Mistletoe lectins (ML), viscotoxins, polyphenols and polysaccharides. The treatment with VA preparations or with purified ML has been shown to be associated with tumor regression in several *in vivo* experimental models of tumoral implantation. Various *in vitro* studies have shown the cytotoxic effects of VA preparations on various tumor cells. The mechanisms underlying the anti-tumoral activity of VA preparations or ML are complex and involve apoptosis, angiogenesis and immunomodulation. The immunomodulatory mechanisms mediated by the VA preparations can complement the anti-tumoral effects, resulting in effective tumor regression. This

review provides an account of the current status of the understanding of the VA-associated immunomodulation in various cell types including lymphoblastoid, monocytic and endothelial cell lines.

Key words: *Viscum album*, cytotoxicity, apoptosis, endothelium, immune system

**Resumen *Efecto antitumoral de extractos de Viscum album.*
*Búsqueda de efectos inmunomoduladores.***

Viscum album es una planta parasitaria que crece en los pinos y manzanos. Se conoce comúnmente como *European mistletoe*. Las preparaciones de *Viscum album* (VA) son extractos acuosos que se emplean como medicinas complementarias en la terapia del cáncer. Varios estudios clínicos han demostrado que las preparaciones de VA mejoran la calidad de vida de los pacientes oncológicos. Entre los componentes biológicamente activos presentes en los extractos acuosos de VA se pueden mencionar las lectinas de Mistletoe (ML), viscotoxinas, polifenoles y polisacáridos. En varios modelos experimentales de implantación tumoral *in vivo*, el tratamiento con preparaciones de VA o con la lectina ML purificada se asoció con regresión tumoral. Asimismo, diversos estudios *in vitro* demostraron que las preparaciones de VA tienen efectos citotóxicos sobre varias células tumorales. Los mecanismos implicados en la actividad antitumoral de las preparaciones de VA son complejos e involucran apoptosis, angiogénesis e inmunomodulación. Se propone que los mecanismos inmunomodulatorios podrían complementar los efectos antitumorales, resultando en una efectiva regresión del tumor. Este trabajo revisa el estado actual del conocimiento sobre la inmunomodulación asociada al VA en diferentes tipos celulares incluyendo líneas linfoblastoideas, monocíticas y endoteliales.

Palabras clave: *Viscum album*, citotoxicidad, apoptosis, endotelio, sistema inmune

Los preparados de *Viscum Album* (VA) son extractos acuosos de *Viscum album* o muérdago europeo que contienen diferentes tipos de lectinas¹⁻³. Las lectinas del muérdago (ML) I, II y III pertenecen a la familia de proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) de tipo II. Las RIP de tipo II están compuestas por una N-glicosidasa (cadena A) y una lectina que reconoce galactósidos (cadena B) conectadas por un puente disulfuro⁴. Todos los preparados utilizados con fines terapéuticos contienen, además de lectinas de muérdago y viscotoxinas, varias enzimas, péptidos

por ejemplo viscumamide, aminoácidos tioles, aminas, polisacáridos, ciclitoles, lípidos, fitoesteroles, triterpenos, flavonoides, fenilpropanos y minerales. Diversos estudios han descrito los beneficios clínicos de los preparados a base de extractos de VA en pacientes con cáncer ⁵⁻⁷. El tratamiento con extractos de VA o con ML purificado también se ha asociado a la regresión tumoral en varios modelos experimentales in vivo de implantación tumoral ⁸⁻¹⁰.

El efecto antitumoral experimental de los extractos de VA puede estar respaldado por las propiedades citotóxicas directas del ML hacia las líneas celulares tumorales ^{1, 11, 12}. Está bien establecido que la citotoxicidad de los extractos de VA depende de la inducción de apoptosis. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la apoptosis inducida por el extracto de VA no se han conseguido dilucidar por completo ^{10, 13-20}. Más recientemente, varios estudios han demostrado que los extractos de VA y el ML purificado tienen propiedades inmunomoduladoras ^{14, 17, 18, 21-27}. Se ha demostrado que los preparados de VA o el ML purificado inducen la activación de la transcripción y la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1, la IL-6 y el TNF en las PBMC humanas y en las células endoteliales ^{17, 22, 24, 26}. Además, varios estudios han demostrado que los extractos de VA ejercen propiedades inmunomoduladoras, es decir, potencian la actividad de las células NK o modulan la polarización de las TH ^{28, 29}. Sin embargo, las propiedades citotóxicas in vitro de los extractos de VA hacia las líneas celulares cancerosas plantean la cuestión de la interacción de los preparados de VA con la supervivencia de las células implicadas en los sistemas inmunitario e inflamatorio, es decir, los linfocitos, los monocitos y las células endoteliales (EC). Para abordar esta cuestión, hemos realizado varios estudios in vitro sobre la interacción de los extractos de VA con diversas líneas celulares establecidas (líneas celulares monocíticas y linfoblastoides, líneas EC) o cultivos primarios (esplenocitos murinos normales, HUVEC).

Citotoxicidad de los extractos de VA hacia líneas celulares humanas derivadas de linfocitos T y B, y de monocitos in vitro

Varios autores han establecido que la citotoxicidad de los extractos de VA podría variar considerablemente en función del tipo de preparación y de la célula investigada. Se ha descrito la inducción de necrosis celular por extractos de VA en linfocitos de sangre periférica humana (PBL), monocitos de sangre periférica humana (PBM), timocitos murinos, células monocíticas humanas THP1 y células leucémicas mononucleares MOLT4^{14, 16-18}.

Realizamos un estudio para comparar las propiedades citotóxicas de diferentes preparaciones de VA: VA Qu FrF, Qu Spez, M Spez y VA P en un amplio panel representativo de células linfoblásticas de origen T y B y en líneas celulares monocíticas^{19, 30}. La inducción de la toxicidad celular por diversos extractos de VA se evaluó in vitro en las líneas celulares T humanas CEM y Jurkat, las líneas linfoblásticas B Raji, BC36, BC28, BC41, WW2-LCL y en las líneas celulares monocíticas HL-60 y MM-619,³⁰. La muerte celular se midió mediante la captación de yoduro de propidio seguida de análisis por citometría de flujo. VA Qu FrF, Qu Spez y M Spez indujeron una muerte celular dependiente de la dosis tanto en las líneas celulares T como en las líneas celulares monocíticas. La toxicidad celular se asoció con una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular. Como era de esperar, VA P carecía de citotoxicidad en todas las líneas celulares analizadas. Esto puede explicarse en parte por las bajas concentraciones de ML citotóxico en las preparaciones de VA P.

La participación de la apoptosis en la toxicidad celular inducida por los extractos de VA ha sido bien demostrada en diversas líneas celulares tumorales^{13-17, 31}. Los mecanismos moleculares no se comprenden del todo y se han publicado resultados contradictorios. En cuanto a las células linfoblásticas, utilizando la línea celular T HuT78.B1 resistente al Fas, hemos demostrado que la vía del Fas no está implicada en la apoptosis del VA Qu FrF, como habían informado anteriormente otros autores³². También hemos demostrado que el VA QuFrF induce una disminución drástica de la

cantidad de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X en los linfocitos T19, un hallazgo coherente con la liberación de citocromo de las mitocondrias inducida por ML I ¹³.

A las concentraciones estudiadas, casi todas las líneas celulares linfoblastoides B eran resistentes a todas las preparaciones de VA (solo la línea celular BC41 era totalmente sensible a las tres preparaciones) estudiadas. Nuestros hallazgos confirman claramente que las líneas celulares de origen linfocitario B son refractarias a la muerte celular inducida por los extractos de VA. Bantel&co obtuvieron resultados similares ¹³. La línea celular de linfocitos B, BJAB, requirió cantidades aproximadamente 1000 veces superiores de ML-I que las requeridas por las células Jurkat para alcanzar un nivel óptimo de apoptosis ¹³. Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares de dicha resistencia de las líneas celulares de origen B.

Los resultados de los experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio pueden aportar nuevos conocimientos sobre la interacción de los extractos de VA con el sistema inmunitario. Estos experimentos preliminares ex vivo sugieren que los preparados de VA pueden inducir la proliferación celular en esplenocitos de ratones C57BL6 normales, según se ha medido mediante la incorporación celular de timidina tri-tiada. Sin embargo, estos datos muestran claramente un equilibrio entre la inhibición o inducción de la proliferación y la inducción de la apoptosis, que variaba en función de la preparación utilizada, la concentración y el tiempo de incubación (fig. 1). Los resultados ponen de relieve la necesidad de diseñar un programa adecuado para lograr la inmunoestimulación tanto en experimentos in vivo como in vitro.

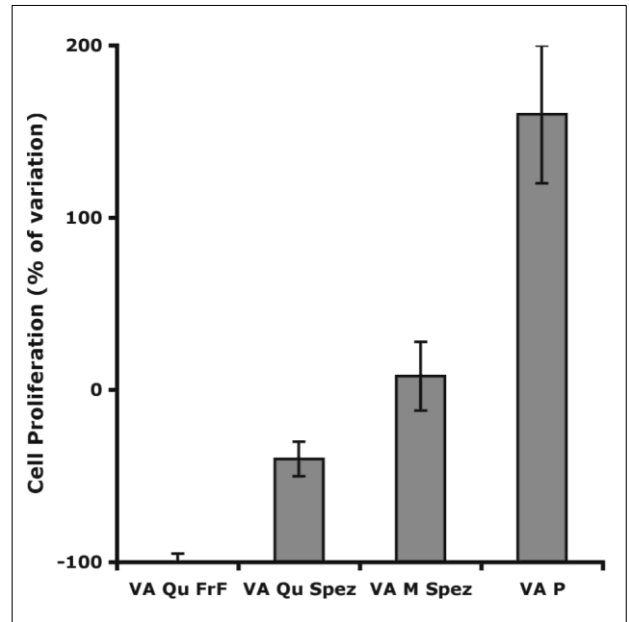


Fig. 1.– Modulación diferencial de la proliferación de esplenocitos de ratón mediante extractos de VA. Se obtuvieron esplenocitos de ratón a partir de ratones C57BL6 normales (6 ratones). Las células se cultivaron durante 72 h en presencia de 50 µg/ml de VA Qu FrF, Qu Spez, M Spez y P. Tras 48 h, se añadió [3H]timidina (0,5 µCi) al medio. A continuación, las células se cultivaron durante otras 24 h. Después, se recogieron los esplenocitos y se midió la [3H]timidina incorporada. Los resultados se representan como porcentaje de variación en comparación con los controles no tratados. Tras 72 h de cultivo, VA Qu FrF y Q Spez inhibieron fuertemente la proliferación de esplenocitos murinos, mientras que VA P indujo drásticamente la proliferación celular.

Inducción de la apoptosis por diversos extractos de *Viscum album* tanto en líneas celulares endoteliales venosas humanas inmortalizadas como en HUVEC.

Además de su función de control entre la sangre y los tejidos, el endotelio desempeña un papel fundamental en varios procesos biológicos. Las células endoteliales participan activamente en la regulación del flujo sanguíneo y la coagulación, en el inicio y la intensificación de la inflamación, y en la angiogénesis, que es

fundamental para la reproducción, el desarrollo y la reparación^{33,34}. Por lo tanto, es necesario investigar la contribución del efecto mediado por las células endoteliales en las propiedades antitumorales de los extractos de VA. A este respecto, evaluamos las interacciones entre los extractos de VA y las células endoteliales.

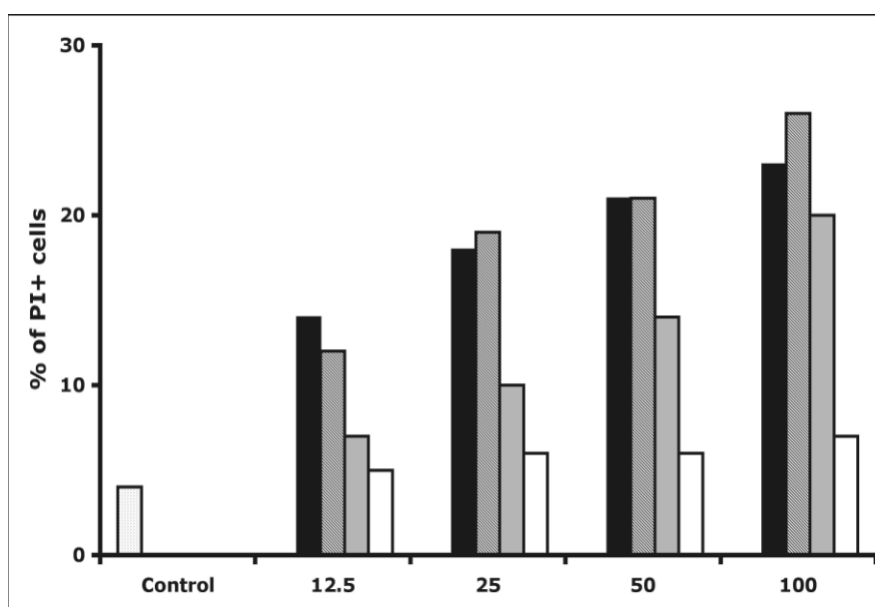


Fig. 2.— Inducción de la muerte celular en la línea celular endotelial EA-hy926 mediante extractos de VA. Se cultivaron células EA-hy926 subconfluentes durante 48 h en presencia de concentraciones crecientes de extractos de VA: VA Qu FrF (barras negras), Qu Spez (barras sombreadas), M Spez (barras grises) y P (barras abiertas), o se dejaron sin tratar (control). A continuación, se cuantificó la muerte celular midiendo la captación de PI y se expresó como porcentaje de células positivas al colorante. VA Qu FrF, Qu Spez y M Spez indujeron toxicidad celular dependiente de la dosis en las células EA-hy926. Las EC fueron totalmente resistentes al VA P.

Nuestro estudio *in vitro* se centró en la capacidad de los extractos de VA para inducir la muerte de las células endoteliales. Utilizando células endoteliales venosas humanas primarias (HUVEC) y las líneas celulares endoteliales venosas humanas inmortalizadas IVEC y EA-hy926, hemos demostrado que los extractos de VA inducen la muerte de las células endoteliales de forma dependiente de la dosis y el tiempo²⁰. La figura 2 muestra

las propiedades citotóxicas de los extractos de VA hacia EA-hy926, evaluadas mediante la captación de PI. Tres extractos de VA indujeron una potente mortalidad de EA-hy926, evaluada mediante la captación de PI. VA Qu FrF y VA Qu Spez fueron los preparados más eficaces. Iscador M Spez tuvo menos propiedades citotóxicas. Las células EA-hy926 fueron insensibles a Iscador P en ninguna de las concentraciones probadas. Se obtuvieron resultados similares con las líneas celulares IVEC. Otros autores también han informado de la sensibilidad de varias líneas EC a los extractos de VA ³⁵.

A continuación, demostramos que la muerte de EC mediada por VA implica apoptosis, utilizando varios métodos, es decir, formación de escalera de ADN, marcaje con anexina V y análisis Western blot para la escisión de poli(ADP)-ribosa polimerasa (PARP). La figura 3A ilustra el aspecto citológico de las HUVEC incubadas con altas concentraciones de VA Qu FrF20. Se observaron numerosas ampollas típicas alrededor de la célula. Como se ilustra en la figura 3B, las HUVEC cultivadas en presencia de extractos de VA mostraron los cuerpos apoptóticos típicos. El marcaje con anexina V mediante análisis de citometría de flujo y los experimentos de escalera de ADN también confirmaron la participación de la apoptosis en la muerte celular endotelial inducida por extractos de VA. El porcentaje de células endoteliales que sufrieron apoptosis (An V+/PI-) aumentó de forma dependiente del tiempo y la dosis para los extractos de VA. El análisis Western blot también demostró que la escisión de PARP está implicada en la apoptosis de HUVEC inducida por VA.

¿Se pueden utilizar los extractos de *Viscum album* para el tratamiento antiangiogénico del cáncer?

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de la ramificación de vasos preexistentes^{33, 34, 36, 37}. La angiogénesis tumoral desempeña un papel esencial en la progresión y la metástasis de los tumores. Las aplicaciones clínicas de la investigación sobre la angiogénesis han surgido en el ámbito del diagnóstico, el pronóstico o el tratamiento de la neoplasia^{38, 39}. Los mecanismos implicados en la angiogénesis tumoral consisten en una amplia gama de fenómenos, entre los que se incluyen el aumento de la división de las células endoteliales dentro del tumor, la regulación al alza de las moléculas de adhesión celular y la producción de factores angiogénicos^{33, 34}.

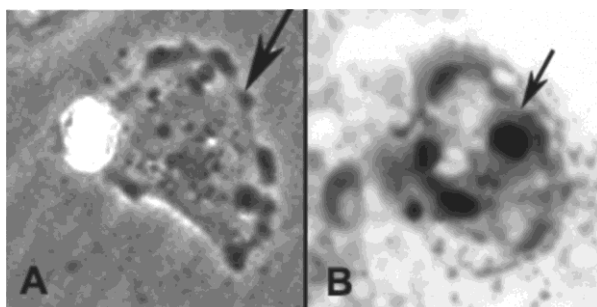


Fig. 3.— Las HUVEC sufren apoptosis cuando se tratan con dosis más altas de VA Qu FrF. Se cultivaron HUVEC subconfluentes con VA Qu FrF a 50 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 h. El panel A ilustra las características de las células endoteliales en el examen citológico, con presencia de hemorragias alrededor de las células. Panel B.

Por lo tanto, el papel de los extractos de VA en el proceso de angiogénesis es de interés para comprender algunos de los mecanismos moleculares implicados en las propiedades antitumorales de los extractos de VA. La figura 3 ilustra nuestros resultados preliminares obtenidos en experimentos de formación de tubos capilares utilizando la línea celular EA-hy926. Se sembraron células endoteliales en matrigel y se incubaron con diversas concentraciones de extractos de VA. Se observó una red de tubos capilares bien organizada en el pocillo de control (fig. 4A). Por el

contrario, la formación de tubos capilares dio un resultado intermedio con VA P (50 µg/ml) (fig. 4B), mientras que se anuló en presencia de VA Qu Spez (50 µg/ml) (fig. 4C). Por lo tanto, estos resultados preliminares sugieren que los extractos inhiben la angiogénesis in vivo de manera diferencial. El efecto antiangiogénico in vivo de los extractos de VA también se ha examinado mediante ensayos de membrana corioalantoidea en ratones C57BL6 inoculados con células de melanoma B16-BL6 y tratados con aglutinina de *Viscum album L. coloratum*¹⁰. Además, los extractos de VA *coloratum* suprimieron el crecimiento tumoral in vivo e inhibieron el número de vasos sanguíneos orientados hacia la masa tumoral⁴⁰.

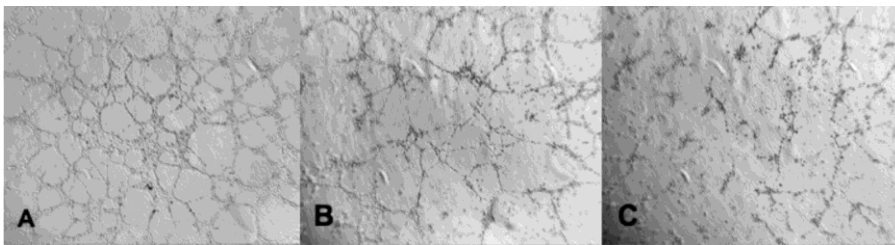


Fig. 4.— VA Qu Spez inhibe la angiogénesis en condiciones in vitro. Se sembraron células EA-hy926 en Matrigel®, que promueve la angiogénesis in vitro. Los matrigelos o bien no se trataron (panel A) o bien se trataron con diferentes concentraciones de VA P o VA QuSpez. Tras 24 horas, se observa un crecimiento normal de la vascularización en el control (panel A), una disminución moderada del crecimiento vascular en el tratamiento con VA P (panel B, 50 µg/ml). Sin embargo, se observa una notable reducción del crecimiento vascular en los tratamientos con VA QuSpez (panel D, 50 µg/ml). Por lo tanto, la incubación con VA Qu Spez (50 µg/ml) anuló parcialmente la formación de tubos capilares (C).

Los mecanismos moleculares que subyacen a la inhibición de la angiogénesis inducida por VA no se han dilucidado completamente. A nivel de las células endoteliales, nuestros resultados pueden sugerir la implicación de la apoptosis de las células endoteliales asociada al VA, al menos en parte en sus propiedades antiangiogénicas. Varios estudios han demostrado claramente que la apoptosis de las células endoteliales está implicada en la inhibición fisiológica de la angiogénesis. En consonancia con ello, Yoon & col. han observado en experimentos in vitro que los extractos de VA *coloratum* inhiben la proliferación de las células endoteliales de rata.

Conclusiones

Los mecanismos moleculares que subyacen a la actividad antitumoral del VA o el ML son complejos e implican varios fenómenos biológicos interrelacionados, como la apoptosis, la angiogénesis y la inmunomodulación. Al igual que otros miembros de la familia RIP II, los extractos de VA ejercen actividad citotóxica sobre líneas celulares derivadas tanto de humanos como de roedores, aunque en menor medida en comparación con la ricina. Los extractos de VA y el ML purificado también inducen la activación de la transcripción y la secreción de citocinas proinflamatorias en PBMC y células endoteliales humanas. Para abordar las interacciones entre las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de los preparados de VA, recientemente hemos investigado los mecanismos que subyacen a los efectos de los extractos de VA sobre el crecimiento tumoral del melanoma implantado en ratones. Estos estudios sugieren la implicación de ciertas citocinas antitumorales. En conjunto, varias líneas de evidencia que se han acumulado en los últimos años, a favor de las propiedades antitumorales e inmunomoduladoras de los extractos de VA, animan encarecidamente a seguir investigando de forma intensiva.

Reconocimientos: Los autores agradecen a Rainier Dierdorf, Jean Chazarenc y Marc Follmer sus útiles sugerencias. Este trabajo ha sido financiado por Weleda AG, Suiza, y por el Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) y el Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). S.E. es beneficiario de una beca de EGIDE, Francia.

1. Ernst E, Schmidt K, Steuer-Vogt MK. Mistletoe for cancer? A systematic review of randomised clinical trials. *Int J Cancer* 2003; 107: 262-7.
2. Kienle GS, Berrino F, Bussing A, et al. Mistletoe in cancer - a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* 2003; 8: 109-19.
3. Mansky PJ. Mistletoe and cancer: controversies and perspectives. *Semin Oncol* 2002; 29: 589-94.
4. Braun JM, Ko HL, Schierholz JM, et al. Standardized mistletoe extract augments immune response and down-regulates local and metastatic tumor growth in murine models. *Anticancer Res* 2002; 22: 4187-90.
5. Burger AM, Mengs U, Schuler JB, et al. Anticancer activity of an aqueous mistletoe extract (AME) in syngeneic murine tumor models. *Anticancer Res* 2001; 21: 1965-8.
6. Park WB, Lyu SY, Kim JH, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16: 439-47.
7. Ribereau-Gayon G, Jung ML, Baudino S, et al. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. *Experientia* 1986; 42: 594-9.
8. Maier G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts in vitro. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 373-9.
9. Bantel H, Engels IH, Voelter W, et al. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 2083-90.
10. Hostanska K, Hajto T, Weber K, et al. A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nat Immun* 1996; 15: 295-311.
11. Hostanska K, Vuong V, Rocha S, et al. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumor cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer* 2003; 88: 1785-92.
12. Lavastre V, Pelletier M, Saller R, et al. Mechanisms involved in spontaneous and *Viscum album* agglutinin-I induced human neutrophil apoptosis: *Viscum album* agglutinin-I accelerates the loss of antiapoptotic Mcl-1 expression and the degradation of cytoskeletal paxillin and vimentin proteins via caspases. *J Immunol* 2002; 168: 1419-27.
13. Mockel B, Schwarz T, Zinke H, et al. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung* 1997; 47: 1145-51.
14. Ribereau-Gayon G, Jung ML, Frantz M, et al. Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or

- Drugs* 1997; 8 Suppl 1: S3-8.
15. Duong Van Huyen JP, Sooryanarayana Delignat S, et al. Variable sensitivity of lymphoblastoid cells to apoptosis induced by *Viscum album* Qu FrF, a therapeutic preparation of mistletoe lectin. *Chemotherapy* 2001; 47: 366-76.
 16. Van Huyen JP, Bayry J, Delignat S, et al. Induction of Apoptosis of Endothelial Cells by *Viscum album*: A Role for Anti-Tumoral Properties of Mistletoe Lectins. *Mol Med* 2002; 8: 600-06.
 17. Gorter RW, Joller P, Stoss M. Cytokine release of a keratinocyte model after incubation with two different *Viscum album* L extracts. *Am J Ther* 2003; 10: 40-47.
 18. Hajto T, Hostanska K, Frei K, et al. Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract. *Cancer Res* 1990; 50: 3322-26.
 19. Hajto T, Hostanska K, Weber K, et al. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat Immun* 1998; 16: 34-46.
 20. Hostanska K, Hajto T, Spagnoli GC, et al. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Immun* 1995; 14: 295-304.
 21. Kovacs E. Serum levels of IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in cancer patients treated with *Viscum album* extract. *Biomed Pharmacother* 2000; 54: 305-10.
 22. Ribereau-Gayon G, Dumont S, Muller C, et al. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Lett* 1996; 109: 33-38.
 23. Hajto T, Hostanska K, Gabius HJ. Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res* 1989; 49: 4803-08.
 24. Tabiasco J, Pont F, Fournie JJ, et al. Mistletoe visco-toxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2591-600.
 25. Yoon TJ, Yoo YC, Kang TB, et al. Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK

- 98 cells. *Arch Pharm Res* 2003; 26: 861-67.
26. Duong Van Huyen JP, Delignat S, Kazatchkine MD, et al. Comparative study of the sensitivity of lymphoblastoid and transformed monocytic cell lines to cytotoxic effects of viscum album extracts of different origin. *Chemotherapy* 2003; 49: 298-302.
27. Büssing A. Induction of apoptosis by the mistletoes lectins: A review on the mechanisms of cytotoxicity mediated by *Viscum album* L. *Apoptosis* 1996; 1: 25-32.
28. Elsasser-Beile U, Ruhnau T, Freudenberg N, et al. Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. *Cancer* 2001; 91: 998-1004.
29. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
30. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
31. Harmsma M, Gromme M, Ummelen M, et al. Differential effects of *Viscum album* extract IscadorQu on cell cycle progression and apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 25: 1521-29.
32. Lucas R, Holmgren L, Garcia I, et al. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 4730-41.
33. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190: 330-37.
34. Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001; 86: 23-33.
35. Keshet E, Ben-Sasson SA. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J Clin Invest* 1999; 104: 1497-1501.
36. Yoon TJ, Yoo YC, Choi OB, et al. Inhibitory effect of Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract on tumor angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumor cells in mice. *Cancer Lett* 1995; 97: 83-91.