

BaP通过AhR抑制BMP2诱导的间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化

安利钦 施琼 周一青 刘红霞 程瑜 张汝益 严树涓 翁亚光*

(重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文主要研究苯并芘(benzo(a)pyrene, BaP)对骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)介导的间充质干细胞C3H10T1/2细胞成骨分化的影响, 并探究这种作用的调控机制。用腺病毒Ad-BMP2感染C3H10T1/2细胞, RT-PCR检测到BMP2的表达水平显著增高($P < 0.001$), 芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)的表达则无显著差异。随后加入不同浓度BaP处理, 检测BaP对BMP2诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化的影响, 处理7天检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的染色和活性, 14天检测茜素红S染色。结果显示, BaP可以剂量依赖的方式抑制BMP2介导的ALP和钙盐沉积($P < 0.001$); Western blot检测结果显示, BaP可以剂量依赖的方式抑制BMP2诱导的p-Smad1/5/8(p-drosophila mothers against de-capentaplegic 1/5/8)及Runx2的表达($P < 0.01$, $P < 0.001$)。应用AhR拮抗剂CH223191后, 测定结果显示, 其可部分逆转BaP对BMP2诱导的C3H10T1/2细胞早晚期成骨分化及BMP2/Smad信号通路的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.001$)。该研究结果提示, BaP可通过AhR抑制BMP2介导的促进间充质干细胞C3H10T1/2细胞成骨分化, 这一过程与BMP2/Smad信号通路受到抑制有关。

关键词 苯并芘; 骨形态发生蛋白2; C3H10T1/2细胞; 芳香烃受体; 成骨分化

BaP Inhibits BMP2-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Line C3H10T1/2 through AhR

An Liqin, Shi Qiong, Zhou Yiqing, Liu Hongxia, Cheng Yu, Zhang Ruyi, Yan Shujuan, Weng Yaguang*

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of Ministry Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medicine University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of Benzo(a)pyrene on bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells line C3H10T1/2 and the regulatory mechanism involved. C3H10T1/2 cells were infected with Ad-BMP2/Ad-GFP and the expression of *BMP2* and aryl hydrocarbon receptor (*AhR*) were detected by RT-PCR. The mRNA level of *BMP2* significantly increased ($P < 0.001$), however, the the mRNA level of *AhR* did not alter significantly. Different concentration of BaP was to treat C3H10T1/2 for 7 days, detected with alkaline phosphatase (ALP) activity and ALP staining, and for 14 days, detected with Alizarin red S staining to observe the effect of BaP on BMP2-induced osteogenic differentiation. The results showed that BaP inhibited BMP2-induced ALP activity ($P < 0.001$) and calcium deposition in a dose-

收稿日期: 2017-10-13 接受日期: 2017-12-07

国家自然科学基金(批准号: 81672103、31200971)和重庆市渝中区科委科技项目(批准号: 20150109)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485938, E-mail: yaguangweng@126.com

Received: October 13, 2017 Accepted: December 7, 2017

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.81672103, 31200971) and Program of the Ministry of Science and Technology of Yu-zhong District, Chongqing (Grant No.20150109)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485938, E-mail: yaguangweng@126.com

网络出版时间: 2018-03-09 17:21:15

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1721.028.html>

dependent manner. It was also found that BaP significantly reduced the protein levels of p-Smad1/5/8 and Runx2 ($P < 0.01$, $P < 0.001$). However, when added AhR antagonists (CH223191), we found that CH223191 could partly reverse the toxicologic effects of BaP on osteogenic differentiation, at the mean while, it partly rescued the inhibition effects of BaP on BMP2/Smad signal pathway ($P < 0.05$). We concluded that BaP can inhibit BMP2-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells via AhR and it involved in BMP2/Smad signaling pathway.

Keywords BaP; BMP2; C3H10T1/2 cells; AhR; osteogenic differentiation

吸烟是影响人体健康的一个重要的危险因素^[1-3]。有研究显示,吸烟可抑制骨形成^[4],但因为香烟中成分复杂,目前对吸烟如何影响骨形成的具体机制并不明确。苯并芘(benzoapyrene, BaP)是香烟的主要有害成分之一,属于多环芳香烃类(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs),同时也是雾霾中危害性最大的有机化合物之一^[5],其可通过与芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)结合发挥其作用^[6]。随着环境问题的日益严重,暴露于苯并芘的人群不断增加^[7]。因此,研究苯并芘对骨发育的影响具有重要意义。

骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)是TGF β (transforming growth factor β)超家族成员,是目前临床应用最广泛的骨形态发生蛋白,可通过活化其下游经典的BMP/Smad信号通路和非经典的BMP-MAPK(mitogen-activated protein kinases)信号通路,促进间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨细胞分化^[8-9]。本课题组前期研究发现, BaP可抑制MSCs的自我更新和分化潜能^[10],但其对BMP2调控的间充质干细胞成骨分化的作用目前还未见报道。此外,有文献报道在转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导条件下, AhR的活化可以上调BMP/Smad信号通路中关键蛋白质Smad1的表达^[11]。因此, BaP是否影响BMP2诱导间充质干细胞成骨分化、BaP是否影响BMP2/Smad经典信号通路是本文探讨的重点。这一研究将为临床治疗苯并芘暴露人群骨缺损疾病提供了一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及重组腺病毒

小鼠C3H10T1/2细胞和人结肠癌细胞株HCT116购于ATCC(American Type Culture Collection); 重组腺病毒Ad-GFP、Ad-BMP2由本实验室前期构建保存。本实验所用的腺病毒Ad-BMP2的穿梭质粒载体

pAdTRACK前期掺入了一个表达GFP标记的独立表达框便于评估腺病毒的感染效率。因此,当细胞感染Ad-BMP2时,可以通过观察绿色荧光来了解病毒的感染情况^[12]。

1.2 材料及试剂

DMEM培养基购自Hyclone公司。胎牛血清购自美国Gibco公司。苯并芘、链霉素、青霉素、茜素红S染料、维生素C(vitamin C, Vit C)、地塞米松和 β -磷酸甘油购自Sigma公司。ALP染色试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。ALP活性检测试剂盒购自BD公司。RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司。M-MLV逆转录酶、RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。PCR引物由上海百力格有限公司合成。Runx2抗体购自CST公司。OPN抗体和OCN抗体购自Abcam公司。p-Smad1/5/8抗体和Smad1/5/8抗体均购自Santa Cruz公司。兔多克隆 β -actin抗体和山羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 主要仪器

倒置荧光显微镜购自日本Nikon公司,凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 C3H10T1/2细胞培养于含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM高糖培养基(基础培养基)中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度的无菌培养箱内培养。

1.4.2 细胞处理 接种C3H10T1/2细胞于6孔板或24孔板中,待细胞密度达到70%左右时,按照6 μ L/mL的比例加入polybrene,把Ad-GFP或者Ad-BMP2转染到C3H10T1/2细胞中,使Ad-GFP或Ad-BMP2在C3H10T1/2细胞中的感染率到30%,6 h后换基础培养基,如诱导细胞成骨分化时,则转染后换成骨诱导培养基进行培养(10 μ mol/L地塞米松、50 μ mol/L Vit C、10 mmol/L β -磷酸甘油钠、胎牛血清、100 mL/L DMEM诱导液),然后在不同的处理组分别加入不同

浓度的BaP, 3天更换1次新鲜分化培养基, 并重新加入相应剂量的BaP。

1.4.3 条件培养基的制备 接种HCT116于细胞培养皿, 细胞密度达到70%左右时加入适当滴度的Ad-BMP2, 4 h后更换无血清无双抗DMEM培养基, 分别在24 h和48 h收集培养基并离心, 4 °C保存, 两周内用完。

1.4.4 ALP染色及活性测定 接种C3H10T1/2细胞于24孔板, 待细胞密度达到70%时加入Ad-GFP或Ad-BMP2, 6 h后更换培养基, 并加入不同浓度的BaP, 培养7天后, 弃去培养基用PBS冲洗3次, 每孔加入NBT/BCIP溶液200 μ L进行ALP染色, 避光反应30 min后观察染色结果。根据试剂盒说明书进行ALP活性测定。

1.4.5 茜素红S染色 接种C3H10T1/2细胞于24孔板, 待细胞密度达到70%时加入Ad-GFP或Ad-BMP2, 6 h后换成骨诱导培养基, 并加入不同浓度的BaP, 继续培养14天进行茜素红S染色: 弃去孔板中的培养基, PBS冲洗3次, 0.05%戊二醛固定10 min, 去离子水洗3次后加入0.4%茜素红S染液染色5 min, 弃去染液, 去离子水终止反应并洗涤, 显微镜下观察并成像。

1.4.6 RT-PCR 接种C3H10T1/2细胞于6孔板, 细胞覆盖达到70%时进行不同的处理, 分别在特定时间点提取RNA, 根据试剂盒说明书逆转录成cDNA进行RT-PCR(基因检测以GAPDH为内参)。所有数值取3次重复的平均值。实验所用引物序列见表1。

1.4.7 Western blot 接种C3H10T1/2细胞于10 cm培养皿, 细胞经不同处理因素处理至需要的天数后, 用RIPA裂解液于冰上裂解细胞, 离心取上清, BCA法检测上清总蛋白浓度, 加入适量上样缓冲液(loading buffer), 煮沸10 min, 取总量50 μ g的蛋白质经过SDS-PAGE、转膜、封闭、孵一抗、洗膜、孵二抗、洗膜显影后, 成像保存。

1.4.8 数据分析 数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,

用GraphPad Prism 5软件进行独立样本t检验, 分析显著性差异, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AhR在BMP2诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化过程的表达

用Ad-GFP和Ad-BMP2感染C3H10T1/2细胞48 h后, 观察细胞的感染状态(图1A)。RT-PCR检测感染腺病毒2天后C3H10T1/2细胞BMP2和AhR的mRNA水平。在BMP2组, BMP2的表达显著高于对照组(图1B和图1C), 表明BMP2的过表达是成功的。同时, 在BMP2组, BaP的特异性受体AhR的表达与对照组相比没有统计学意义(图1D), 说明BMP2的过表达对AhR没有影响。

2.2 BaP抑制BMP2诱导的C3H10T1/2细胞的早期成骨分化

在C3H10T1/2细胞中过表达BMP2后, 再用不同浓度的BaP处理细胞7天, 与对照组相比, BaP处理组细胞的ALP染色(图2A)及ALP活性(图2B)明显减弱, 且随着BaP浓度的增大而逐渐减弱, 有一定的剂量依赖性。该结果表明, BaP可以剂量依赖的方式抑制BMP2诱导的C3H10T1/2细胞的早期成骨分化。

2.3 BaP抑制BMP2诱导的C3H10T1/2细胞的晚期成骨分化

在C3H10T1/2细胞中过表达BMP2后, 再用不同浓度的BaP处理细胞14天, 与对照组相比, BaP处理组的钙盐沉积明显减少(图3), 且有一定的剂量依赖性。该结果表明, BaP可以剂量依赖的方式抑制BMP2诱导的C3H10T1/2细胞的晚期成骨分化。

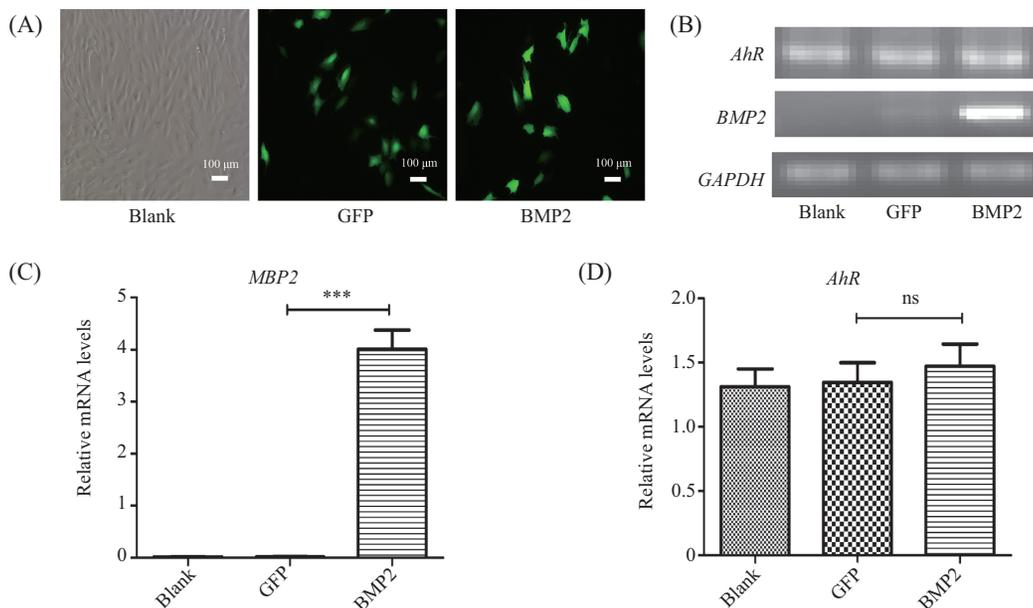
2.4 BaP抑制BMP2/Smad信号通路

用不同浓度BaP处理C3H10T1/2细胞24 h, 然后用BMP2-CM处理0.5 h, 与BMP2组相比, BaP处理组p-Smad1/5/8蛋白质水平明显降低(图4A和图4B), 且有一定的剂量依赖性; 在C3H10T1/2细胞中过表达

表1 引物序列(小鼠)

Table 1 The sequence of primers for PCR (mouse)

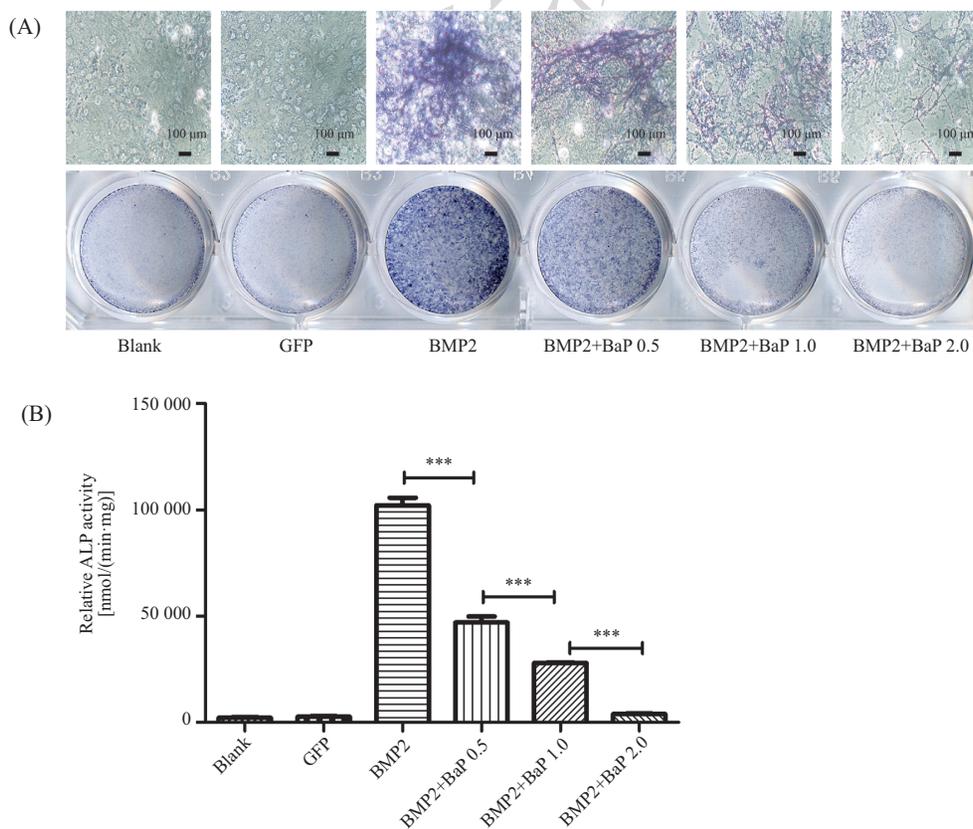
基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GAPDH	GGC TGC CCA GAA CAT CAT	CGG ACA CAT TGG GGG TAG
BMP2	GAG GAT TAG CAG GTC TTT G	GGA GTT CAG GTG GTC AGC
AhR	CTG CGC TGA AAC ATG AGC AA	AAG TCA ACC TCA CCA GCA GC



A: Ad-GFP和Ad-BMP2感染C3H10T1/2细胞48 h后荧光图; B: RT-PCR检测感染腺病毒2天后C3H10T1/2细胞BMP2和AhR的相对mRNA水平; C: 图B中BMP2的相对mRNA水平, ***P<0.001; D: 图B中AhR的相对表达水平; ns: 没有显著差异。
 A: Ad-GFP and Ad-BMP2 infected C3H10T1/2 cells for 48 h; B: tested the mRNA levels of BMP2 and AhR of C3H10T1/2 cells that infected Ad-BMP2 for 2d by RT-PCR; C: the relative mRNA level of BMP2 of B, ***P<0.001; D: the relative mRNA level of AhR of B; ns: no significant difference.

图1 在BMP2诱导的C3H10T1/2 细胞成骨分化过程中AhR mRNA水平

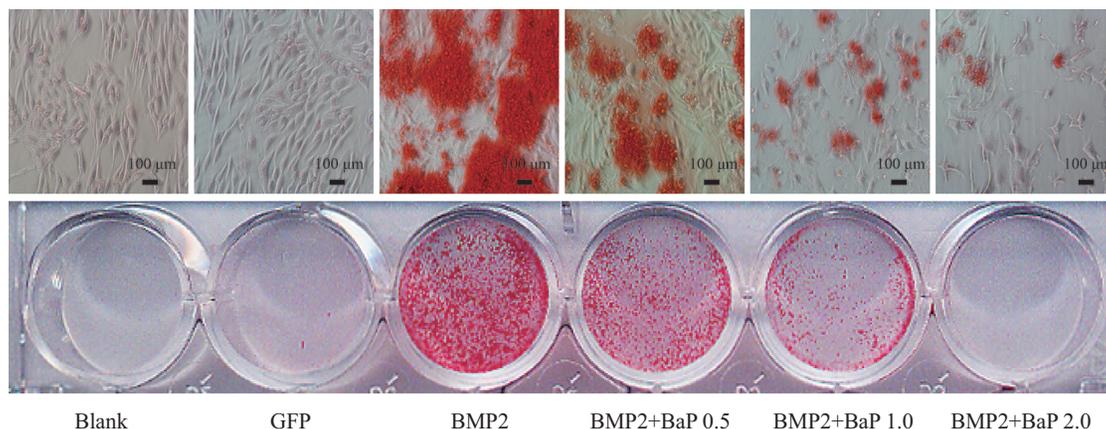
Fig.1 The relative mRNA level of AhR during BMP2-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells



A: 用不同浓度BaP(0.5、1.0、2.0 μmol/L)处理感染Ad-BMP2的C3H10T1/2细胞7天后, 检测ALP染色; B: ALP活性, ***P<0.001。
 A: tested ALP staining after transfected C3H10T1/2 cells with BMP2 and added different concentration of BaP for 7 d; B: tested ALP activity, ***P<0.001.

图2 BaP抑制BMP2诱导的C3H10T1/2细胞的早期成骨分化

Fig.2 BaP suppressed BMP2-induced early osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells



用不同浓度BaP(0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$)处理感染Ad-BMP2的C3H10T1/2细胞14天后进行茜素红S染色。

Tested Alizarin red S stain after transfected C3H10T1/2 cells with BMP2 and added different concentration of BaP for 14 d.

图3 BaP抑制BMP2诱导C3H10T1/2细胞的晚期成骨分化

Fig.3 BaP suppressed BMP2-induced the later osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells

BMP2后,再用不同浓度BaP处理细胞3天,与BMP2组相比,BaP处理组的成骨特异性转录因子Runx2蛋白质水平明显下降(图4C和图4D),且有一定的剂量依赖性,表明BaP抑制BMP2/Smad信号通路及其下游成骨因子Runx2。

2.5 AhR受体拮抗剂可部分逆转BaP对C3H10T1/2细胞早晚期分化的抑制作用

用5 $\mu\text{mol/L}$ CH223191处理C3H10T1/2细胞24 h,用BMP2诱导成骨分化的同时予以2 $\mu\text{mol/L}$ BaP处理7天,与BMP2组相比,BaP处理组细胞的ALP染色明显减弱,而加入CH223191后,ALP染色(图5A)及ALP活性(图5B)均得到一定程度的逆转。同样的条件处理细胞14天,与BMP2组相比,BaP处理组细胞的钙盐沉积明显减少,而加入CH223191后,钙盐沉积得到一定程度的逆转(图5C)。

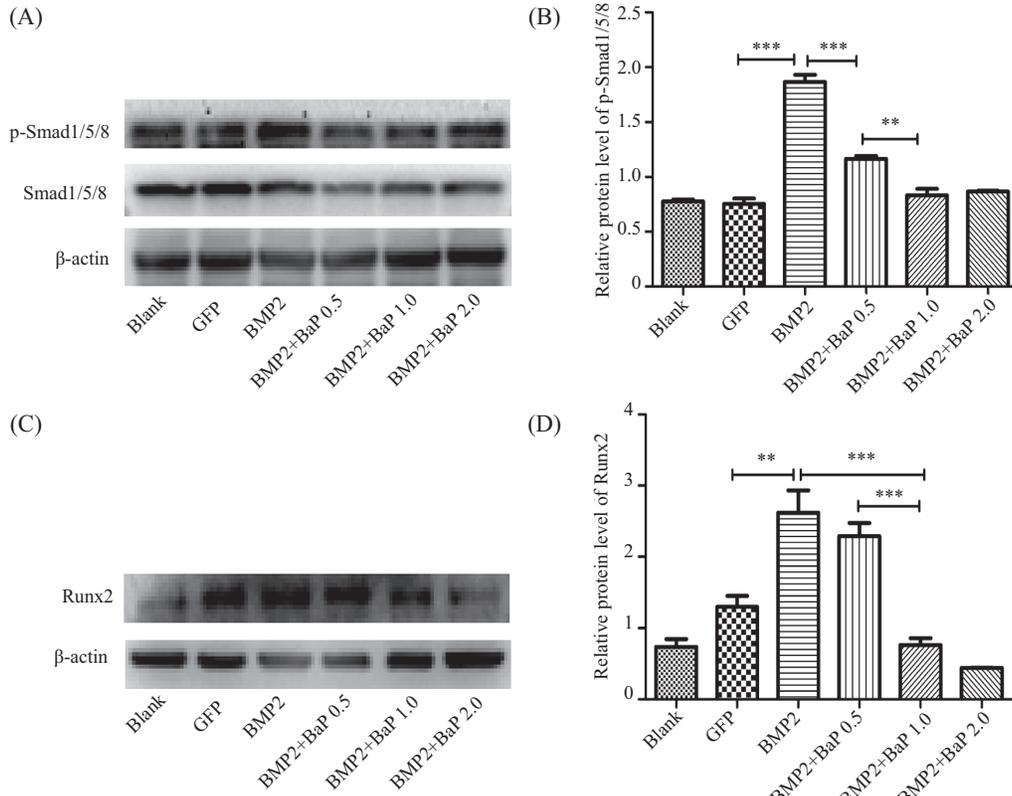
2.6 AhR受体拮抗剂可部分逆转BaP对BMP2/Smad信号通路抑制作用

5 $\mu\text{mol/L}$ 的CH223191处理C3H10T1/2细胞24 h,加入2 $\mu\text{mol/L}$ 的BaP处理24 h后,用BMP2-CM处理0.5 h,与BMP2+BaP+DMSO组相比较,CH223191处理组的p-Smad1/5/8蛋白质水平明显升高(图6A和图6B)。5 $\mu\text{mol/L}$ 的CH223191处理C3H10T1/2细胞24 h后,用BMP2诱导成骨分化的同时予以2 $\mu\text{mol/L}$ 的BaP处理3天后,与BMP2+BaP+DMSO组相比较,CH223191处理组的成骨特异性转录因子Runx2蛋白质水平明显升高(图6C和图6D)。这表明,BaP抑制BMP2诱导C3H10T1/2的成骨分化是通过AhR发挥作用的。

3 讨论

已有研究表明,吸烟可以抑制成骨、促进骨吸收,在骨修复过程中发挥负性调控作用^[4,13]。临床研究表明,吸烟可以延迟骨折愈合及脊柱融合术后融合效果^[4-15]。骨组织工程是目前骨修复与再生的研究热点,骨组织工程的主要要素包括骨种子细胞、成骨诱导因子、骨支架材料,其中种子细胞MSC为骨再生的重要的细胞学基础^[16-17]。BMP2作为一种有较好诱导MSCs成骨分化能力的成骨诱导因子,现已经被FDA批准用于临床治疗骨折^[18]。美国的一项动物实验表明,香烟烟雾中的2,3,7,8-四氯代苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin, TCDD)可以抑制BMP2诱导的大鼠的脊柱融合^[19]。另有文献指出,吸烟可以抑制BMP2诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化^[20]。而BaP作为香烟中的重要有害成分,以其致畸致突变的特点被人们熟知,但其在骨修复过程中的研究较少。一项研究表明,BaP可以通过NF- κ B(nuclear factor- κ B)信号通路激活破骨细胞促进骨吸收^[13]。另有文献表明,BaP可抑制软骨的形成^[21]以及人牙周韧带细胞的胶原形成和成骨分化^[22]。本课题组前期研究结果显示,BaP可抑制MSCs的自我更新和多项分化潜能,但其对BMP2诱导MSCs成骨分化的作用目前并未见报到。本文研究了BaP对BMP2诱导MSCs成骨分化的影响,并对其机制进行了初步探讨。

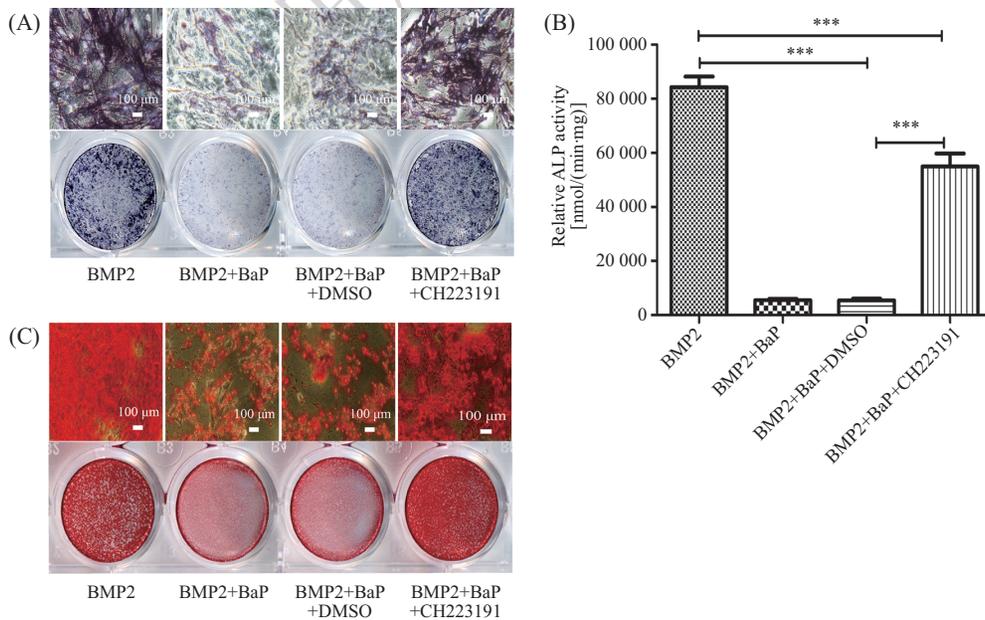
本研究结果显示,BaP可抑制BMP2诱导的C3H10T1/2成骨分化,而BMP2对BaP受体AhR的表达没有影响。BMP2诱导条件下,早晚期成骨分化指



A: Western blot检测p-Smad1/5/8蛋白质水平; B: 对A图结果的半定量分析; C: Western blot检测Runx2蛋白质水平; D: 对C图结果的半定量分析。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the protein level of p-Smad1/5/8 was tested by Western blot; B: semiquantitative analyses of A; C: the protein level of Runx2 was tested by Western blot; D: semiquantitative analyses of C; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 BaP抑制BMP2/Smad信号通路
Fig.4 BaP inhibited BMP2/Smad signal pathway

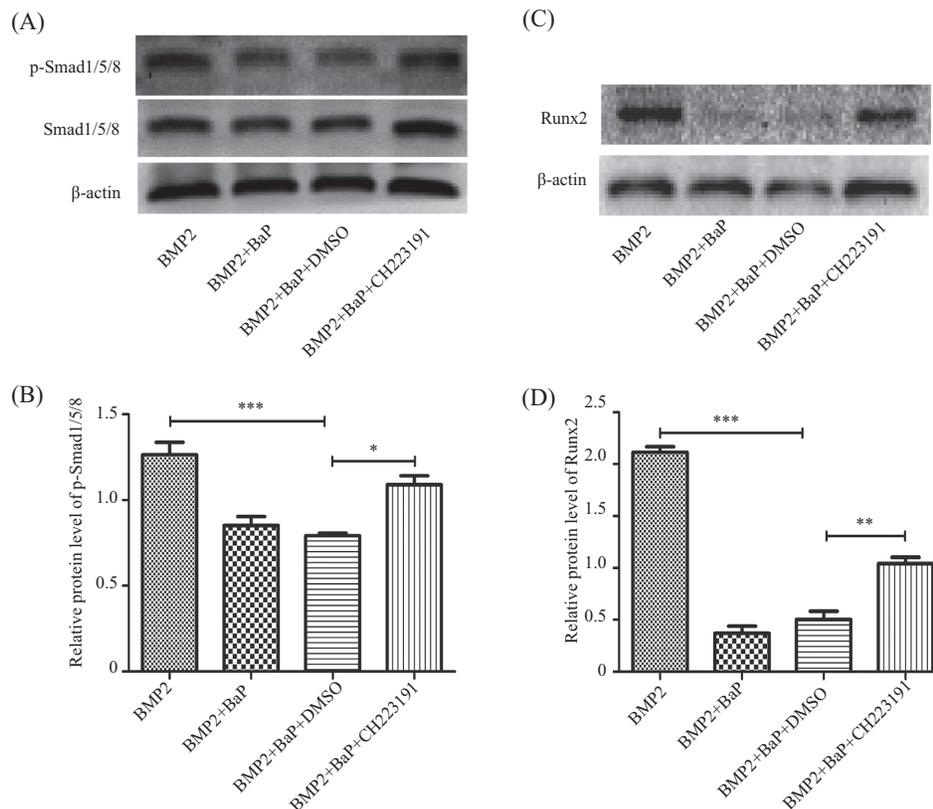


A: ALP染色结果(7天); B: ALP活性, *** $P < 0.001$; C: 茜素红染色检测钙盐沉积(14天)。

A: the result of ALP staining (7 d); B: ALP activity, *** $P < 0.001$; C: calcium deposition was detected by Alizarin red S staining (14 d).

图5 CH223191可部分逆转BaP对BMP2诱导C3H10T1/2细胞的早晚期成骨分化的抑制作用

Fig.5 CH223191 can partly rescue the toxicologic effects of BaP on BMP2-induced the early and later osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells



A: Western blot检测p-Smad1/5/8蛋白质水平; B: 对A图结果的半定量分析; C: Western blot检测Runx2蛋白质水平; D: 对C图结果的半定量分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: the protein level of p-Smad1/5/8 was tested by Western blot; B: semiquantitative analyses of A; C: the protein level of Runx2 was tested by Western blot; D: semiquantitative analyses of C; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图6 CH223191可部分逆转BaP对BMP2/Smad信号通路抑制作用

Fig.6 CH223191 can partly rescue the toxicologic effects of BaP on BMP2/Smad signal pathway

标都显著增加, 而加入不同浓度BaP之后, 早晚期成骨分化指标均受到不同程度的抑制, 一方面验证了BMP2有较强的促成骨分化能力, 同时首次表明BaP可以剂量依赖的方式抑制BMP2的促成骨分化能力。BMP2主要通过经典的Smad1/5/8信号通路调控MSCs成骨分化, 那么BaP是否影响BMP2/Smad1/5/8信号通路的激活呢? 本研究结果显示, BaP可下调Smad1/5/8蛋白质磷酸化水平以及其下游关键转录因子Runx2蛋白质水平; 加入CH223191后, BaP对BMP2诱导C3H10T1/2早晚期成骨分化指标得到部分逆转, 同时磷酸化Smad1/5/8及Runx2的水平都有一定上调, 提示BaP通过与AhR结合抑制BMP2/Smad信号通路的激活, 但是AhR拮抗剂逆转作用并不彻底, 其可能的原因有: AhR受体拮抗剂并不能完全阻断BaP与AhR的结合; BaP对BMP2诱导MSCs成骨分化的抑制作用还能通过其他多种途径。而BaP通过激活AhR抑制BMP2/Smad信号通路的深入机制目前还不清楚。本课题组前期研究发现, BaP通过激

活AhR抑制TGF- β 1/Smad4信号通路^[10]; 另外, 通过生物信息学分析我们发现, BMP2的II型受体的编码基因(*BMPRII*)是BaP的靶基因, 那么BaP是否可以通过影响BMPRII的功能从而抑制其下游的Smad信号通路的激活? 这也是我们后期需要深入研究的重点。

综上所述, 本文证实了BaP通过与AhR结合抑制BMP2/Smad信号通路的激活, 从而抑制BMP2诱导C3H10T1/2的成骨分化。

参考文献 (References)

- 1 Wipfli H, Samet JM. Global economic and health benefits of tobacco control: part 1. *Clin Pharmacol Ther* 2009; 86(3): 263-71.
- 2 Leigh JA, Kaplan RC, Swett K, Balfour P, Kansal MM, Talavera GA, *et al*. Smoking intensity and duration is associated with cardiac structure and function: the ECHO cardiographic study of hispanics/latinos. *Open Heart* 2017; 4(2): e000614.
- 3 Clark SJ, Molloy PL. Smoke-induced changes to the epigenome provide fertile ground for oncogenic mutation. *Cancer Cell* 2017; 32(3): 278-80.
- 4 Cesar-Neto JB, Benatti BB, Manzi FR, Sallum EA, Sallum AW,

- Nociti FH. The influence of cigarette smoke inhalation on bone density. A radiographic study in rats. *Braz Oral Res* 2005; 19(1): 47-51.
- 5 Martin LA, Byrd SK, Milofsky RE. Rapid communication: effects of tobacco processing on the quantity of benzo[a]pyrene in mainstream smoke. *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66(14): 1283-6.
- 6 Pieterse B, Felzel E, Winter R, van der Burg B, Brouwer A. PAH-CALUX, an optimized bioassay for AhR-mediated hazard identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as individual compounds and in complex mixtures. *Environ Sci Technol* 2013; 47(20): 11651-9.
- 7 Guerreiro CB, Horalek J, de Leeuw F, Couvidat F. Benzo[a]pyrene in Europe: ambient air concentrations, population exposure and health effects. *Environ Pollut* 2016; 214: 657-67.
- 8 Mont MA, Ragland PS, Biggins B, Friedlaender G, Patel T, Cook S, *et al.* Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A Suppl 2: 41-55.
- 9 Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, *et al.* Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 2004; 11(17): 1312-20.
- 10 Zhou Y, Jiang R, An L, Wang H, Cheng S, Qiong S, *et al.* Benzo[a]pyrene impedes self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells and influences fracture healing. *Sci Total Environ* 2017; 587/588: 305-15.
- 11 Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2010; 11(9): 846-53.
- 12 Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, *et al.* A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2007; 2(5): 1236-47.
- 13 Iqbal J, Sun L, Cao J, Yuen T, Lu P, Bab I, *et al.* Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(27): 11115-20.
- 14 Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Heckman JD, Kristiansen TK. Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clin Orthop Relat Res* 1997(337): 198-207.
- 15 Daffner SD, Waugh S, Norman TL, Mukherjee N, France JC. Effect of serum nicotine level on posterior spinal fusion in an *in vivo* rabbit model. *Spine J* 2015; 15(6): 1402-8.
- 16 Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res* 2014; 100(1 Suppl): S107-12.
- 17 Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev* 2005; 1(2): 169-78.
- 18 Henstock JR, Rotherham M, Rashidi H, Shakesheff KM, El Haj AJ. Remotely activated mechano transduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(11): 1363-74.
- 19 Hsu EL, Sonn K, Kannan A, Bellary S, Yun C, Hashmi S, *et al.* Dioxin exposure impairs BMP-2-mediated spinal fusion in a rat arthrodesis model. *J Bone Joint Surg Am* 2015; 97(12): 1003-10.
- 20 Ng TK, Huang L, Cao D, Yip YW, Tsang WM, Yam GH, *et al.* Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials. *Sci Rep* 2015; 5: 7828.
- 21 Kung MH, Yukata K, O'Keefe RJ, Zuscik MJ. Aryl hydrocarbon receptor-mediated impairment of chondrogenesis and fracture healing by cigarette smoke and benzo[a]pyrene. *J Cell Physiol* 2012; 227(3): 1062-70.
- 22 Monnouchi S, Maeda H, Yuda A, Serita S, Wada N, Tomokiyo A, *et al.* Benzo[a]pyrene/aryl hydrocarbon receptor signaling inhibits osteoblastic differentiation and collagen synthesis of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 2016; 51(6): 779-88.