

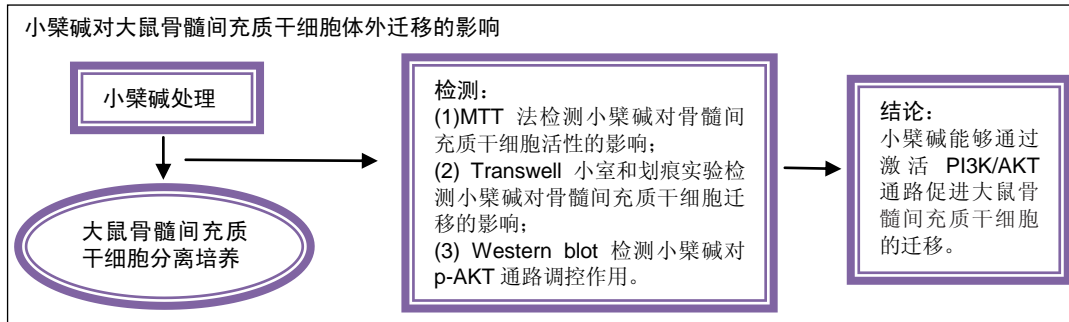
小檗碱通过激活PI3K/AKT通路促进大鼠骨髓间充质干细胞的体外迁移

李琼静¹, 罗琪² (¹广东省中医院, 广东省广州市 510120; ²萍乡市中医院, 江西省萍乡市 337000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0967

ORCID: 0000-0002-0257-9541(李琼静)

文章快速阅读:



李琼静, 女, 主要从事中药学研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

稿件接受: 2018-07-03



文题释义:

小檗碱: 属于异喹啉类生物碱, 是中药黄连中的主要生物碱。近年来研究发现, 小檗碱及其衍生物在治疗炎症、肿瘤、糖尿病、高血脂、心血管疾病、细菌和病毒感染、阿尔茨海默病等方面具有药理作用。研究表明小檗碱能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化, 然而其对骨髓间充质干细胞的迁移作用还不明确。

细胞迁移: 也称为细胞爬行、细胞移动或细胞运动, 是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质梯度后而产生的移动。细胞迁移为细胞头部伪足的延伸、新的黏附建立、细胞体尾部收缩在时空上的交替过程。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一, 是机体正常生长发育的生理过程, 也是活细胞普遍存在的一种运动形式。胚胎发育、血管生成、伤口愈合、免疫反应、炎症反应、动脉粥样硬化、癌症转移等过程中都涉及细胞迁移。

摘要

背景: 小檗碱是中药黄连的主要生物碱, 对骨髓间充质干细胞有多种活性作用。

目的: 观察小檗碱对大鼠骨髓间充质干细胞体外迁移的影响以及其作用机制。

方法: 采用全骨髓法分离培养 SD 大鼠骨髓间充质干细胞, 调整细胞浓度至 $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 备用。小檗碱用二甲基亚砜溶解, 并用含体积分数为 1% 胎牛血清的 α -MEM 培养基稀释, 分别将浓度调整为 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$ 。MTT 法检测小檗碱对骨髓间充质干细胞活性的影响, Transwell 小室和划痕实验检测小檗碱对大鼠骨髓间充质干细胞迁移的影响, Western blot 检测小檗碱对 p-AKT 通路调控作用。

结果与结论: ①小檗碱对骨髓间充质干细胞的活力无影响; ②小檗碱在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下能够显著促进骨髓间充质干细胞的迁移, 划痕实验结果与 Transwell 实验相一致; ③加入小檗碱可以促进骨髓间充质干细胞中 p-AKT 表达, 加入 p-AKT 抑制剂 LY294002 能够逆转小檗碱的促迁移作用; ④结果表明, 小檗碱能够通过激活 PI3K/AKT 通路促进大鼠骨髓间充质干细胞的迁移。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 小檗碱; 细胞迁移; p-AKT; 干细胞

主题词:

小檗碱; 骨髓; 间质干细胞; 细胞迁移分析; 组织工程

Berberine promotes the *in vitro* migration of bone marrow mesenchymal stem cells via activation of PI3K/AKT pathway

Li Qiong-jing¹, Luo Qi² (¹Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China; ²Pingxiang Hospital of Chinese Medicine, Pingxiang 337000, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Berberine as the main alkaloid of herbal *Coptis chinensis* has many pharmacological effects on bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs).

OBJECTIVE: To explore the effects and mechanism of berberine on the *in vitro* migration of BMSCs.

METHODS: Rat BMSCs were isolated and cultured by a whole bone marrow assay, and prepared into $1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. Berberine was dissolved by dimethyl sulfoxide, and diluted by α -MEM containing 1% fetal bovine serum into the concentrations of 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$. Cell migration was assessed using a Transwell chamber and cell scratch assay. Western blot assay was used to test the regulatory effect of berberine on p-AKT pathway.

RESULTS AND CONCLUSION: Berberine had no effect on the cell viability of BMSCs. Berberine at 10 $\mu\text{mol/L}$

Li Qiong-jing, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

significantly promoted the migration of BMSCs. The cell scratch assay shared consistent findings with the Transwell assay. Addition of berberine up-regulated the p-AKT expression in BMSCs, while LY294002, the inhibition of p-AKT, could effectively reverse the pro-migration effects of berberine. Overall, berberine can promote the migration of BMSCs via the activation of PI3K/AKT pathway.

Subject headings: Berberine; Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Cell Migration Assays; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是一类来源于骨髓的非造血干细胞^[1],与其他干细胞相比,其具有来源广泛、低免疫原性、多向分化能力等特点,被广泛用于移植治疗多种疾病,包括心血管疾病、神经系统疾病及骨科疾病^[2-7]。归巢是指骨髓间充质干细胞穿过内皮细胞并迁移到靶细胞或者靶器官的过程,是骨髓间充质干细胞移植成功的关键^[8-9]。但是移植后只有小部分骨髓间充质干细胞可以迁移到靶器官,进而影响到移植成功率^[10-11]。因此,具有促迁移作用的药物可能对提高干细胞移植成功率起到重要的意义。

小檗碱属于异喹啉类生物碱,是中药黄连中的主要生物碱^[12]。近年来研究发现,小檗碱在治疗炎症、肿瘤、糖尿病、高血脂、心血管疾病、细菌和病毒感染、阿尔茨海默病等多方面具有药理作用^[13-19]。研究表明小檗碱能够促进骨髓间充质干细胞的成骨分化^[20-21],然而其对骨髓间充质干细胞的迁移作用还不明确。研究表明,骨髓间充质干细胞的迁移与PI3K/AKT通路激活有关,且小檗碱能上调AKT的表达^[22-24]。实验采用Transwell系统观察小檗碱对骨髓间充质干细胞迁移的影响以及作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年6至12月在广州中医药大学重点学科楼实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 健康SPF级雌性SD大鼠12只,4-6周龄,体质量80-100 g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物质量合格号00100561。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学规定。

1.3.2 实验试剂 胎牛血清、 α -MEM、Trypsin、PBS(GIBCO公司);MTT检测试剂盒(Sigma公司);小檗碱(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Transwell系统(Milipore公司);蛋白抽提试剂盒、蛋白定量试剂盒(凯基生物技术有限公司)。AKT通路抑制剂LY-294002(Selleck Chemicals公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的分离与培养 取4-6周龄SD大鼠,颈椎脱臼处死,体积分数为75%乙醇浸泡10 min,取出置于培养皿中,用灭菌器械剪开皮肤,分离肌肉组织,取出股骨和胫骨,置于无菌PBS中,剪去骨骺端,暴露骨髓腔。用无菌10 mL注射器冲出骨髓至高压灭菌过的离心管内,1 000 r/min离心8 min,加入含体积分数为10%胎牛血清的 α -MEM培养基制备单细胞悬液,接种至塑料培养皿

中,置于37 °C、体积分数为5%CO₂恒温培养箱中培养,标记为原代骨髓间充质干细胞,当细胞达80%-90%融合时,用胰酶消化并以1:2的比例传代。

将第3代骨髓间充质干细胞接种于12孔板,细胞浓度为 5×10^7 L⁻¹,待细胞达70%-80%融合时加入成骨分化诱导液(10^{-8} mol/L 地塞米松+ 10^{-2} mol/L β -磷酸甘油+50 mg/L 维生素C)进行成骨诱导分化,每隔2 d换液1次。成骨诱导7 d时行碱性磷酸酶染色,实验步骤按照试剂盒说明书进行;成骨诱导14 d时行茜素红染色:用0.01 mol/L PBS冲洗2次,每次2 min,40 g/L多聚甲醛固定15 min;PBS冲洗2次,每次2 min,加入1 g/L茜素红Tris-HCl(pH=8.3)37 °C染色30 min,蒸馏水洗涤,晾干,镜下观察、拍照。

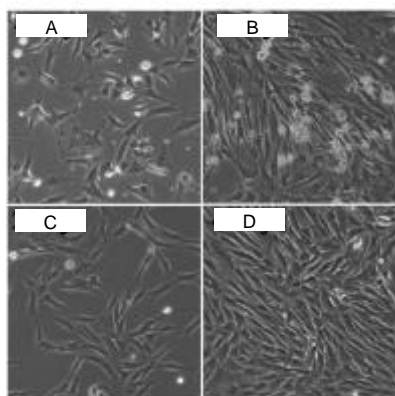
1.4.2 细胞活性检测 取第3代骨髓间充质干细胞消化接种于96孔板中,每孔接种细胞量为 1×10^4 个。当细胞生长至80%融合时,加入不同浓度小檗碱(0, 1, 3, 10 μ mol/L)干预24 h,每孔加入10 μ L MTT(5 g/L),于37 °C恒温培养箱中培养3 h,弃去上清液,加入100 μ L 二甲基亚砷溶解,摇床振荡15 min,用酶标仪检测570 nm处吸光度值。

1.4.3 骨髓间充质干细胞迁移能力检测 取第3代骨髓间充质干细胞无血清饥饿12 h,然后用150 μ L含体积分数为1%胎牛血清的 α -MEM培养基调整细胞密度,按 3×10^4 /孔加入到Transwell小室上室。将700 μ L含不同浓度小檗碱(0, 1, 3, 10 μ mol/L)的无血清 α -MEM培养基加入到下室。将Transwell小室放入37 °C恒温培养箱中培养24 h后取出,用棉球擦去上层的细胞,迁移的细胞用结晶紫染色40 min。在显微镜下,每组随机选取染色的6个区域进行计数。

另外,为了证实小檗碱是通过调控AKT通路促进骨髓间充质干细胞的迁移,加入AKT通路抑制剂LY-294002进行干预,实验设置对照组,10 μ mol/L小檗碱组,10 μ mol/L小檗碱+AKT抑制剂组,进行Transwell小室实验,在显微镜下,每组随机选取染色的6个区域进行计数。

1.4.4 划痕实验 取第3代骨髓间充质干细胞接种于6孔板中,待细胞贴壁并长满后,用枪头在每孔中央划出一条线,吸出完全培养基,加入含10 μ mol/L小檗碱的无血清培养基,分别在0, 24 h用倒置显微镜拍照,将两组照片进行对比,并用Image J软件计算迁移百分比。

1.4.5 Western blot观察小檗碱对p-AKT通路调控作用 第3代骨髓间充质干细胞加入10 μ mol/L小檗碱处理30, 60, 120 min后,采用Western blot法检测p-AKT的表达水平。用RIPA裂解液在冰上裂解细胞,15 000 r/min 4 °C离心1 min,再加入PMSF,提取细胞总蛋白并采用BCA法进行蛋白定量,然后进行电泳、转膜、5%脱脂奶粉封闭1 h后,加入p-AKT一抗4 °C孵育过夜,加入二抗室温孵育1 h,



图注: 原代培养第 4 天(A), 观察到有梭形细胞贴壁生长; 原代培养第 7 天(B), 观察到细胞呈梭形、漩涡状生长, 但仍有些杂细胞; 第 3 代细胞培养第 2 天(C), 观察到细胞形态均一, 呈梭形; 第 3 代细胞培养第 4 天(D), 观察到细胞形态均一、生长旺盛、呈漩涡状生长。

图 1 大鼠骨髓间充质干细胞的形态($\times 20$)
Figure 1 Morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 20$)

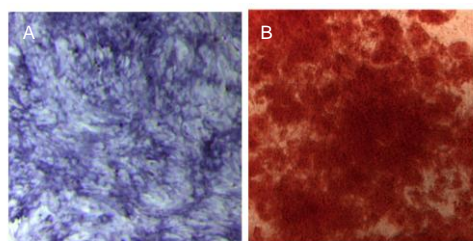


图 2 骨髓间充质干细胞的成骨分化能力($\times 20$)
Figure 2 Osteogenic ability of bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 20$)

图注: 图中 A 为成骨诱导分化 7 d, 成骨早期标志物碱性磷酸酶染色呈现蓝紫色; B 为成骨诱导分化 14 d, 有大量钙化结节产生, 茜素红染色呈鲜红色。

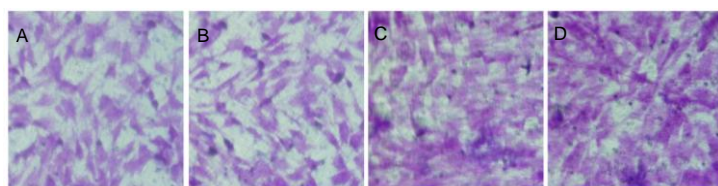


图 4 Transwell 迁移系统检测小檗碱对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响

Figure 4 Effect of berberine on the migration of bone marrow mesenchymal stem cells detected by Transwell assay

图注: 图中 A-D 分别为 0, 1, 3, 10 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱组迁移细胞结晶紫染色($\times 20$); E 为各组迁移细胞数据分析。与对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$ 。

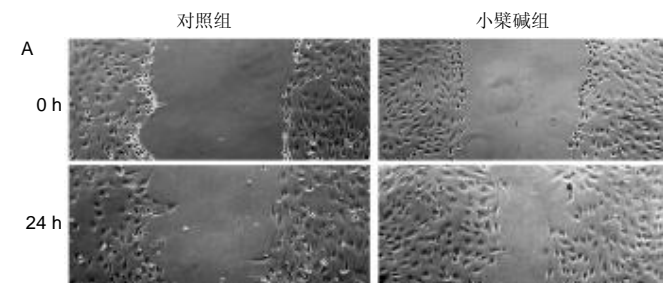
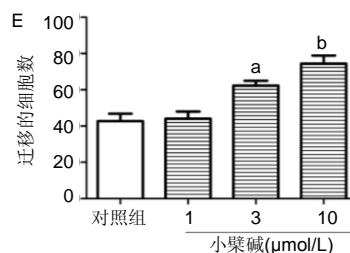


图 5 小檗碱对骨髓间充质干细胞划痕修复的影响

Figure 5 Effect of berberine on cell scratch of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: 图中 A 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 小檗碱促进骨髓间充质干细胞迁移; B 为定量分析细胞迁移百分比。与对照组比较, $^a P < 0.05$ 。

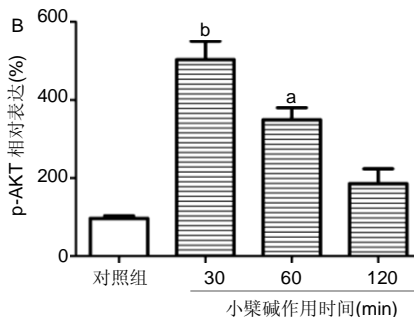
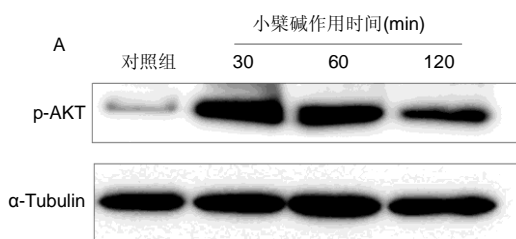
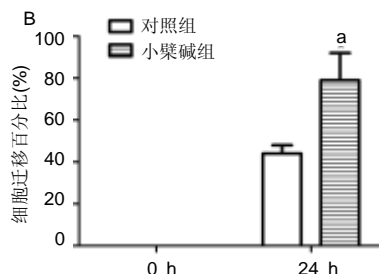


图 6 Western blot 法检测小檗碱对 p-AKT 表达水平的影响

Figure 6 Effects of berberine on AKT phosphorylation detected by western blot

图注: 图中 A 为 p-AKT 的蛋白条带; B 为条带的灰度值分析。与对照组比较, $^a P < 0.01$, $^b P < 0.001$ 。

ECL 显影, 用 Image J 计算灰度值。

1.5 主要观察指标 ①MTT 法检测小檗碱对骨髓间充质干细胞活性的影响; ②Transwell 系统检测小檗碱对骨髓间充质干细胞迁移的影响; ③划痕实验检测小檗碱对骨髓

间充质干细胞迁移的影响; ④Western blot 观察小檗碱对 p-AKT 通路的调控作用。

1.6 统计学分析 由第一作者采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

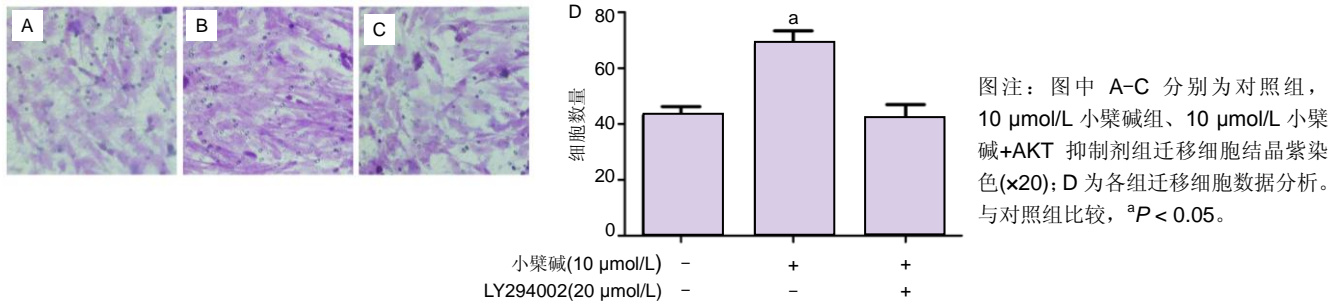


图7 小檗碱通过激活 AKT 促进骨髓间充质干细胞的迁移

Figure 7 Berberine promotes the migration of bone marrow mesenchymal stem cells by activation of AKT

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的形态 在培养初期,显微镜下可见呈纺锤形的贴壁细胞、克隆球以及悬浮细胞,培养第7天时长满培养皿。传到第3代时,悬浮细胞被完全去除,细胞呈长梭形(图1)。经成骨诱导分化7 d,成骨早期标志物碱性磷酸酶染色呈现蓝紫色;成骨诱导分化14 d,有大量钙化结节产生,茜素红染色呈鲜红色,证明骨髓间充质干细胞具有良好的成骨分化能力(图2)。

2.2 小檗碱对骨髓间充质干细胞活力的影响 与对照组相比,小檗碱在1, 3, 10 μmol/L浓度时对骨髓间充质干细胞的活力均没有显著影响($P > 0.05$), 见图3。

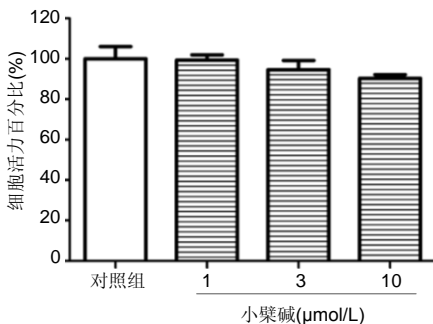


图3 小檗碱对骨髓间充质干细胞活性的影响

Figure 3 Effect of berberine on the viability of bone marrow mesenchymal stem cells

图注: MTT 法检测结果显示,与对照组相比,小檗碱在 1, 3, 10 μmol/L 浓度时对骨髓间充质干细胞的活力均没有显著影响($P > 0.05$)。

2.3 小檗碱对骨髓间充质干细胞迁移能力的影响 采用 Transwell 迁移系统检测小檗碱对骨髓间充质干细胞迁移的影响。由图4可见小檗碱组迁移到下室的细胞数明显高于对照组,说明小檗碱能够显著促进细胞的迁移,其中以 10 μmol/L 时效果最佳。另外,划痕实验结果证实,小檗碱在干预24 h时能够促进骨髓间充质干细胞的迁移,结果与 Transwell 实验相一致,见图5。

2.4 小檗碱可增加 AKT 的磷酸化水平 加入 10 μmol/L 小檗碱处理 30, 60, 120 min 后,采用 Western blot 法检测 p-AKT 的表达水平。由图6可见,加入小檗碱 30 min 后, p-AKT 的水平出现了明显的上调,而 60 min 和 120 min 后 AKT 的磷酸化水平逐渐降低,但是仍高于对照组。

2.5 小檗碱通过 AKT 通路促进骨髓间充质干细胞的迁移 为了证实小檗碱是通过调控 AKT 通路促进骨髓间充质干细胞的迁移,加入 AKT 通路抑制剂 LY-294002 进行干预。由图7可见, LY-294002 能够显著抑制小檗碱诱导的骨髓间充质干细胞迁移,说明小檗碱可能通过 AKT 通路发挥促进骨髓间充质干细胞迁移的作用。

3 讨论 Discussion

实验结果显示,小檗碱能够明显促进骨髓间充质干细胞的迁移,并且对其活力无显著影响。因此作者认为小檗碱除了具有促进骨髓间充质干细胞成骨以及提高抗氧化作用之外,还具有促进迁移的作用。

骨髓间充质干细胞在多种疾病,如心血管疾病、中枢系统疾病等治疗中展现出了巨大的潜力^[1, 25-26],但是其临床应用还存在很大争议。骨髓间充质干细胞能够迁移到靶器官以修复受损组织是移植成功的关键^[4-5, 27]。但是,只有小部分骨髓间充质干细胞能够迁移到受损的靶器官,这严重影响到骨髓间充质干细胞移植的成功率。因此,促进骨髓间充质干细胞的迁移具有重要的临床意义。

小檗碱属于异喹啉类生物碱,是中药黄连中的主要生物碱^[28-29]。研究表明,小檗碱具有多种生物活性,包括抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗凋亡以及抗自噬等。近期的研究表明小檗碱能够通过调控 Wnt 通路以及 Runx2 促进骨髓间充质干细胞向成骨分化^[11-12],而其对骨髓间充质干细胞的迁移作用尚不明确。实验采用 Transwell 小室验证了小檗碱在 10 μmol/L 浓度下能促进骨髓间充质干细胞向下室移动。采用划痕实验验证了小檗碱促进骨髓间充质干细胞向划痕处迁移。而小檗碱在该浓度下对细胞的增殖无影响,这些结果共同说明了小檗碱能促进骨髓间充质干细胞的迁移。

PI3K/AKT 通路对细胞的一系列生物活性具有重要的调节作用。AKT 的核转移影响细胞周期、生存、增殖以及细胞的干性。此外,研究指出 AKT 的激活对于干细胞的归巢有促进作用。前期的实验证明小檗碱能够上调磷酸化 AKT 的水平^[30-31]。在该实验中,小檗碱处理 30 min 后, AKT 的磷酸化水平明显提高,而 60 min 和 120 min 后 AKT 的磷酸化水平逐渐降低,但是仍高于对照组。加入 AKT 抑制剂 LY-294002 之后, Transwell 检测到骨髓间充质干细胞向下

室移动的细胞减少, 说明小檗碱促进骨髓间充质干细胞的迁移与AKT通路相关。

实验初步观察到小檗碱能够通过激活PI3K/AKT通路促进大鼠骨髓间充质干细胞的迁移, 在今后的实验中还有必要进一步验证小檗碱在体内的促迁移作用及其机制。

作者贡献: 实验设计、实施、评估为李琼静, 资料收集为罗琪。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章中的干预手段应用了小檗碱药物, 应用了 α -MEM、胎牛血清、磷酸化 AKT 抗体等试剂, 但是所有作者声明没有接受相关的经费支持, 不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用动物组织的实验方案符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp.* 2003;249:86-96.

[2] Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells.* 2014;6(2):111-119.

[3] Zhao D, Liu B, Wang B, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells associated with tantalum rod implantation and vascularized iliac grafting for the treatment of end-stage osteonecrosis of the femoral head. *Biomed Res Int.* 2015;2015:240506.

[4] Cui D, Li H, Xu X, et al. Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration of TMJ Osteoarthritis. *Stem Cells Int.* 2017;2017:5979741.

[5] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997;276(5309):71-74.

[6] Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(5):431-440.

[7] Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(4):579-592.

[8] Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 1996;84(3):359-369.

[9] Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):514-522.

[10] Bing W, Pang X, Qu Q, et al. Simvastatin improves the homing of BMSCs via the PI3K/AKT/miR-9 pathway. *J Cell Mol Med.* 2016;20(5):949-961.

[11] Wang Y, Chen J, Fan W, et al. Stromal cell-derived factor-1 α and transforming growth factor- β 1 synergistically facilitate migration and chondrogenesis of synovium-derived stem cells through MAPK pathways. *Am J Transl Res.* 2017;9(5):2656-2667.

[12] Chen M, Tan M, Jing M, et al. Berberine protects homocysteic acid-induced HT-22 cell death: involvement of Akt pathway. *Metab Brain Dis.* 2015;30(1):137-142.

[13] Zhang C, Li C, Chen S, et al. Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hormetic mechanisms involving PI3K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways. *Redox Biol.* 2017;11:1-11.

[14] Wang Z, Chen Z, Chen T, et al. Berberine attenuates inflammation associated with delayed-type hypersensitivity via suppressing Th1 response and inhibiting apoptosis. *Inflammation.* 2016;40(1):221-231.

[15] Wang SF, Wu MY, Cai CZ, et al. Autophagy modulators from traditional Chinese medicine: Mechanisms and therapeutic potentials for cancer and neurodegenerative diseases. *J Ethnopharmacol.* 2016;194:861-876.

[16] de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, et al. Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: Involvement of acetylcholinesterase and cell death. *Neurotoxicology.* 2016;57:241-250.

[17] Kumar A, Ekavali, Chopra K, et al. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur J Pharmacol.* 2015;761:288-297.

[18] Wang N, Tan HY, Li L, et al. Berberine and Coptidis Rhizoma as potential anticancer agents: Recent updates and future perspectives. *J Ethnopharmacol.* 2015;176:35-48.

[19] Ortiz LM, Lombardi P, Tillhon M, et al. Berberine, an epiphany against cancer. *Molecules.* 2014;19(8):12349-12367.

[20] Lee HW, Suh JH, Kim HN, et al. Berberine promotes osteoblast differentiation by Runx2 activation with p38 MAPK. *J Bone Miner Res.* 2008;23(8):1227-1237.

[21] Tao K, Xiao D, Weng J, et al. Berberine promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Toxicol Lett.* 2016;240(1):68-80.

[22] Sun Y, Li QF, Yan J, et al. Isoflurane Preconditioning Promotes the Survival and Migration of Bone Marrow Stromal Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(4):1331-1345.

[23] Hu YR, Ma H, Zou ZY, et al. Activation of Akt and JNK/Nrf2/NQO1 pathway contributes to the protective effect of coptisine against AAPH-induced oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2017;(85):313-322.

[24] Qin-Wei Z, Yong-Guang LI. Berberine attenuates myocardial ischemia reperfusion injury by suppressing the activation of PI3K/AKT signaling. *Exp Ther Med.* 2016;11(3):978-984.

[25] Neirinckx V, Agirman G, Coste C, et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:211.

[26] Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, et al. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc.* 2007;39(2):573-576.

[27] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell.* 2009;4(3):206-216.

[28] Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. *Phytother Res.* 2016;30(11):1745-1764.

[29] Ma ZJ, Hu SL, Wang SS, et al. Effects and underlying mechanism of berberine on renal tubulointerstitial injury in diabetic rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2016;96(38):3072-3077.

[30] Eo SH, Kim JH, Kim SJ. Induction of G₂/M Arrest by Berberine via Activation of PI3K/Akt and p38 in Human Chondrosarcoma Cell Line. *Oncol Res.* 2014;22(3):147-157.

[31] Song YC, Lee Y, Kim HM, et al. Berberine regulates melanin synthesis by activating PI3K/AKT, ERK and GSK3 β in B16F10 melanoma cells. *Int J Mol Med.* 2015;35(4):1011-1016.