

· 研究论文 ·

印苦楝内酯诱导急性早幼粒细胞白血病细胞凋亡及其机制研究

谭静 杨梦楠 李晴 戴克胜* 闫荣*

(苏州大学附属第一医院血液科, 江苏省血液研究所, 国家血液系统疾病临床医学研究中心, 国家卫生健康委员会血栓与止血重点实验室, 苏州 215006)

摘要 该研究旨在探讨印苦楝内酯对急性早幼粒细胞白血病细胞的作用及其机制。通过CTD、TargetNet、SwissTargetPredict及PharmMapper数据库挖掘印苦楝内酯作用靶点;从GeneCards、MalaCards及Open Targets数据库获取急性早幼粒细胞白血病相关靶点。筛选二者的交集靶点并对交集靶点进行KEGG通路富集分析。基于交集靶点构建蛋白互作网络并进行拓扑分析,以筛选核心靶点。构建药物-疾病-靶点-通路调控网络。用不同浓度的印苦楝内酯处理NB4细胞,CCK-8法检测细胞活力;流式细胞术检测细胞周期分布情况、凋亡率及线粒体膜电位水平;Western blot检测细胞凋亡相关蛋白及PI3K-Akt信号通路相关蛋白的表达水平。同时,评估印苦楝内酯对健康人外周血单个核细胞凋亡的影响。在回复实验中,NB4细胞经Akt激活剂SC79预处理后,与印苦楝内酯共孵育,流式细胞术检测细胞凋亡率与线粒体膜电位水平;Western blot检测凋亡相关蛋白表达水平。共获得225个急性早幼粒细胞白血病与印苦楝内酯的交集靶点;KEGG富集分析显示,交集靶点显著富集于细胞凋亡、PI3K-Akt信号通路;蛋白互作网络分析筛选出Caspase-3、Bcl-2和PARP1等32个核心靶点。印苦楝内酯抑制NB4细胞增殖并诱导其周期阻滞在G₂/M期。随着印苦楝内酯浓度增加,NB4细胞凋亡率升高并伴随线粒体膜电位水平下降。经印苦楝内酯处理后,NB4细胞中Cleaved Caspase-3及Cleaved PARP1蛋白表达水平上调,Caspase-3、PARP1及Bcl-2蛋白表达水平下调,Bax蛋白表达水平无明显变化。但是,在相同浓度处理下,印苦楝内酯不引起健康人外周血单个核细胞凋亡率增加。印苦楝内酯处理使NB4细胞中Akt(Ser473)磷酸化蛋白表达水平下调。Akt激活剂SC79可显著抑制印苦楝内酯诱导的NB4细胞凋亡率升高、线粒体膜电位水平下降以及凋亡相关蛋白变化。总之,印苦楝内酯通过线粒体途径诱导急性早幼粒细胞白血病细胞NB4凋亡,其机制与抑制PI3K-Akt信号通路有关。

关键词 印苦楝内酯;急性早幼粒细胞白血病;凋亡;PI3K-Akt

Nimbolide-Induced Apoptosis in Acute Promyelocytic Leukemia Cells and Its Underlying Mechanisms

TAN Jing, YANG Mengnan, LI Qing, DAI Kesheng*, YAN Rong*

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Institute of Hematology, National Clinical Research Center for Hematologic Diseases, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Suzhou 215006, China)

收稿日期: 2026-02-02 接受日期: 2026-04-23

国家自然科学基金重点项目(批准号: 82230003)、苏州市姑苏卫生人才计划(批准号: GSWS2022008)和苏州市科教强卫项目(批准号: MSXM2025007)资助的课题

*通信作者。Tel: 0512-67781371, E-mail: kdai@suda.edu.cn; yanrongbaobao@163.com

Received: February 2, 2026 Accepted: April 23, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82230003), the Gusu Health Talents Program of Suzhou (Grant No.GSWS2022008), and the Suzhou Science, Education and Health Strengthening Project (Grant No.MSXM2025007)

*Corresponding authors. Tel: +86-512-67781371, E-mail: kdai@suda.edu.cn; yanrongbaobao@163.com

Abstract This study aims to investigate the effects of nimbolide on acute promyelocytic leukemia cells and to elucidate the underlying mechanisms. Nimbolide-associated targets were identified through the CTD, TargetNet, SwissTargetPredict, and PharmMapper databases, and acute promyelocytic leukemia-related targets were obtained from the GeneCards, MalaCards, and Open Targets databases. The overlapping targets of the two sets were identified and subjected to KEGG pathway enrichment analysis. A protein-protein interaction network was then constructed based on the overlapping targets, followed by topological analysis to identify core targets. A drug-disease-target-pathway regulatory network was constructed. NB4 cells were treated with different concentrations of nimbolide. Cell viability was determined using the CCK-8 assay. Flow cytometry was used to analyze cell cycle distribution, apoptosis rate, and mitochondrial membrane potential. The expression levels of apoptosis-related proteins and PI3K-Akt signaling pathway-associated proteins were detected by Western blot. In addition, apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors was assessed following nimbolide treatment. In rescue experiments, NB4 cells were pretreated with the Akt activator SC79 and then co-incubated with nimbolide, followed by analysis of apoptosis rate, mitochondrial membrane potential, and apoptosis-related protein expression. A total of 225 overlapping targets between acute promyelocytic leukemia and nimbolide were identified. KEGG enrichment analysis showed that the overlapping targets were significantly enriched in apoptosis and the PI3K-Akt signaling pathway. Protein-protein interaction network analysis identified 32 core targets, including Caspase-3, Bcl-2, and PARP1. Nimbolide inhibited the proliferation of NB4 cells and induced cell cycle arrest at the G₂/M phase. With increasing concentrations of nimbolide, apoptosis rate in NB4 cells increased in a dose-dependent manner, accompanied by a decrease in mitochondrial membrane potential. Nimbolide treatment increased the expression levels of Cleaved Caspase-3 and Cleaved PARP1, along with decreasing the expression levels of Caspase-3, PARP1 and Bcl-2 in NB4 cells, whereas Bax showed no significant change. However, under the same concentration, nimbolide treatment did not increase the apoptosis rate of peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. Nimbolide treatment decreased the phosphorylation level of Akt (Ser473) in NB4 cells. The Akt activator SC79 significantly attenuated nimbolide-induced increase in apoptosis rate, decrease in mitochondrial membrane potential, and changes in apoptosis-related protein expression in NB4 cells. In conclusion, nimbolide induces apoptosis in acute promyelocytic leukemia cell line NB4 via the mitochondrial pathway, and this effect is associated with inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway.

Keywords nimbolide; acute promyelocytic leukemia; apoptosis; PI3K-Akt

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)是一种以早幼粒细胞分化受阻为主要特征的急性髓系白血病亚型,在初诊急性髓系白血病中,APL所占比例为10%~15%,APL患者的临床表现通常包括白细胞数目异常、血小板减少及凝血功能障碍,严重者会出现早期死亡,以全反式维甲酸联合砷剂为基础的标准治疗方案显著提高了患者的缓解率^[1]。尽管标准治疗已取得突破性进展,但临床上仍面临治疗相关毒性、耐药复发等挑战^[2-3]。近年来研究显示,在APL中,全反式维甲酸联合表观遗传调节剂或天然产物,可通过多通路协同作用发挥抗白血病效应,在改善患者治疗结局方面具有一定潜力^[4-5]。印苦楝内酯(nimbolide)是从印度楝树中分离出来的一种天然三萜类化合物,因其广泛的药理活性备受关注,其中,最主要的是抗癌活性^[6]。目前研究表明,印苦楝内酯对乳腺癌^[7]、肝癌^[8]、前列腺癌^[9]等多种实体肿瘤具有

抑制作用,其主要通过调节肿瘤细胞增殖、凋亡和转移等过程发挥抗肿瘤效应^[10-11]。然而,印苦楝内酯对APL的具体作用目前尚未被研究,因此,本研究聚焦于其对APL细胞的影响及其作用机制的探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

印苦楝内酯(货号:25990-37-8,纯度:99.79%)、四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE)(货号:HY-D0985A)购自美国MedChemExpress公司;人全血单个核细胞分离液(货号:P9011)购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8检测试剂(货号:K1018)购自美国APEX BIO公司;细胞周期检测试剂盒(货号:C1052)购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC与PI细胞凋亡检测试剂盒(货号:640914)购自美国BioLegend公司;SC79(货

号: 305834-79-1)购自美国Sigma-Aldrich公司; Bcl-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、PARP1、Bax、Akt、p-Akt(Ser473)、 β -actin(货号: 3498、9662、9664、9532、5023、9272、4060、4970)抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; 37 °C恒温细胞培养箱购自日本SANYO公司; 酶标仪购自美国Bio-Tek公司; 流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司。

1.2 网络药理学分析

从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取印苦楝内酯的化学结构, 从比较毒物基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)(<http://ctdbase.org>)中获取印苦楝内酯的作用靶点, 基于其化学结构在TargetNet(<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index>)、SwissTargetPredict(<http://www.swisstargetprediction.ch>)、PharmMapper(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>)数据库中进行靶点预测, 并将各数据库获得的靶点汇总并去重, 从而得到印苦楝内酯的作用靶点。APL靶点从GeneCards(<https://www.genecards.org>)、MalaCards(<https://www.malacards.org>)、Open Targets(<https://platform.opentargets.org>)数据库获取, 将得到的靶点汇总并去重, 作为APL相关靶点。所有数据库中筛选的印苦楝内酯作用靶点和APL相关靶点均限定为“*Homo sapiens*”。使用R语言对印苦楝内酯作用靶点与APL相关靶点取交集, 对交集靶点进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。设置最低互作置信度为0.4, 使用R语言对交集靶点进行蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析, 分析结果导入Cytoscape软件, 使用cytoHubba插件计算网络拓扑学参数, 包括度值、介数中心性和最大团中心性, 依据度值绘制PPI网络图。基于3种网络拓扑学参数分别对印苦楝内酯与APL的交集靶点进行优先级排序, 各自取排名前50的靶点, 取交集作为最终核心靶点并绘制韦恩图, 使用R语言进行核心靶点PPI网络分析, 将分析结果导入Cytoscape软件, 绘制核心靶点PPI网络图。基于核心靶点以及筛选出的最显著的前30条通路, 使用Cytoscape软件绘制药物-疾病-靶点-通路网络图。

1.3 细胞培养

APL细胞系NB4为本实验室保存, 在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。

1.4 提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)

采集健康成年人肘正中静脉血于EDTA抗凝管中, 在无菌15 mL离心管中加入5 mL人全血单个核细胞分离液, 使用巴氏德吸管在分离液液面上方沿管壁加入5 mL抗凝全血, 800 ×g室温下离心25 min, 吸取白膜层到新的无菌15 mL离心管中, 加入PBS洗涤细胞2次后, 使用人外周血单个核细胞完全培养基重悬细胞备用。该研究已通过苏州大学附属第一医院伦理委员会批准(批准号: 2024462), 并获得所有献血者的知情同意。

1.5 CCK-8法检测细胞增殖情况

取对数生长期的NB4细胞, 调整细胞浓度至 1.5×10^5 /mL, 向96孔板每孔中加入100 μ L细胞悬液。随后每孔加入100 μ L培养基梯度稀释的印苦楝内酯, 使其终浓度为0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 μ mol/L, 每孔给药体系的终体积为200 μ L。同时, 设置不加细胞的空白对照组, 每孔加入200 μ L培养基。上述所有组别均设置5个复孔。将细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养24、48 h。每孔加入20 μ L CCK-8溶液, 置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育4 h, 使用酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(D)值。相对细胞活力(relative cell viability, RCV)的计算公式: $RCV = [(D_{\text{实验孔}} - D_{\text{空白孔}}) / (D_{\text{对照孔}} - D_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞周期分布

取对数生长期的NB4细胞, 调整细胞浓度至 3×10^5 /mL, 向6孔板每孔中加入2 mL细胞悬液, 并分别加入不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 μ mol/L)的印苦楝内酯, 在37 °C、5% CO₂培养箱中培养48 h。收集细胞, 并在4 °C条件下, 500 ×g离心5 min, 弃去上清, 使用预冷PBS洗涤细胞2次, 加入300 μ L预冷PBS重悬细胞, 并缓慢滴加700 μ L预冷无水乙醇, 混匀后于4 °C冰箱固定过夜。次日, 在室温条件下, 将固定好的细胞500 ×g离心5 min, 弃去上清, 使用PBS洗涤细胞2次, 每份样品中加入500 μ L PI染色液重悬细胞, 在37 °C下避光孵育30 min。利用流式细胞仪检测细胞周期分布情况, 并使用ModFit LT 5.0软件分析实验结果。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况

取对数生长期NB4细胞或新鲜分离的PBMC, 调整细胞浓度至 3×10^5 /mL, 随后向6孔板的每个孔中加入2 mL细胞悬液, 并分别加入不同浓度(0、0.3、0.6、

0.9 $\mu\text{mol/L}$ 的印苦楝内酯。在回复实验中,预先使用Akt激活剂SC79(10 $\mu\text{mol/L}$)处理NB4细胞1 h,随后加入印苦楝内酯(0.9 $\mu\text{mol/L}$)。将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48 h。收集细胞,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,500 $\times\text{g}$ 离心5 min,弃上清,使用预冷PBS洗涤细胞2次,以50 μL Annexin V结合缓冲液重悬细胞,接着加入2.5 μL Annexin V-FITC及2.5 μL PI,于室温下避光孵育15 min后,加入350 μL Annexin V结合缓冲液终止反应。利用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并使用FlowJo 10.8.1软件分析实验结果。

1.8 TMRE检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)水平

NB4细胞处理条件与凋亡实验相同。收集细胞,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,500 $\times\text{g}$ 离心5 min,弃上清,使用预冷PBS洗涤细胞2次,随后将细胞重悬于1 mL无血清RPMI-1640稀释的TMRE染液(5 $\mu\text{mol/L}$)中,室温孵育30 min,孵育结束后在室温下500 $\times\text{g}$ 离心5 min,弃上清,并使用PBS洗涤细胞2次,加入400 μL 无血清RPMI-1640重悬细胞。利用流式细胞术检测细胞TMRE荧光信号,并使用FlowJo 10.8.1软件分析实验结果。

1.9 Western blot检测蛋白表达水平

NB4细胞处理条件与凋亡实验一致。收集细胞,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,500 $\times\text{g}$ 离心5 min,弃上清,使用预冷的PBS洗涤细胞2次,加入适量RIPA裂解液充分裂解细胞,冰上裂解30 min后,在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 $\times\text{g}$ 离心10 min,离心结束后取上清,采用Bradford法测定上清液中蛋白浓度。取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳,并将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h后,加入相应一抗溶液(1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日吸除一抗,使用1 \times TBST溶液洗涤PVDF膜5次,每次10 min;随后加入HRP标记的二抗溶液(1:2 000)室温孵育1 h,吸除二抗后再使用1 \times TBST溶液洗涤PVDF膜5次,每次10 min。最后使用ECL化学发光试剂处理PVDF膜,在暗室环境下曝光。使用ImageJ软件对蛋白条带进行灰度值分析,结合内参蛋白进行标准化处理,计算目标蛋白的相对表达量。

1.10 统计学分析

使用GraphPad Prism 10.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)呈现。多组数据的比较采用单因素(单变量)或双因素(多变量)方差分析。药物浓度与其生物学效应之间的相关性分析采用皮尔逊分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 印苦楝内酯干预APL的网络药理学分析

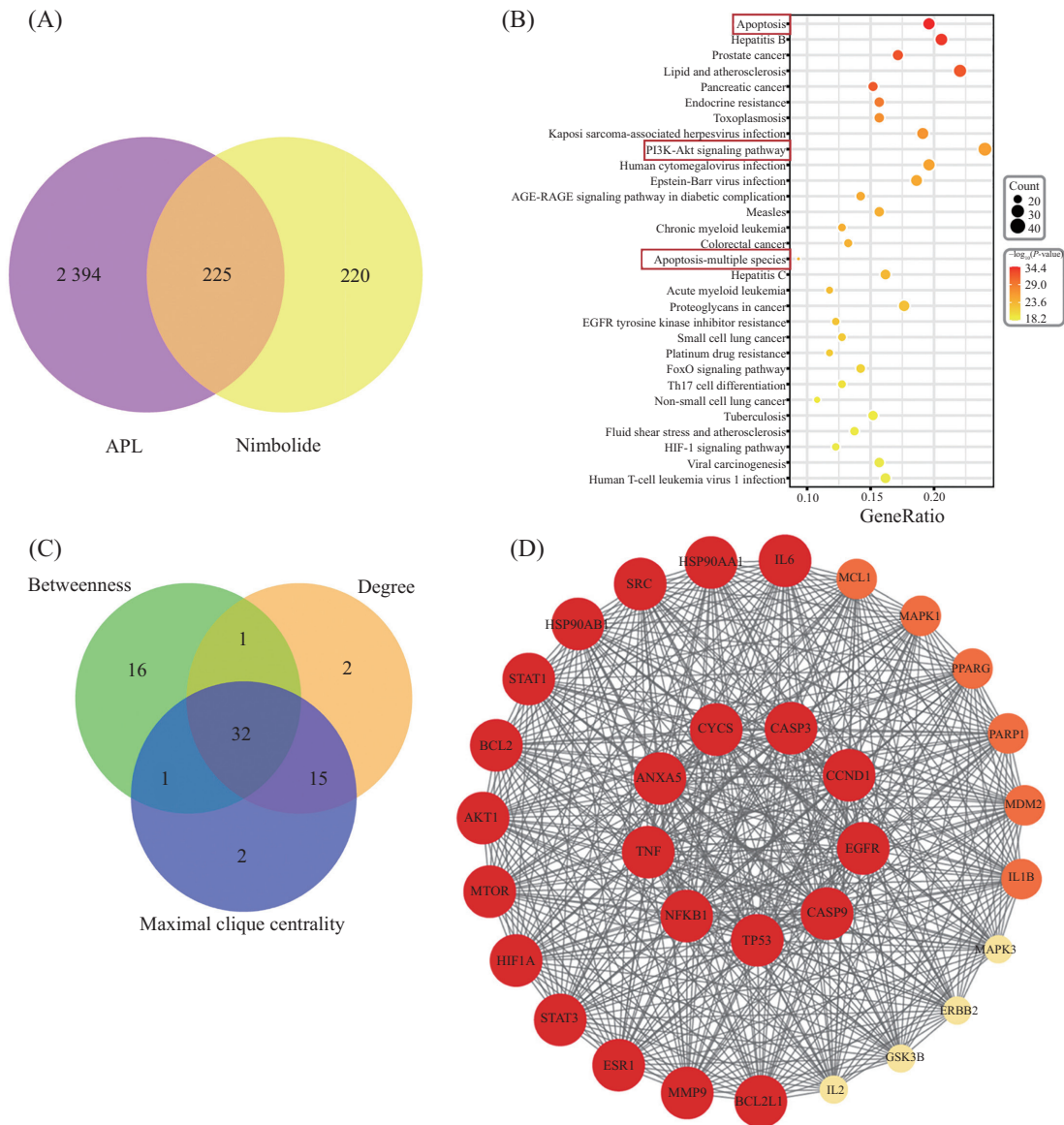
在对APL相关靶点与印苦楝内酯作用靶点取交集后,对交集靶点进行KEGG通路富集分析和PPI网络分析,并进一步通过PPI网络分析筛选核心靶点(图1和图2)。具体而言,从公共数据库中共获得2 619个APL相关靶点和445个印苦楝内酯作用靶点,两者取交集后得到225个交集靶点(图1A)。KEGG富集分析结果表明,交集靶点富集于285条通路,选取 P 值最显著的前30条通路绘制气泡图(图1B),其中细胞凋亡、PI3K-Akt信号通路显著富集。基于交集靶点的PPI分析结果,进一步计算网络拓扑学参数,包括度值、介数中心性和最大团中心性。依据度值构建可视化PPI网络图(图2),该网络去除游离节点后得到219个节点(蛋白)和4 506条边(蛋白间相互作用)。分别依据度值、介数中心性和最大团中心性选择排名前50的靶点,三者取交集后共得到32个核心靶点(图1C),其中包括半胱天冬酶-3(cysteine-dependent aspartate-specific protease-3, Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)及多聚ADP核糖聚合酶1[poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]等与细胞凋亡密切相关的分子。核心靶点PPI网络分析显示,该网络包括32个节点(蛋白)和489条边(蛋白间相互作用)(图1D)。KEGG富集分析筛选出的 P 值最显著的前30条信号通路共涉及31个核心靶点,在此基础上构建药物-疾病-靶点-通路网络图(图3),该网络图直观显示了印苦楝内酯可作用于多个与APL相关的关键靶点,协同调控多条通路来干预APL。基于此,本研究下一步开展相关实验探讨印苦楝内酯对APL细胞系NB4的具体作用。

2.2 印苦楝内酯对NB4细胞增殖的影响

为了研究印苦楝内酯对NB4细胞增殖的影响,设置不同浓度(0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 $\mu\text{mol/L}$)的印苦楝内酯处理NB4细胞,并分别在24 h和48 h检测细胞活力。结果如图4所示,与0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,随着印苦楝内酯浓度增加,细胞活力逐渐降低,并且这种效应呈显著的浓度依赖性(24 h $r=-0.979 5$, 48 h $r=-0.949 7$, $P<0.001$)。在48 h时,印苦楝内酯对NB4细胞的 IC_{50} 值为0.596 2 $\mu\text{mol/L}$ 。因此,后续实验选用0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$ 作为给药浓度。

2.3 印苦楝内酯对NB4细胞周期分布的影响

为了探究印苦楝内酯对NB4细胞周期分布的影响,使用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)的印苦楝内酯处理NB4细胞48 h,并检测细胞周期分布情况。结果



A: 交集靶点韦恩图; B: KEGG富集分析(P 值最显著的前30条通路; 红色框突出显示细胞凋亡和PI3K-Akt信号通路显著富集); C: 核心靶点韦恩图; D: 核心靶点PPI网络图(节点代表蛋白, 依据度值绘制而成, 节点越大, 颜色越深, 表示该靶点互作蛋白数目越多; 边代表蛋白间相互作用, 边越粗, 表示蛋白之间相互作用越强)。

A: Venn diagram of overlapping targets; B: KEGG pathway enrichment analysis (the top 30 pathways ranked by P -value; the red boxes highlight that the apoptosis and the PI3K-Akt signaling pathway are significantly enriched); C: Venn diagram of core targets; D: PPI network of the core targets (nodes represent proteins, which are scaled and colored based on degree values, with larger and darker nodes indicating a greater number of interacting proteins; edges represent protein-protein interactions, and thicker edges indicate stronger interactions between proteins).

图1 交集靶点、核心靶点筛选及分析

Fig.1 Identification and analysis of overlapping targets and core targets

如图5所示, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 在0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$ 印苦楝内酯处理下, G_0/G_1 期细胞的比例显著降低($P < 0.01$), G_2/M 期细胞的比例显著升高($P < 0.001$); 在0.9 $\mu\text{mol/L}$ 时, S期细胞的比例亦显著下降($P < 0.05$)。上述结果表明, 印苦楝内酯诱导NB4细胞周期阻滞于 G_2/M 期。

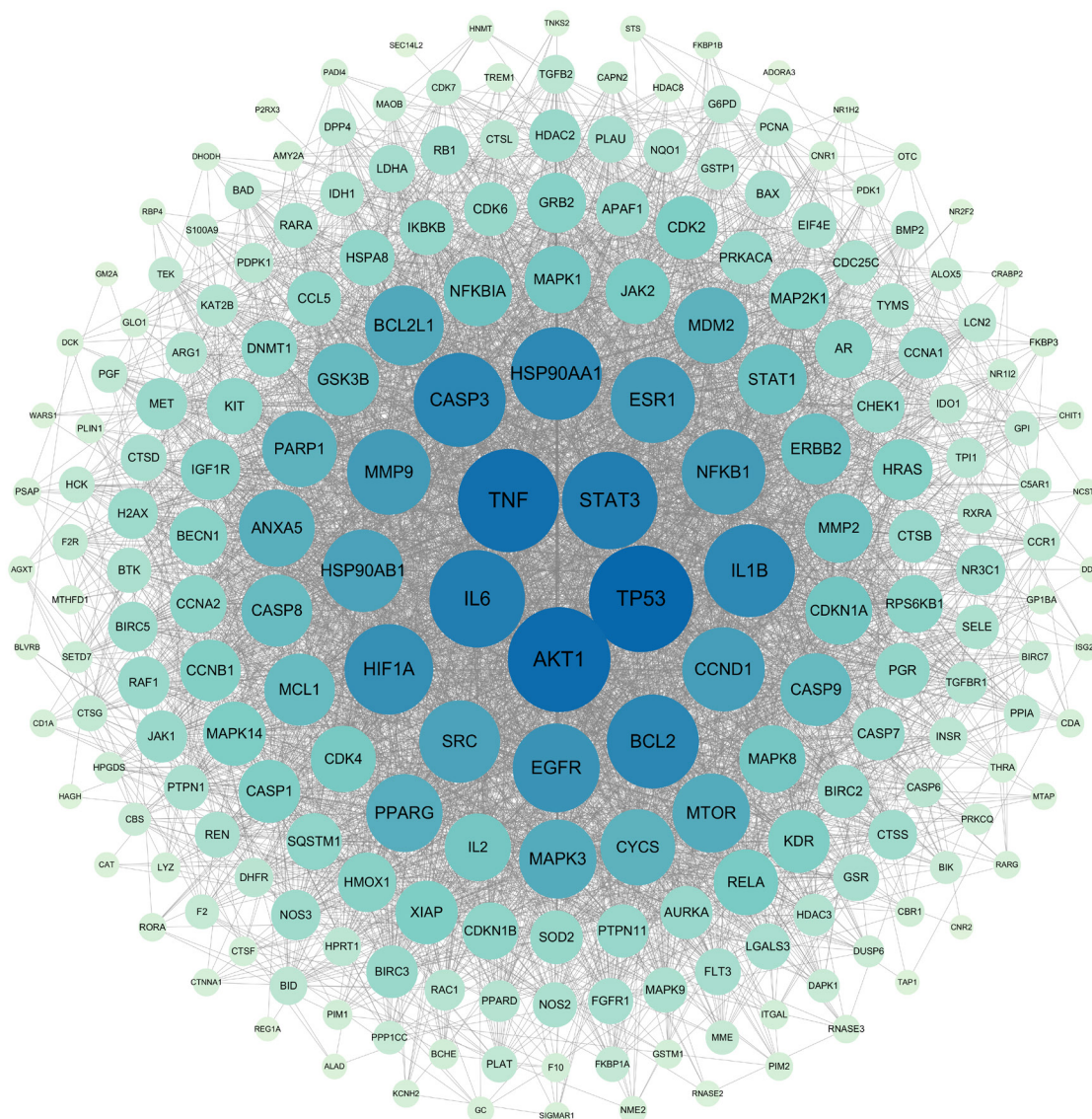
2.4 印苦楝内酯对NB4细胞凋亡的影响

为进一步研究印苦楝内酯对NB4细胞凋亡的影响, 使用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)印苦楝

内酯处理NB4细胞48 h, 收集细胞并使用流式细胞术检测凋亡细胞情况。结果如图6所示, 经印苦楝内酯处理后, NB4细胞凋亡率显著升高($P < 0.001$), 且这种促凋亡作用呈显著的浓度依赖性($r = 0.9473$)。

2.5 印苦楝内酯对NB4细胞线粒体膜电位的影响

为探究印苦楝内酯对NB4细胞线粒体膜电位的影响, 采用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)印苦楝内酯处理细胞48 h, 收集细胞并进行TMRE染



节点代表蛋白, 依据度值绘制而成, 节点越大, 颜色越深, 表示该靶点互作蛋白数目越多; 边代表蛋白间相互作用, 边越粗, 表示蛋白之间相互作用越强。Nodes represent proteins, which are scaled and colored based on degree values, with larger and darker nodes indicating a greater number of interacting proteins; edges represent protein-protein interactions, and thicker edges indicate stronger interactions between proteins.

图2 交集靶点PPI网络图

Fig.2 PPI network of the overlapping targets

色, 通过流式细胞仪检测荧光信号, 以分析细胞内线粒体膜电位水平。结果如图7显示, 随着印苦楝内酯浓度的增加, 线粒体膜电位去极化细胞比例增加 ($P < 0.001$), 且呈浓度依赖性 ($r = 0.948\ 0$), 表明经印苦楝内酯处理后, NB4细胞线粒体膜电位水平下降。

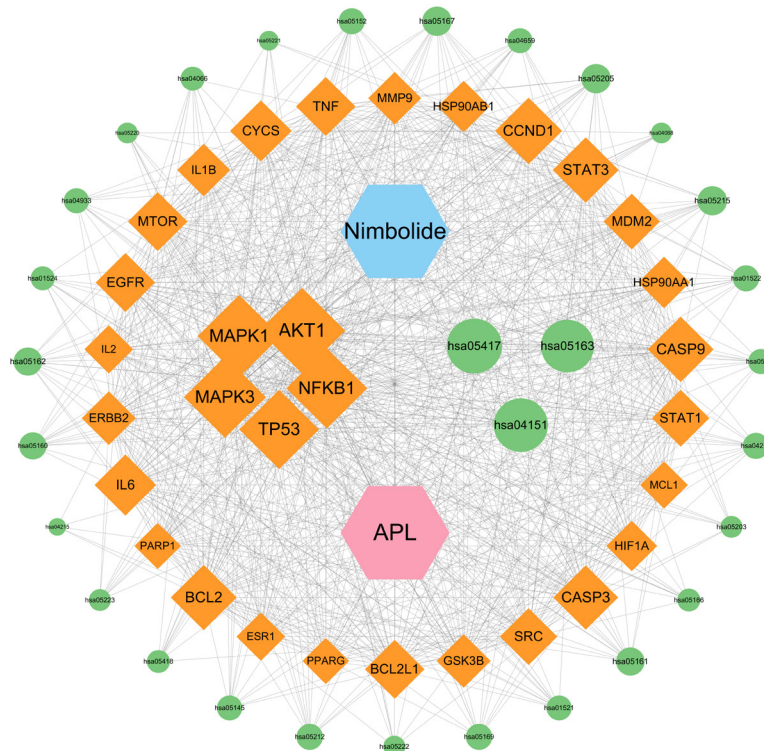
2.6 印苦楝内酯对NB4细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

为进一步明确印苦楝内酯诱导NB4细胞凋亡的作用, 使用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)的印苦楝内酯处理NB4细胞48 h, 检测细胞凋亡相关蛋白的表达水平。结果显示, 经印苦楝内酯处理

后, 细胞中 Cleaved Caspase-3 ($r = 0.905\ 0$)及 Cleaved PARP1 ($r = 0.919\ 9$)蛋白表达水平上调 ($P < 0.05$) (图8A~图8C), Caspase-3 ($r = -0.988\ 1$)、PARP1 ($r = -0.982\ 7$)及 Bcl-2 ($r = -0.988\ 7$)蛋白表达水平下调 ($P < 0.05$) (图8A、图8D~图8F), Bax蛋白表达水平没有显著变化(图8A和图8G)。

2.7 印苦楝内酯对健康人PBMC凋亡的影响

为研究印苦楝内酯对正常细胞凋亡的影响, 使用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)的印苦楝内酯处理健康人PBMC 48 h, 收集细胞并通过流式细胞术检测细胞凋亡情况。如图9所示, 与0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,

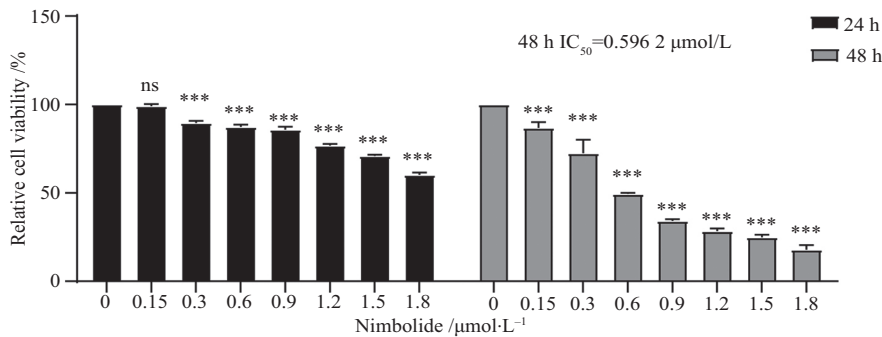


绿色节点代表通路, 橙色节点代表核心靶点; 节点越大, 表示其在该网络中越重要。

Green nodes represent pathways, orange nodes represent core targets; larger nodes indicate greater importance in the network.

图3 药物-疾病-靶点-通路网络

Fig.3 Drug-disease-target-pathway network



用不同浓度(0、0.15、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 μmol/L)印苦楝内酯处理NB4细胞24 h和48 h后的相对细胞活力。n=3, 数据以均数±标准差表示。采用双因素方差分析评估差异显著性。***P<0.001, 与0 μmol/L组相比; ns: 无显著性差异。

Relative cell viability of NB4 cells following treatment with different concentrations (0, 0.15, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8 μmol/L) of nimbolide for 24 h and 48 h. n=3, data are presented as $\bar{x} \pm s$. Statistical significance was evaluated using Two-Way ANOVA. ***P<0.001 compared with the 0 μmol/L group; ns: no significance.

图4 印苦楝内酯抑制NB4细胞增殖

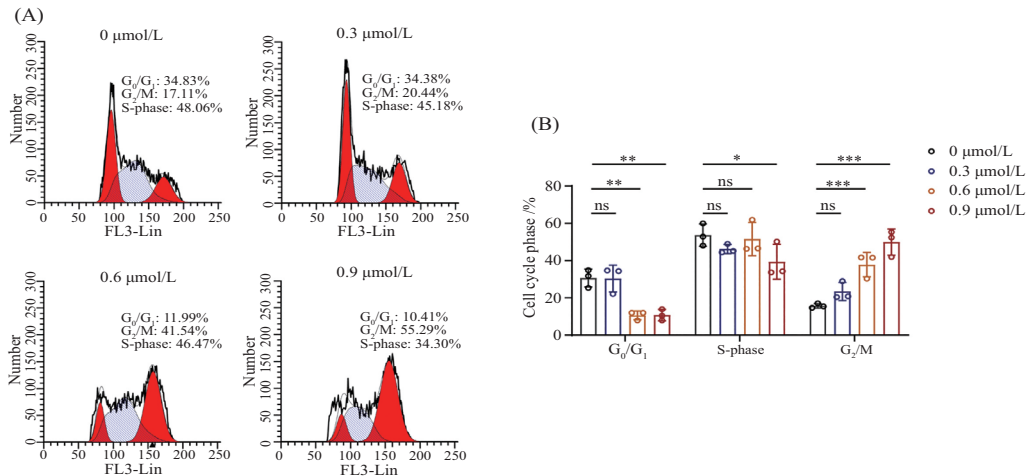
Fig.4 Nimbolide inhibits the proliferation of NB4 cells

0.3、0.6、0.9 μmol/L的印苦楝内酯处理均不会使健康人PBMC凋亡率显著增加。

2.8 印苦楝内酯对NB4细胞内PI3K-Akt信号通路的影响

网络药理学分析结果提示, PI3K-Akt信号通路在印苦楝内酯干预APL过程中具有显著意义。为研究印苦楝内酯是否影响NB4细胞内PI3K-Akt信号通路, 使

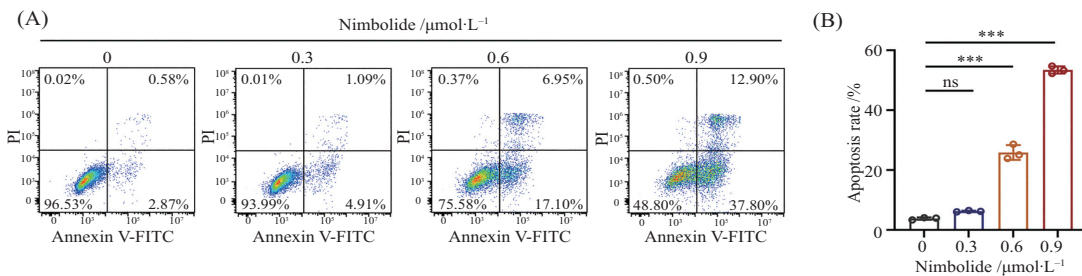
用不同浓度印苦楝内酯(0、0.3、0.6、0.9 μmol/L)处理NB4细胞48 h, 检测不同处理组细胞中Akt(Ser473)磷酸化蛋白表达水平。结果显示, 与0 μmol/L组相比, 随着印苦楝内酯浓度升高, NB4细胞中Akt(Ser473)磷酸化蛋白表达水平呈浓度依赖性下降(P<0.01, r=-0.994 5)(图10A和图10B), 而总的Akt蛋白表达水平无明显变化(图10A和图10C)。



用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 μmol/L)印苦楝内酯处理NB4细胞48 h。A: 细胞周期分布的代表性流式直方图; B: G₀/G₁、S和G₂/M期NB4细胞的百分比。数据以均数±标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ns: 无显著性差异。

NB4 cells were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 μmol/L) of nimbidin for 48 h. A: representative flow cytometry histograms of cell cycle distribution; B: percentages of NB4 cells in the G₀/G₁, S, and G₂/M phases. Data are presented as $\bar{x} \pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ns: no significance.

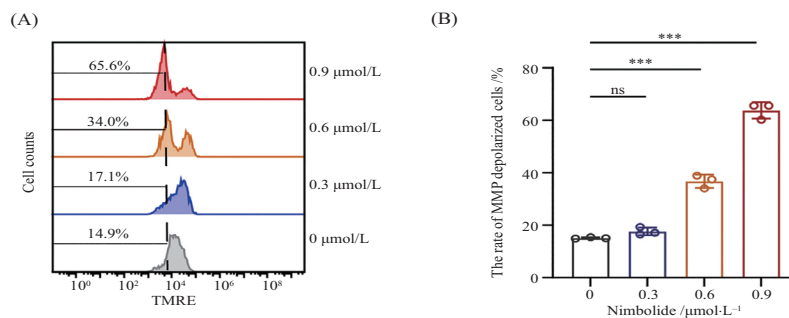
图5 印苦楝内酯诱导NB4细胞周期阻滞于G₂/M期
Fig.5 Nimbidin induces G₂/M cell cycle arrest in NB4 cells



用不同浓度(0、0.3、0.6、0.9 μmol/L)印苦楝内酯处理NB4细胞48 h。A: NB4细胞凋亡的代表性流式散点图; B: 细胞凋亡百分比(PI⁻及Annexin V⁺)。数据以均数±标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。****P*<0.001, ns: 无显著性差异。

NB4 cells were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 μmol/L) of nimbidin for 48 h. A: representative flow cytometric dot plots of NB4 apoptosis; B: the percentage of apoptotic cells (PI⁻ and Annexin V⁺). Data are expressed as $\bar{x} \pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. ****P*<0.001, ns: no significance.

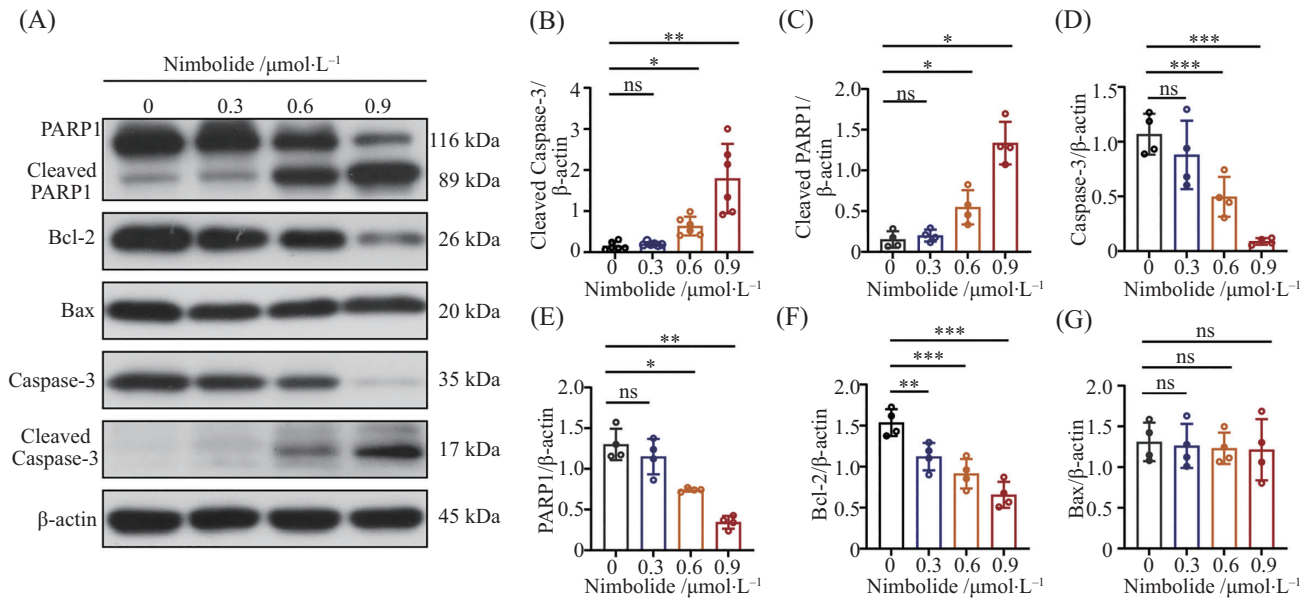
图6 印苦楝内酯促进NB4细胞凋亡
Fig.6 Nimbidin promotes apoptosis in NB4 cells



用不同浓度印苦楝内酯(0、0.3、0.6、0.9 μmol/L)处理NB4细胞48 h。A: NB4细胞线粒体膜电位的代表性流式直方图; B: 线粒体膜电位去极化细胞百分比。数据以均数±标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。****P*<0.001, ns: 无显著性差异。

NB4 cells were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 μmol/L) of nimbidin for 48 h. A: representative flow cytometric histograms of MMP in NB4 cells; B: the percentage of cells with MMP depolarization. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. ****P*<0.001, ns: no significance.

图7 印苦楝内酯下调NB4细胞线粒体膜电位
Fig.7 Nimbidin decreases MMP in NB4 cells



用不同浓度印苦楝内酯(0、0.3、0.6、0.9 μmol/L)处理NB4细胞48 h。A: NB4细胞凋亡相关蛋白表达的代表性免疫印迹图; B~G: 免疫印迹图中蛋白条带密度定量。数据以均数±标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 无显著性差异。NB4 cells were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 μmol/L) of nimbolide for 48 h. A: representative blots of apoptosis-related proteins in NB4 cells; B-G: quantification of the densitometry of the blots. Data are expressed as $\bar{x}\pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: no significance.

图8 印苦楝内酯调控NB4细胞凋亡相关蛋白表达

Fig.8 Nimbolide modulates the expression of apoptosis-related proteins in NB4 cells

2.9 SC79抑制印苦楝内酯诱导的NB4细胞凋亡率升高

接下来,本研究进一步探讨了印苦楝内酯是否通过抑制PI3K-Akt信号通路从而诱导NB4细胞凋亡。使用Akt激活剂SC79预先处理NB4细胞,随后,将细胞与印苦楝内酯共孵育48 h。结果显示,SC79能够显著抑制印苦楝内酯诱导的细胞凋亡率升高($P<0.001$) (图11A和图11B)与线粒体膜电位去极化细胞比例增加($P<0.001$) (图11C和图11D)。此外,SC79能够明显抑制印苦楝内酯诱导的细胞Cleaved Caspase-3及Cleaved PARP1蛋白表达水平的上调($P<0.01$) (图11E~图11G),同时逆转Caspase-3、PARP1及Bcl-2蛋白表达水平的下调($P<0.05$) (图11E、图11H~图11J)。

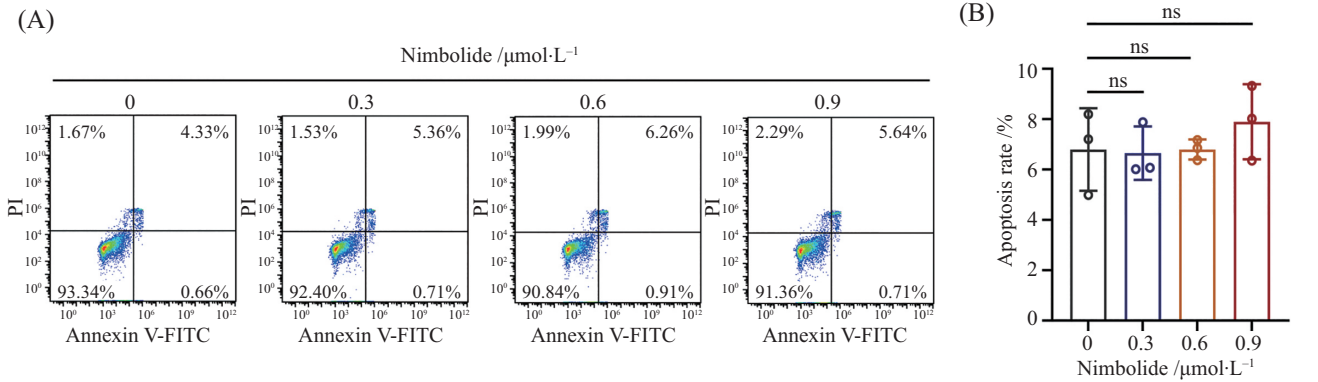
3 讨论

APL起病凶险,进展迅速,尽管目前基于全反式维甲酸联合砷剂的治疗方案提高了患者的生存率,使APL成为一种可治愈的恶性肿瘤,但仍有部分患者在接受全反式维甲酸和砷剂治疗后出现预后不佳的情况^[12]。天然植物提取物如紫草素^[13]、厚朴酚^[14]、苦参碱^[15]等,在抑制APL细胞增殖、诱导其凋亡及逆转耐药性等方面展现出潜在治疗价值。印苦楝内

酯来源于天然植物楝树,其可通过多靶点抑制多种恶性肿瘤进展,且安全性高,毒副作用小^[11,16]。

本研究通过公共数据库发现,APL与印苦楝内酯共存在225个交集靶点,KEGG通路富集分析显示,细胞凋亡、PI3K-Akt信号通路具有显著意义。通过PPI网络分析进一步筛选出32个核心靶点,其中Caspase-3、Bcl-2、PARP1等靶点与细胞凋亡密切相关,提示靶向细胞凋亡可能是印苦楝内酯干预APL的关键途径。

细胞周期的有序进行是细胞增殖的基础,其中, G_2/M 期是细胞有丝分裂启动前的重要检查点,当细胞受到DNA损伤或外源性刺激时,该检查点会被激活,从而导致细胞周期发生阻滞^[17]。本研究体外实验结果表明,印苦楝内酯能够显著抑制NB4细胞增殖,并将细胞周期阻滞于 G_2/M 期,提示其能够通过干扰细胞周期进程发挥抗肿瘤增殖作用。当细胞损伤无法修复时,检查点信号可能进一步激活促使细胞程序性死亡的相关通路^[18-19]。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,其失调与肿瘤发生发展密切相关,靶向细胞凋亡已成为重要的抗肿瘤策略^[20-21]。本研究显示,印苦楝内酯可显著促进NB4细胞凋亡。细胞凋亡分为内源性途径和外源性途径,其中,线粒体通路在内源性凋亡途径中发挥关键作用^[22]。Bcl-2家族蛋白是控制线粒

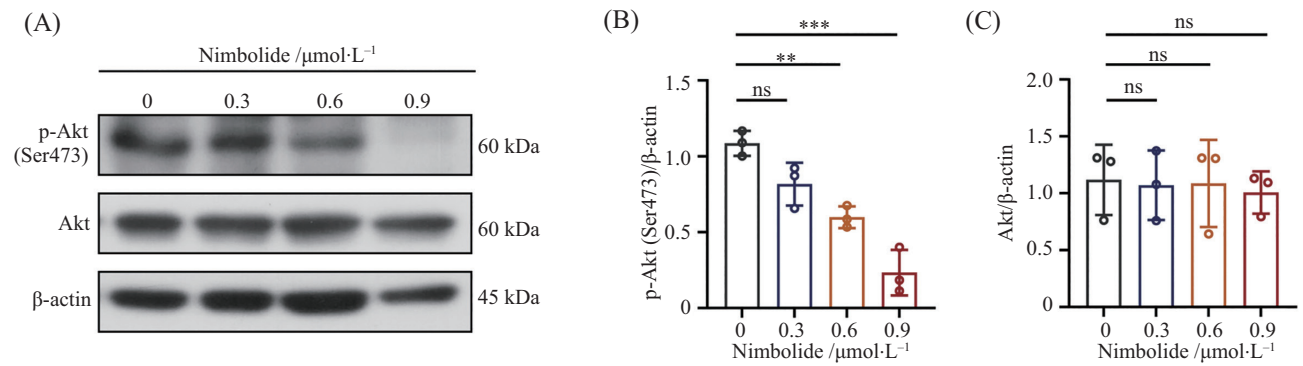


用不同浓度印苦楝内酯(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)处理PBMC 48 h。A: PBMC凋亡的代表性流式散点图; B: PBMC凋亡百分比(PI^{+} 及Annexin V⁺)。数据以均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析评估显著性差异。ns: 无显著性差异。

PBMC were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 $\mu\text{mol/L}$) of nimbolide for 48 h. A: representative flow cytometric dot plots of PBMC apoptosis; B: the percentage of apoptotic PBMC (PI^{+} and Annexin V⁺). Data are expressed as $\bar{x}\pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. ns: no significance.

图9 印苦楝内酯对健康人PBMC凋亡的影响

Fig.9 Effect of nimbolide on apoptosis of PBMC from healthy donors



用不同浓度印苦楝内酯(0、0.3、0.6、0.9 $\mu\text{mol/L}$)处理NB4细胞48 h。A: NB4细胞Akt(Ser473)磷酸化蛋白和总的Akt蛋白表达的代表性免疫印迹图; B、C: 免疫印迹图中蛋白条带密度定量。数据以均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 无显著性差异。

NB4 cells were treated with different concentrations (0, 0.3, 0.6, 0.9 $\mu\text{mol/L}$) of nimbolide for 48 h. A: representative blots of Akt (Ser473) phosphorylation and total Akt in NB4 cells; B,C: quantification of the densitometry of the blots. Data are expressed as $\bar{x}\pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: no significance.

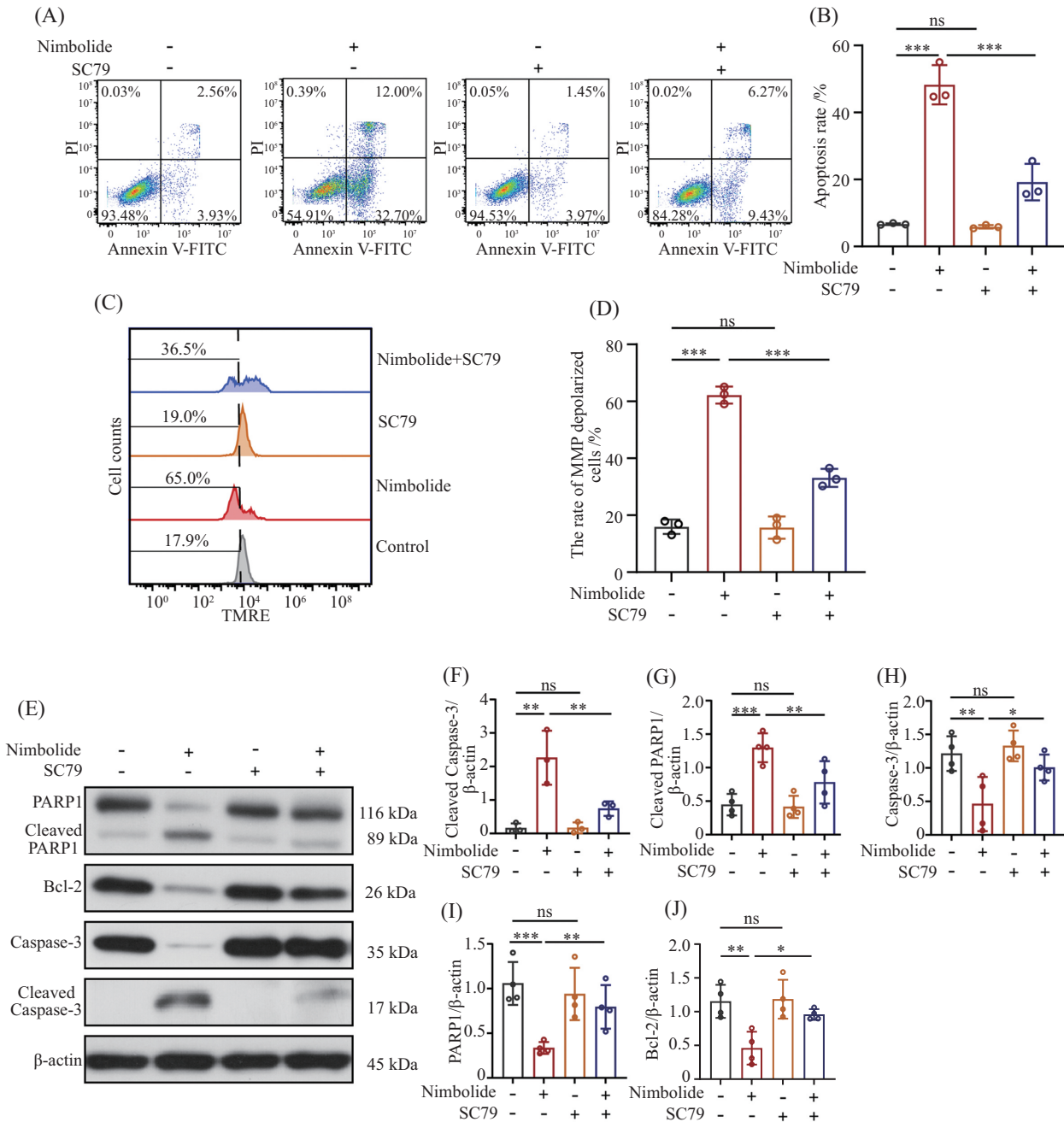
图10 印苦楝内酯抑制NB4细胞内PI3K-Akt信号通路

Fig.10 Nimbolide inhibits the PI3K-Akt signaling pathway in NB4 cells

体相关凋亡因子释放的主要调节因子, 主要包括促凋亡蛋白如Bax和抗凋亡蛋白如Bcl-2, Bcl-2家族成员之间的相互作用和平衡控制着线粒体外膜的通透性, 在凋亡信号作用下, Bcl-2家族蛋白失衡, 线粒体膜通透性增加并释放促凋亡因子细胞色素C等到胞质中, 细胞色素C与凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)形成凋亡复合体, 激活Caspase级联反应, 活化的Caspase-3进而剪切PARP1等底物, 最终导致细胞凋亡^[23-25]。在本研究中, 经印苦楝内酯处理后, NB4细胞线粒体膜电位水平下降, Bcl-2蛋白表达水平下调, Bax蛋白表达水平没有明显变化, Cleaved Caspase-3及Cleaved PARP1蛋白表达水平升高, 表明印

苦楝内酯可以通过下调NB4细胞Bcl-2蛋白表达, 增加线粒体膜通透性, 导致线粒体膜电位水平下降, 进而激活Caspase-3等下游蛋白, 最终导致细胞凋亡。此外, 相同浓度的印苦楝内酯处理不会引起健康人PBMC凋亡率升高, 显示其在体外对正常细胞有一定选择性和安全性, 为进一步研究其临床应用提供了初步依据。

PI3K-Akt信号通路作为细胞内的关键信号通路之一, 参与细胞周期、凋亡等过程, 其异常激活与肿瘤的发生发展密切相关, 是许多抗肿瘤药物的治疗靶点^[26]。APL细胞中PI3K-Akt信号通路异常激活, 多项研究表明, 抑制该信号通路可抑制APL细胞增殖, 促进其周期阻滞与凋亡^[27-29]。在本研究中, 印苦楝内酯



提前使用SC79(10 μmol/L)处理NB4细胞1 h, 之后将细胞与印苦楝内酯(0.9 μmol/L)共孵育48 h。A: NB4细胞凋亡的代表性流式散点图; B: 细胞凋亡百分比(PI⁺及Annexin V⁺); C: NB4细胞线粒体膜电位的代表性流式直方图; D: 线粒体膜电位去极化细胞百分比; E: NB4细胞凋亡相关蛋白表达的代表性免疫印迹图; F~J: 免疫印迹图中蛋白条带密度定量。数据以均数±标准差表示。采用单因素方差分析评估差异显著性。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ns: 无显著性差异。

NB4 cells were pretreated with SC79 (10 μmol/L) for 1 h and then co-incubated with nimbolide (0.9 μmol/L) for 48 h. A: representative flow cytometric dot plots of NB4 apoptosis; B: the percentage of apoptotic cells (PI⁺ and Annexin V⁺); C: representative flow cytometric histograms of MMP in NB4 cells; D: the percentage of cells with MMP depolarization; E: representative blots of apoptosis-related proteins in NB4 cells. F-J: quantification of the densitometry of the blots. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$. Statistical significance was evaluated using One-Way ANOVA. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, ns: no significance.

图11 SC79抑制印苦楝内酯诱导的NB4细胞凋亡增加

Fig.11 SC79 inhibits nimbolide-induced increase of apoptosis in NB4 cells

下调NB4细胞中的Akt(Ser473)磷酸化水平。此外, Akt激活剂SC79能够显著抑制印苦楝内酯诱导的NB4细胞凋亡率增加、线粒体膜电位去极化细胞比例增加

及凋亡相关蛋白表达水平变化。以上结果提示, 印苦楝内酯通过抑制PI3K-Akt信号通路促进NB4细胞凋亡。

本研究表明, 印苦楝内酯对APL细胞NB4具有促凋亡效应。未来, 需要探讨印苦楝内酯对原代APL细胞的作用, 并构建人源性肿瘤异种移植模型, 以评估其体内疗效与安全性。同时, 需进一步研究印苦楝内酯对耐药细胞(如NB4-LR1)的作用, 并评估其与全反式维甲酸/砷剂联合应用的协同抗肿瘤潜力, 以进一步明确其临床转化价值。

综上, 本研究结合网络药理学分析和体外实验, 揭示了印苦楝内酯能够引起急性早幼粒细胞白血病细胞NB4中的抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低以及线粒体膜电位水平下降, 从而激活线粒体途径介导的细胞凋亡, 其促凋亡效应与抑制PI3K-Akt信号通路有关。本研究结果为靶向APL的天然药物研发提供了理论和实验基础。

参考文献 (References)

- [1] YILMAZ M, KANTARJIAN H, RAVANDI F. Acute promyelocytic leukemia current treatment algorithms [J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(6): 123.
- [2] GHIAUR A, DORAN C, GAMAN M A, et al. Acute promyelocytic leukemia: review of complications related to all-trans retinoic acid and arsenic trioxide therapy [J]. *Cancers*, 2024, 16(6): 1160.
- [3] ABDDAOUI M, AGHLALLOU Y, TLEMÇANI I, et al. Acute promyelocytic leukemia: pathophysiology, diagnosis and clinical management [J]. *Hematol Rep*, 2025, 17(6): 66.
- [4] TAKAHASHI S. Reawakening differentiation therapy in acute myeloid leukemia: a comprehensive review of ATRA-based combination strategies [J]. *Curr Oncol*, 2026, 33(1): 25.
- [5] CHEN J X, DING Z Q. Natural products as potential drug treatments for acute promyelocytic leukemia [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 57.
- [6] NAGINI S, PALRASU M, BISHAYEE A. Limonoids from neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) are potential anticancer drug candidates [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(2): 457-96.
- [7] POOLADANDA V, BANDI S, MONDI S R, et al. Nimbolide epigenetically regulates autophagy and apoptosis in breast cancer [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 51: 114-28.
- [8] RAM A K, VAIRAPPAN B, SRINIVAS B H. Nimbolide inhibits tumor growth by restoring hepatic tight junction protein expression and reduced inflammation in an experimental hepatocarcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(45): 7131-52.
- [9] MAHMOUD N, DAWOOD M, HUANG Q, et al. Nimbolide inhibits 2D and 3D prostate cancer cells migration, affects microtubules and angiogenesis and suppresses B-RAF/p.ERK-mediated *in vivo* tumor growth [J]. *Phytomedicine*, 2022, 94: 153826.
- [10] SHAHEEN S, KHALID S, AALIYA K, et al. Insights into nimbolide molecular crosstalk and its anticancer properties [J]. *Med Oncol*, 2024, 41(6): 158.
- [11] NAGINI S, NIVETHA R, PALRASU M, et al. Nimbolide, a neem limonoid, is a promising candidate for the anticancer drug arsenal [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(7): 3560-77.
- [12] JIMENEZ J J, CHALE R S, ABAD A C, et al. Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(11): 992-1003.
- [13] SHAN Z L, ZHONG L, XIAO C L, et al. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and c-Myc [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3055-60.
- [14] LIU X L, GU Y, BIAN Y Y, et al. Honokiol induces paraptosis-like cell death of acute promyelocytic leukemia via mTOR & MAPK signaling pathways activation [J]. *Apoptosis*, 2021, 26(3/4): 195-208.
- [15] WU D J, SHAO K D, SUN J, et al. Matrine cooperates with all-trans retinoic acid on differentiation induction of all-trans retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells (NB4-LR1): possible mechanisms [J]. *Planta Med*, 2014, 80(5): 399-408.
- [16] BODDULURU L N, KASALA E R, THOTA N, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of nimbolide in cancer: the underlying mechanisms [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28(5): 1026-35.
- [17] HARTWELL L H, WEINERT T A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events [J]. *Science*, 1989, 246(4930): 629-34.
- [18] PIETENPOL J A, STEWART Z A. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis [J]. *Toxicology*, 2002, 181-182: 475-81.
- [19] HAIN K O, COLIN D J, RASTOGI S, et al. Prolonged mitotic arrest induces a caspase-dependent DNA damage response at telomeres that determines cell survival [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26766.
- [20] FULDA S. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: challenges and opportunities [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 20-5.
- [21] MOYER A, TANAKA K, CHENG E H. Apoptosis in cancer biology and therapy [J]. *Annu Rev Pathol*, 2025, 20(1): 303-28.
- [22] CAROPPI P, SINIBALDI F, FIORUCCI L, et al. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(31): 4058-65.
- [23] GROSS A, MCDONNELL J M, KORSMEYER S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15): 1899-911.
- [24] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 732-48.
- [25] HONG S J, DAWSON T M, DAWSON V L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(5): 259-64.
- [26] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 425.
- [27] TABELLINI G, TAZZARI P L, BORTUL R, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt inhibition increases arsenic trioxide-induced apoptosis of acute promyelocytic and T-cell leukaemias [J]. *Br J Haematol*, 2005, 130(5): 716-25.
- [28] NISHIOKA C, IKEZOE T, YANG J, et al. Blockade of mTOR signaling potentiates the ability of histone deacetylase inhibitor to induce growth arrest and differentiation of acute myelogenous leukemia cells [J]. *Leukemia*, 2008, 22(12): 2159-68.
- [29] LI Y C, QU X J, QU J L, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation [J]. *Cancer Lett*, 2009, 284(2): 208-15.