

引用:朱漳帆,袁海燕,侯盛,等.细胞状态对抗 RANKL 抗体报告基因法活性检测的影响及方法优化[J].聊城大学学报(自然科学版),2026,39(3):457-463.

Citation:ZHU Weifan,YUAN Haiyan,HOU Sheng, GUO Qingcheng, XU Jin, ZHANG Dapeng, LI Jun, ZHUANG Huangzheng, REN Yule, GAO Tianyu, PAN Zhiyuan, CHEN Yi, GUO Menghui, QIAN Weizhu, GUO Huaizhu, Impact of cellular states on the activity detection of anti-RANKL antibody using a reporter gene assay: method optimization[J]. Journal of Liaocheng University (National Science Edition), 2026, 39(3): 457-463.

文章编号 1672-6634(2026)03-0457-07

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025040007

细胞状态对抗 RANKL 抗体报告基因法 活性检测的影响及方法优化

朱漳帆^{1,2},袁海燕²,侯盛^{1,2,3},郭清城^{1,2,3,4},徐进^{1,2,3},张大鹏^{1,2,3},李军^{1,2,3},
庄煌圳^{1,2},任雨乐^{1,2},高天宇^{1,2},潘志远^{1,2},陈一^{1,2},郭梦慧^{1,2},
钱卫珠^{1,2,3},郭怀祖^{1,2,3,5}

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,山东 聊城 252059;2. 国家药品监督管理局
治疗类单抗质量控制重点实验室,上海 201203;3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,
浙江 温州 325035;4. 泰州迈博太科药业有限公司,江苏 泰州 225316;5. 张江生物技术有限公司
大分子药物与规模化制备全国重点实验室,上海 201203)

摘要 报告基因法在抗核因子 κ B 受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand, RANKL)抗体(如地舒单抗)生物学活性检测中具有高灵敏度和操作便捷性,但实验常出现剂量-反应曲线拐点阶跃突变(Z型)现象,影响数据可靠性。本研究通过系统分析血清来源、消化时间、pH 值等变量,首次揭示稳定表达 NF- κ B 响应元件-荧光素酶的 Raw264.7 细胞状态是导致非典型 Z 型拐点的因素。实验表明,贴壁培养或胰蛋白酶消化可能改变细胞分化状态,影响信号通路的动态响应,进而引发拐点突变;而采用悬浮状态细胞可消除该现象,优化后曲线恢复典型 S 型平滑过渡。进一步验证实验显示,优化方法显著提升实验重复性与稳定性。本研究首次明确了稳定表达 NF- κ B 响应元件-荧光素酶的 Raw264.7 细胞状态对抗 RANKL 抗体检测体系的关键影响,提出了基于细胞状态控制的方法优化策略,为抗 RANKL 抗体活性检测的精准化及实验设计优化提供了理论依据与实践方案。

关键词 报告基因法;细胞状态;生物活性;抗 RANKL 抗体;方法优化

中图分类号 R927.1

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Impact of cellular states on the activity detection of anti-RANKL antibody using a reporter gene assay: method optimization

收稿日期:2025-04-11

基金项目:国家自然科学基金项目(22304067);上海东方英才项目(CYQN2023031);山东省自然科学基金项目(ZR2023QB257,ZR2023QB196);山东省高等学校“青创团队计划”团队(2022KJ111);光岳青年学者创新团队项目(LCUGYTD 2022-04)资助

通信作者:钱卫珠,女,汉族,博士,正高级工程师,研究方向:治疗性单抗,E-mail:weizhu.qian@sinomabtech.com;郭怀祖,男,汉族,博士,教授,博士生导师,上海产业菁英高层次人才,研究方向:抗体药物与靶向治疗,E-mail:guohuaizu@163.com。

ZHU Weifan^{1,2}, YUAN Haiyan², HOU Sheng^{1,2,3}, GUO Qingcheng^{1,2,3,4},
XU Jin^{1,2,3}, ZHANG Dapeng^{1,2,3}, LI Jun^{1,2,3}, ZHUANG Huangzhen^{1,2},
REN Yule^{1,2}, GAO Tianyu^{1,2}, PAN Zhiyuan^{1,2}, CHEN Yi^{1,2},
GUO Menghui^{1,2}, QIAN Weizhu^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,5}

(1. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 5. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Reporter gene assays are widely used for evaluating the bioactivity of anti-RANKL antibodies (e. g, denosumab) due to their high sensitivity and operational simplicity. However, the non-classical Z-shaped inflection in dose-response curves frequently observed in experiments compromises data reliability. This study systematically investigated variables such as serum sources, trypsinization time, and pH values, and identified the state of the Raw264. 7 cells modified with NF- κ B response element-luciferase as the key factor causing the Z-shaped inflection. Results demonstrated that adherent culture or trypsin digestion can alter the differentiation state of the cells, altering the dynamic response of signaling pathway and leading to abrupt transitions in curve inflection points. By contrast, using suspension-state cells eliminated this phenomenon, restoring the typical sigmoidal curve. Further validation experiments confirmed that the optimized method significantly improved reproducibility and stability. This study clarifies the critical role of the Raw264. 7 cells modified with NF- κ B response element-luciferase state in anti-RANKL antibody detection systems and proposes a cell-state-based optimization strategy, providing both theoretical and practical guidance for precise bioactivity evaluation and experimental design.

Keywords reporter gene assay; cellular state; bioactivity; anti-RANKL antibody; method optimization

0 引言

地舒单抗(Denosumab)是一种靶向核因子 κ B 受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand, RANKL)的全人源化单克隆抗体,通过高亲和力(KD $\approx$ 3 pmol/L),结合 RANKL,抑制其与受体 RANK 的相互作用,从而阻断 NF- κ B 信号通路的激活,有效抑制破骨细胞的分化与功能,显著降低骨吸收并提升骨密度,该药物在骨质疏松症、骨巨细胞瘤及肿瘤相关骨病变的治疗中展现出卓越的临床疗效和安全性文献引用^[1-6]。但其活性评价体系的精准性直接影响药物质量控制与疗效评估。

报告基因法凭借其高灵敏度、动态监测能力及操作便捷性,已成为抗体药物活性检测的核心技术之一^[7-10]。其原理是将荧光素酶等报告基因与目标信号通路调控元件融合,通过量化报告基因表达水平间接反映药物对通路的抑制或激活效应^[8-9,11]。基于此,研究者前期构建了稳定表达 NF- κ B 响应元件-荧光素酶的 Raw264. 7 细胞系(mRaw),利用 RANKL 激活 NF- κ B 通路后荧光素酶活性升高的特性,建立了一种高效检测抗 RANKL 抗体(如地舒单抗)生物学活性的方法^[12]。该体系通过剂量-反应曲线拟合计算半数抑制浓度(IC₅₀),为抗体活性评价提供了可靠平台^[12]。然而,实际检测中频繁出现剂量-反应曲线拐点处的阶跃式突变(Z 型拐点),导致典型 S 型曲线失真,严重影响了数据可靠性与模型拟合精度。

Z 型拐点可能源于实验操作误差或模型选择偏差,但优化操作参数后问题仍未解决,提示生物学因素可能是关键诱因。mRaw 细胞作为小鼠单核巨噬细胞系,其分化状态易受培养条件影响,而分化可能导致细胞表面 RANK 表达水平或信号传导效率改变,进而干扰 RANKL-抗体相互作用的动态平衡^[11,13-17]。然而,细

胞状态对该报告基因检测体系的直接影响机制尚未明确,相关研究亦未见系统报道。

本研究首次从细胞状态角度切入,系统探究了血清来源、消化时间、pH 平衡等变量对 mRaw 细胞状态及检测结果的影响^[18]。通过形态学观察、流式细胞术及活性检测实验,揭示了贴壁培养或胰蛋白酶消化诱导的细胞状态变化是导致 Z 型拐点的核心原因,破坏剂量-反应的连续性;而采用状态均一的悬浮细胞可恢复典型 S 型曲线,显著提升实验重复性。这一发现不仅解决了长期困扰实验的技术难题,更为抗体活性检测体系的标准化提供了理论依据,凸显了细胞微环境调控在生物检测中的关键作用。研究结果为抗 RANKL 抗体的精准评价及类似报告基因法的优化设计提供了创新性策略。

1 材料与方法

1.1 样品及细胞

地舒单抗由中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达,由泰州迈博太科药业有限公司提供。Raw264.7/NF- κ B-Luc 细胞(mRaw)为本实验室构建的稳定转染细胞系,通过将 NF- κ B 响应元件与荧光素酶基因融合的质粒转入 Raw264.7 细胞,并经加压筛选及单克隆化获得。

1.2 主要仪器及试剂

化学发光仪(Promega);流式细胞仪(BD FACS Canto II);RANKL 蛋白(上海迈泰君奥生物技术有限公司);1640/DMEM 培养基(上海迈泰君奥生物技术有限公司);Bright-Glo 荧光素酶检测试剂盒(Promega);潮霉素 B(Promega);RANKL/TRANSCEND/TNFSF11 兔源多克隆抗体(碧云天);荧光标记羊抗兔-FITC(Thermo);胰蛋白酶(VWR);胎牛血清(FBS)(Excell 及 Gibco);96 孔白底培养板(Greiner);抗酒石酸酸性磷酸酶 TRAP 染色试剂盒 TRAP Staining Kit(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与状态控制。细胞复苏与传代:从液氮中复苏 mRaw 细胞,37 °C 水浴解冻后转移至预热的含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640/DMEM 完全培养基中,于 37 °C、8% CO₂ 调节下进行贴壁培养。待细胞汇合度达 80%~90% 时,使用无菌 PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞单层,以去除代谢副产物。使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液进行消化处理(显微镜下观察细胞变圆后终止)。重悬计数后按需接种,维持常规培养条件,并加入 20 μ g/mL 的潮霉素 B。

分化状态分组:贴壁细胞组:常规胰蛋白酶消化后接种,维持贴壁状态培养;悬浮细胞组:直接吹打未消化细胞,避免贴壁诱导分化;混合细胞组:贴壁细胞与悬浮细胞按 1:1 比例混合接种。

1.3.2 生物学活性检测。细胞接种与处理:将 mRaw 细胞以 1.5×10^5 cells/mL 的密度接种于 96 孔白色培养板中(100 μ L/孔),37 °C、8% CO₂ 孵育 18~20 h。随后加入梯度稀释的地舒单抗(20 μ g/mL 起始,连续 2 倍稀释 8 个浓度)及 1 μ g/mL RANKL 工作液,37 °C 孵育 5 h。

荧光素酶检测:吸弃 100 μ L 上清,加入 100 μ L Bright-Glo 试剂,室温避光静置 20 min 后测定相对光单位(RLU)。

数据分析:采用四参数 logistic 回归模型拟合剂量-反应曲线,计算半数抑制浓度(IC₅₀)等关键参数。

1.3.3 实验变量系统性探究。显色操作优化。上清处理:对比“吸弃 100 μ L 上清后加显色液”与“直接加显色液”对 RLU 的影响。震荡均一性:显色后分别进行震荡(洗板机 30 s)与静置处理,评估信号稳定性。

细胞状态关键变量分析。血清来源:分别使用 Excell 与 Gibco 血清配制培养基,观察细胞生长状态及检测曲线特征。pH 平衡:将稀释液于 37 °C、8% CO₂ 条件下预平衡 45 min,对比未平衡组的检测结果差异。消化时间效应:通过流式细胞术检测贴壁与悬浮细胞的 RANKL 表达水平(一抗 1:100,二抗 FITC 标记),分析细胞状态对表面分子的影响。

形态学与分子表征。显微镜观察:分别记录贴壁与悬浮细胞的形态特征(如伪足延伸、细胞圆度)。流式细胞术:通过前向散射(FSC)与侧向散射(SSC)设门排除碎片,定量分析 RANKL 阳性细胞比例及平均荧光强度(MFI)。TRAP 组织化学染色法:通过试剂盒检测细胞内的 TRAP (抗酒石酸酸性磷酸酶)活性,可以特异性地识别已分化细胞。在实验中,TRAP 染色工作液中的底物与 TRAP 酶发生反应,生成红色或紫色

的颗粒状沉淀,从而标记出 TRAP 阳性的细胞,可以用于观察已分化细胞的形态和定位其酶活性。

优化后方法学确认。两名独立操作人员分别采用优化后的条件进行实验。细胞处理:直接使用未消化悬浮细胞接种,避免胰蛋白酶诱导分化;检测流程:显色前吸弃上清并平衡 pH(37 ℃、8% CO₂, 45 min),显色后静置检测;重复性评估:记录三次独立实验的 IC₅₀ 值及曲线拟合度(R²),确认方法稳定性。传统方法:将 RANKL 稀释至 400 ng/mL 作为稀释液,用稀释液将抗 RANKL 抗体稀释至 2 000 ng/mL,两倍比稀释 10 个浓度,100 μL/孔加入 96 孔板,收集细胞并调整密度为 5.0×10⁴/mL,孵育 72 h,显色时吸除培养基,加入柠檬酸缓冲液 100 μL/孔,室温孵育 5 min 后每孔 100 μL 加入 PNPP-Na 室温孵育 10 min,之后加入终止液 0.5 mol/L NaOH 50 μL/孔,用酶标仪检测其 A405~A570 值。

1.4 数据处理

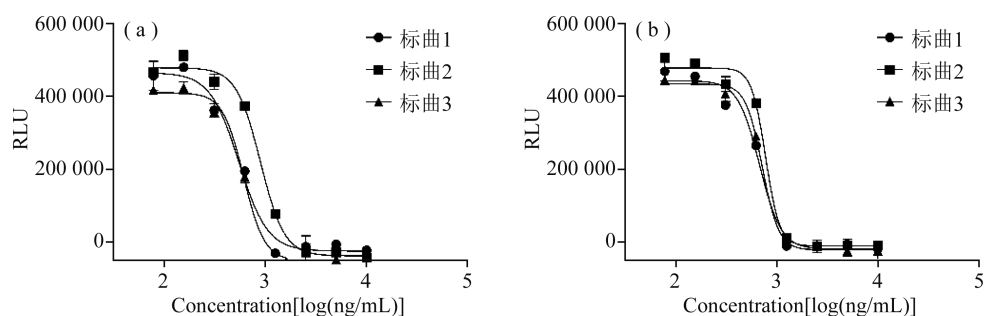
利用 GraphPad Prism8.0.1 分析软件对数据进行处理。

2 结果与讨论

本研究通过系统性实验设计,揭示了 mRaw 细胞分化状态对抗 RANKL 抗体(地舒单抗)报告基因法活性检测中剂量-反应曲线拐点阶跃突变(Z 型拐点)的关键影响,并提出优化策略。

2.1 实验变量因素对检测结果的影响

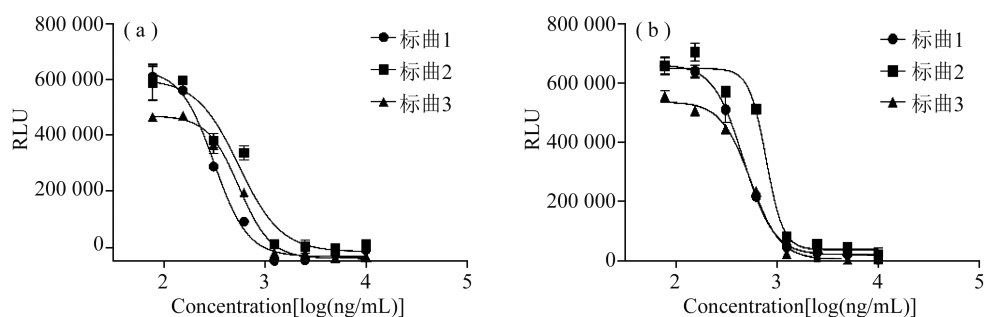
为探究 Z 型拐点的潜在技术原因,本研究首先考察了显色操作中的关键步骤。结果显示,显色前是否吸弃培养基[图 1(a-b)]以及显色后是否震荡[图 2(a-b)]对曲线形态无显著影响,表明操作误差并非 Z 型拐点的主要诱因。此外,不同来源血清的对比实验显示,尽管不同来源血清对响应区间和重复性有一定影响[图 3(a-b)],可以用于后续方法学优化,但两者均未直接引发拐点突变,提示血清来源虽影响细胞生长状态,但非影响 Z 型拐点的核心因素。



注:(a) 吸弃 100 μL 上清后加入显色液;(b) 直接加入显色液。

图 1 显色时培养基不同处理方式对检测曲线的影响

Fig. 1 Effect of medium treatment methods during chromogenic reaction on dose-response curves



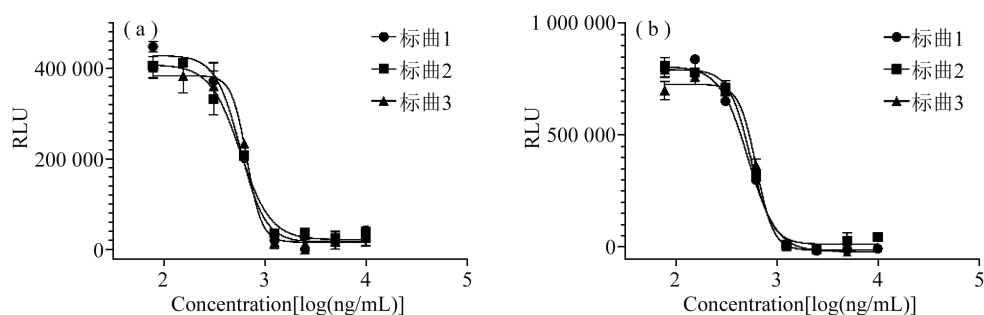
注:(a) 显色后静止处理;(b) 显色后震荡。

图 2 显色后震荡操作对检测结果的影响

Fig. 2 Effect of post-development agitation on assay consistency

值得注意的是,培养液 pH 值的平衡处理显著改善了检测结果的稳定性。未平衡 pH 的组别[图 4(a)]出现明显的拐点阶跃突变,而平衡后[图 4(b)]曲线恢复典型 S 型过渡,表明 pH 波动可能通过干扰细胞代

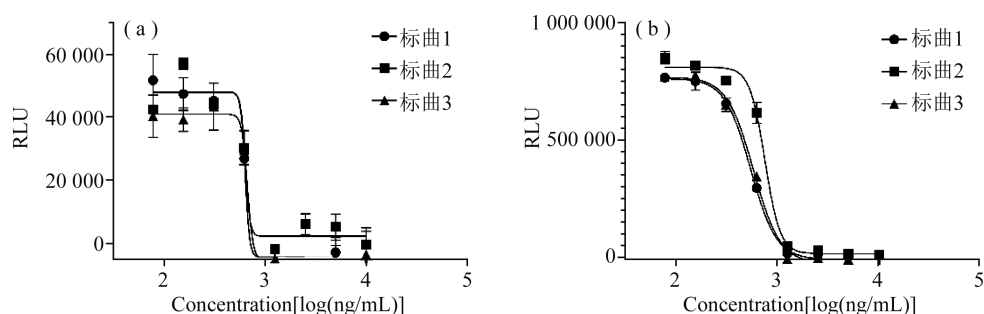
谢或信号通路动态响应间接影响检测结果。这一发现提示,实验体系需严格标准化以避免环境参数波动带来的干扰。



注:(a) Excel 血清培养组;(b) Gibco 血清培养组。

图3 不同血清来源对检测曲线的影响

Fig. 3 Comparison of serum source on assay performance



注:(a) 未平衡 pH 组;(b) 平衡 pH 组。

图4 pH 平衡处理对检测曲线稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH equilibration on assay stability

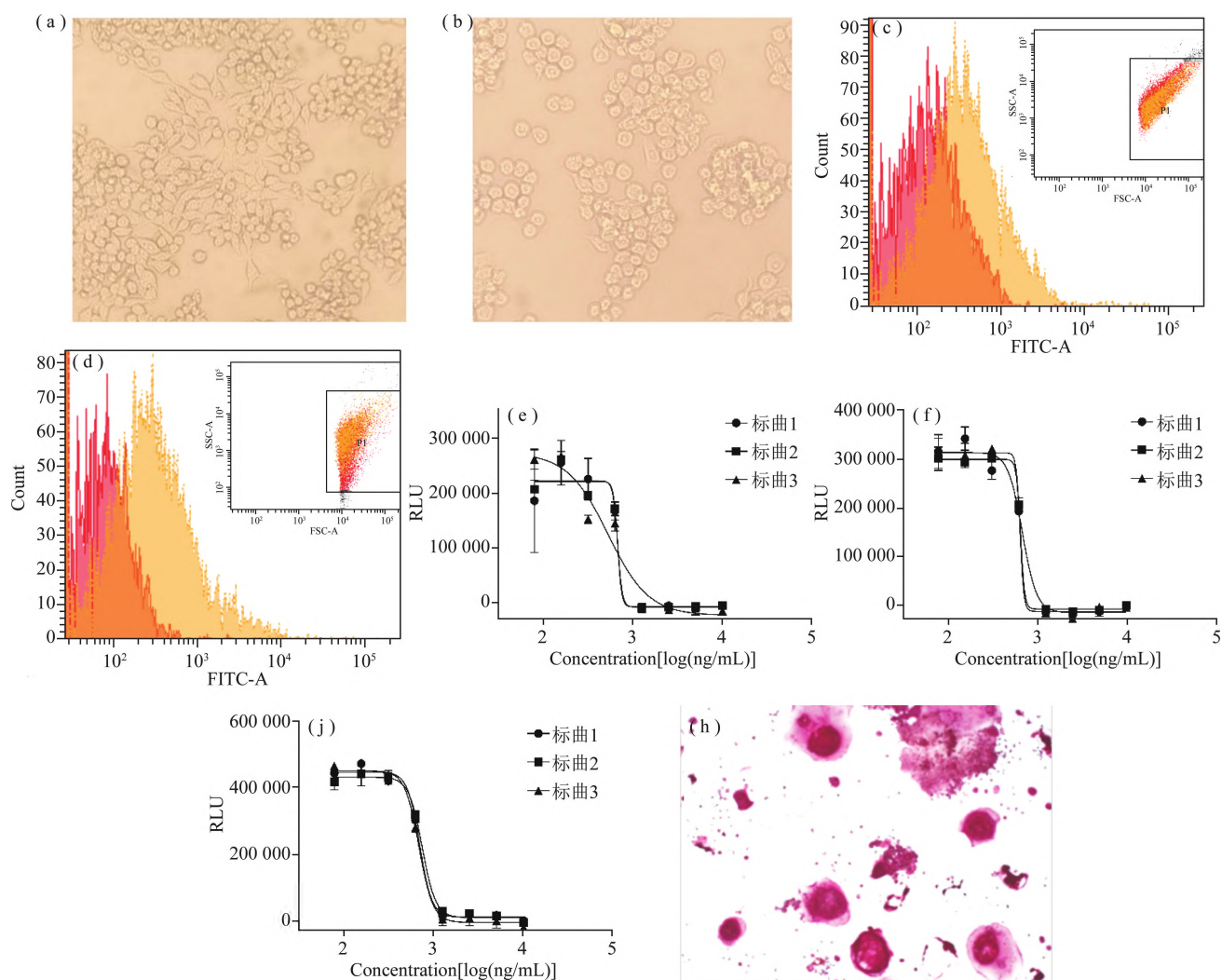
2.2 细胞状态是导致 Z 型拐点的核心因素

通过形态学观察与流式细胞术分析,本研究首次揭示了 mRaw 细胞分化状态与 Z 型拐点的直接关联。贴壁培养或胰蛋白酶消化的细胞[图 5(a,d,e,h)]表现出不均一的细胞形态特征:细胞形态不规则、表面分化标志物表达升高,且剂量-反应曲线呈现显著阶跃突变,TRAP 染色实验中细胞形成多核细胞,体积增大,颜色呈现红色。相比之下,未消化的悬浮细胞图[5(c,g)]状态比较均一,RANKL 表达稳定,检测曲线恢复平滑 S 型[图 5(g)]。混合培养组(50%贴壁+50%悬浮,图 5(f)的中间表型进一步证实,细胞状态的不均一比例与拐点突变程度呈正相关。

mRaw 细胞在分化状态下表面 RANKL 表达增高。我们通过流式检测不同状态下的 mRaw 细胞证明了消化获得的细胞表面 RANKL 表达高于未消化的 mRaw 细胞,表明消化的细胞中分化细胞占比高于未消化的细胞。检测细胞中 RANKL 表达改变可能影响 RANKL-RANK 结合竞争性抑制效率。地舒单抗的高亲和力($KD \approx 3 \text{ pmol/L}$)加剧了这一非线性响应,最终表现为 Z 型拐点。本研究首次通过实验验证了细胞状态对 RANKL/RANK 信号传导动态平衡的干扰,为同类检测体系的优化提供了理论依据。

2.3 方法优化与确认

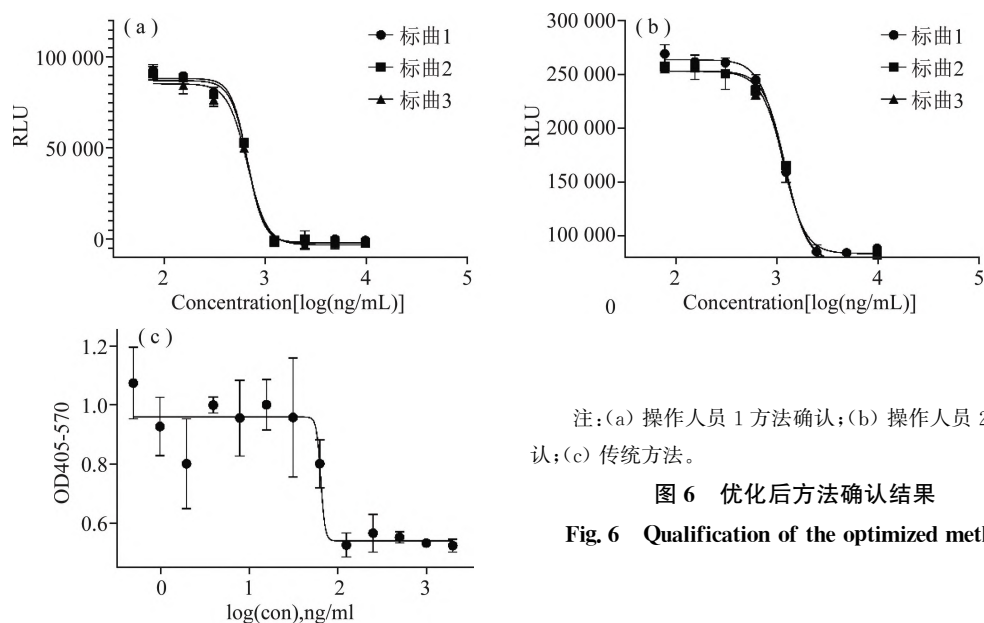
基于上述发现,本研究提出采用悬浮细胞或严格控制贴壁细胞培养条件的优化方案。确认实验表明,使用未分化悬浮细胞时,两名操作人员独立获得的剂量-反应曲线均呈现典型 S 型[图 6(a-b)],且重复性显著提升。此外,pH 平衡与血清来源的联合应用进一步增强了实验稳定性。与传统方法相比较[6(c)],优化后的方法显著提升了方法的精密度,不仅解决了长期存在的技术难题,提升了检测可重复性,其灵敏度和传统方法一致,符合报告基因法的性能表现,且操作周期更短、成本更低,凸显其应用潜力。



注:(a) 贴壁细胞形态;(b) 悬浮细胞贴壁形态;(c) 悬浮细胞流式分析;(d) 贴壁细胞流式分析;(e) 贴壁细胞检测结果;(f) 混合培养组;(g) 悬浮细胞检测结果;(h) 贴壁细胞 TRAP 染色。

图 5 细胞状态与 Z 型拐点的关联机制

Fig. 5 Correlation between cellular states and Z-shaped inflection



注:(a) 操作人员 1 方法确认;(b) 操作人员 2 方法确认;(c) 传统方法。

图 6 优化后方法确认结果

Fig. 6 Qualification of the optimized methods

3 结论

本研究通过系统性分析实验变量与细胞状态的关系,首次揭示了 mRaw 细胞分化状态对抗 RANKL 抗体(地舒单抗)报告基因法活性检测中剂量-反应曲线 Z 型拐点现象的核心影响机制。实验表明,贴壁培养或胰蛋白酶消化诱导的细胞分化状态显著改变 RANKL/RANK 信号通路的动态响应,导致检测曲线呈现非典型阶跃突变;而采用均一状态的悬浮细胞可恢复典型 S 型曲线,提升检测的准确性与重复性。通过优化培养条件(如 pH 平衡、血清来源选择)及优先使用悬浮细胞,本研究成功建立了一种稳定、高效的检测方法,其灵敏度与重复性与现有 NF- κ B 报告基因法性能相当,且操作周期更短、成本更低,为抗 RANKL 抗体药物的质量控制提供了可靠的技术支持。本研究不仅解决了长期困扰实验的技术难题,更为抗体药物研发与质量控制提供了理论与实践双重指导,具有重要的科学价值与生产质控应用前景。尽管本研究基于 mRaw 细胞,但其他巨噬细胞系或成骨细胞系在检测 RANKL 信号时,贴壁培养也可能诱导分化并影响检测线性。未来可验证该策略在不同模型中的适用性,但现有结果表明,通过控制细胞状态提升检测稳定性的思路具有广泛推广潜力。

参 考 文 献

- [1] 孙梓威,吴哲宇,张罗晟,等. 地舒单抗在骨巨细胞瘤新辅助治疗中的应用研究进展[J]. 脊柱外科杂志, 2023,21(3): 196-202.
- [2] 夏维波. 地舒单抗在骨质疏松症临床合理用药的中国专家建议[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2020, 13(6): 499-508.
- [3] CHAWLA S, BLAY J Y, RUTKOWSKI P, et al. Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: a multicentre, open-label, phase 2 study[J]. The Lancet Oncology, 2019,20(12): 1719-1729.
- [4] 姜平,赵佳男,魏凯,等. 地舒单抗治疗类风湿关节炎患者骨质疏松症有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(9): 1928-33.
- [5] 赵俊,全香花,张传洲,等. 地舒单抗致低钙血症 41 例病例报告分析[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(21): 2222-2226.
- [6] 周瑾,杨晓姣,赵振宇. 地舒单抗与阿仑膦酸盐治疗骨质疏松症的药理学对比评价文献研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(11): 2635-2640.
- [7] 俞露,刘玉林,朱秋媚,等. 报告基因法检测人生长激素生物学活性[J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36(5): 594-598.
- [8] 刘荔桢,王灿,邵泓. 报告基因法在生物技术药物活性检测中的应用[J]. 中国药师, 2021, 24(7): 349-352.
- [9] 贾小飞,梁明征,汤晓闯,等. 荧光素酶报告基因法测定生物制品活性研究进展[J]. 军事医学, 2023, 47(4): 302-306.
- [10] 王伊莹,周小玲,叶子弘,等. 基于报告基因法检测白细胞介素-11 生物学活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(10): 1462-1470.
- [11] SONG C C, YANG X B, LEI Y S, et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW₂₆₄. 7 cells[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019,234(7): 11969-11975.
- [12] YU C F, WANG L, NI Y B, et al. A simple and robust reporter gene assay for measuring the bioactivity of anti-RANKL therapeutic antibodies[J]. RSC Advances, 2019,9(69): 40196-40202.
- [13] 车路阳,刘长振,黄鹏. RANKL/RANK/OPG 通路及其相关药物狄诺塞麦治疗骨质疏松的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(34): 43-46.
- [14] 倪永波. 报告基因法用于治疗性抗 RANKL 及抗 BLyS 单克隆抗体生物学活性测定的研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2019.
- [15] LACEY D L, BOYLE W J, SIMONET W S, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2012,11(5): 401-419.
- [16] KONG L B, SMITH W, HAO D J. Overview of RAW₂₆₄. 7 for osteoclastogenesis study: phenotype and stimuli[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2019,23(5): 3077-3087.
- [17] NGUYEN J, NOHE A. Factors that affect the osteoclastogenesis of RAW₂₆₄. 7 Cells[J]. Journal of Biochemistry and Analytical Studies, 2017,2(1): 10.16966/2576-10.16966/5833. 109.
- [18] 王晓寒,郭永兵,王慧娟,等. 红斑狼疮患者血清对 IL-6 报告基因激活的研究[J]. 中华全科医学, 2009, 7(10): 1030-1031.
- [19] HOLDSWORTH G, STALEY J R, HALL P, et al. Sclerostin downregulation globally by naturally occurring genetic variants, or locally in atherosclerotic plaques, does not associate with cardiovascular events in humans[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2021,36(7): 1326-1339.

(责任编辑:刘庆松)