

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.006

和颜坤泰胶囊对卵巢早衰大鼠性激素水平和 VEGF、bFGF mRNA 表达的影响*

徐文君¹,高 慧^{2△},李 杨¹,梁 策¹

(1. 华北理工大学,河北唐山 063000;2. 承德医学院附属医院中医科,河北承德 067000)

[摘要] **目的** 探讨中成药坤泰胶囊治疗不同阶段卵巢早衰的效果。**方法** 采用雷公藤多苷片 75 mg/kg 制作卵巢早衰大鼠模型;将 60 只 SD 雌性大鼠分别为空白组,模型组,造模前坤泰胶囊组(造模前组),造模中坤泰胶囊组(造模中组),造模后坤泰胶囊组(造模后组),西药组(结合雌激素治疗)。观察大鼠行为学的改变,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、血清雌二醇(E₂)及抗缪勒管激素(AMH)的水平。RT-PCR 法检测卵巢组织中血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) mRNA 的表达。**结果** 空白组和各给药组血清 FSH 及 LH 水平明显低于模型组($P<0.05$),E₂、AMH 水平明显高于模型组($P<0.05$)。空白组及各给药组卵巢组织中 VEGF、bFGF mRNA 的表达明显高于模型组($P<0.05$),其中造模前组 VEGF、bFGF mRNA 水平高于造模中组、造模后组($P<0.05$),造模前组 VEGF mRNA 的表达与西药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 坤泰胶囊对卵巢性激素水平具有调节作用,能提高血清 E₂ 及 AMH 的水平,降低血清 FSH、LH 的水平,提高卵巢对性激素水平的敏感性;修复受损的卵巢组织,促进卵泡的生长发育,从而抑制卵泡过早耗竭。

[关键词] 坤泰胶囊;卵巢功能早衰;雌激素类;血管内皮生长因子 A;碱性成纤维细胞生长因子 2

[中图分类号] R271.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)06-0738-04

Effect of Yan Kuntai capsule on rat sex hormone level and VEGF bFGF mRNA expression in different stages and premature ovarian failure*

Xu Wenjun¹, Gao Hui^{2△}, Li Yang¹, Liang Ce¹

(1. North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China;

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the Chinese medicine treatment of QUNTAI capsule in different stages of premature ovarian failure effect. **Methods** Sixty SD female rats were divided into 6 groups: normal group, model group, prevention group, intervention group, the treatment group, and Western medicine group. To observe the changes of behavior in rats, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of follicle stimulating hormone FSH, LH, serum estradiol E₂, and anti Muller hormone AMH. RT-PCR was used to detect ovarian tissue vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic effect of fibroblast growth factor (bFGF) mRNA expression. **Results** The levels of FSH and LH in the normal group and the administration group were significantly lower compare to model group ($P<0.05$), and the contents of AMH and E₂ were significantly higher compare to model group ($P<0.05$). The FSH and LH content in the model group was significantly higher than that of the normal group and each treatment group, E₂, AMH content was significantly lower than that of the normal group and each treatment group ($P<0.05$); the expression of VEGF and bFGF mRNA in each treatment group and normal group was significantly higher than that of model group ($P<0.05$), Prevention group was higher than intervention group and treatment group ($P<0.05$), there was no significant difference between prevention group and Western medicine group ($P>0.05$). **Conclusion** QUNTAI capsule can increase serum E₂ and AMH levels, lower serum FSH, LH levels, improve ovarian sensitivity to sex hormone levels, repair damaged ovarian tissue, promote follicular growth and development, thereby inhibiting premature follicle depletion.

[Key words] medicine Kuntai; ovarian failure, premature; estrogens; vascular endothelial growth factor A; fibroblast growth factor 2

卵巢早衰是指女性 40 岁以前出现闭经及低雌激素和高促性腺激素的现象,临床上多伴随心烦易怒、烘热汗出等围绝经期现象,已成为妇科领域常见的内分泌疾病。近年来,卵巢早衰的发生已经呈低龄化趋势,且发病率逐年升高。目前,西医对本病病因还有一部分尚未明确,治疗上多以激素疗法为主,但激素治疗带来的不良反应,增加靶器官癌变的不确定性,患者不易承受,临床上依从性较差。坤泰胶囊服用简便,主要成份为熟地、黄连、白芍、阿胶、黄芪、茯苓,共同起滋阴降火、滋肾

养肝、养心安神、调节阴阳平衡的作用^[1]。本课题拟观察坤泰胶囊在卵巢储备功能低下及卵巢早衰等不同卵巢损伤程度下的防治作用及机制,将为临床使用本药提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雌性 SD 大鼠 60 只,体质量 220~250 g,清洁级,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2014-0004。饲料同为北京华阜康药业提供的大鼠饲料,饮水为双蒸水,动物饲养于自然光照好,清洁级

* 基金项目:河北省中医药管理局中药类科研计划课题(2016068);国家中医药管理局全国名老中医药专家高慧传承工作室建设项目(2015048157);河北省省级重大医学科研项目(zyzd2013018);河北省政府资助临床医学优秀人才培养项目(2014571024)。作者简介:徐文君(1990-),在读硕士,主要从事中医妇科学研究。△ 通信作者,E-mail:gaohuibcd@163.com。

实验室内。

1.2 实验药品及试剂 灌胃用雷公藤多苷片,每片 10 mg,远大医药黄石飞云制药有限公司提供,生产批号 20150617,批准文号国药准字 Z42021212。坤泰胶囊每粒 0.5 g,由贵州新天药业股份有限公司提供,生产批号 20150534,批准文号国药准字 Z20000083。大鼠的卵泡刺激素(FSH)、血清雌二醇(E₂)、黄体生成素(LH)、抗缪勒管激素(AMH)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购自上海联科生物技术有限公司;血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物购自美国 Invitrogen 公司;Trizol 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。Multiskan MK3 酶标仪购自芬兰 Thermo 公司;荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

1.3 动物造模及分组 适应性喂养 4 d 后,对大鼠进行阴道脱落细胞学涂片,连续 7 d 光镜下观察,筛选出动情周期正常的 60 只健康雌性大鼠进入正式实验。将雷公藤多苷片研碎加入等体积双蒸水,配制成 75 mg/kg,用法及剂量根据人鼠比例换算得出;坤泰胶囊将成品粉末与等体积双蒸水混合后,同样按照人鼠比例换算,配制成 0.6 g/kg 灌胃。所有药品根据大鼠体重按照 100 g/mL 灌胃。将 60 只大鼠分为空白组、模型组、造模前组、造模中组、造模后组和西药组,每周称体质量。模型组每天给予雷公藤多苷片水溶液进行灌胃,连续 2 周;空白组自由饮水;造模前组先给予坤泰胶囊灌胃 36 d,结束 24 h 后,给予雷公藤多苷片灌胃 14 d;造模中组于每天上午 9 点灌胃雷公藤多苷片,连续 14 d,下午 7 点灌胃坤泰胶囊,连续 36 d;造模后组先给予雷公藤多苷片灌胃 14 d,再给予坤泰胶囊 36 d;西药组先给予雷公藤多苷片水溶液 14 d,再给予结合雌激素片水溶液 36 d,配制方法与雷公藤多苷片相同,浓度为 0.625 g/kg。

1.4 取材 灌胃结束后,取材。大鼠麻醉后腹主动脉取血,以 3 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清;剖腹取子宫、卵巢。一部分用多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水后,浸蜡,包埋;一部分装在无菌 EP 管中,-80 ℃ 冰箱保存用于 PCR 实验。

1.5 血清性激素水平的检测 采用 ELISA 法检测 FSH、LH、E₂、AMH 的水平,实验步骤按照试剂说明书进行操作。(1)标准品的稀释:按照所给图表的稀释浓度将标准品依次稀释。(2)加样:分别设空白孔,标准孔,待测样品孔。在酶标被板上标准品加样 50 μL,待测样品各加样品稀释液 40 μL,然后加待测样品 10 μL,样品最终稀释度为 5 倍。(3)温育:封板膜封板后 37 ℃ 温育 30 min,然后洗涤。(4)加酶:每孔加入酶标试剂 50 μL,除空白孔外。(5)显色:每孔加入显色剂 A、B,37 ℃ 避

光显色 10 min。(6)终止:每孔加入终止液,终止反应。(7)结果判定:在 Multiskan MK3 酶标仪上,450 nm 波长依序测量各孔吸光度(A)值。

1.6 real-time PCR 法检测大鼠卵巢中 VEGF、bFGF mRNA 的表达 Trizol 法提取总 RNA,取各组卵巢总 RNA 各 1 μg 分别逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应;real-time PCR 法检测卵巢组织 VEGF、bFGF mRNA 的相对表达水平,结果用 2^{-ΔΔCt} 表示。反应体系为上游引物(10.0 μmol/L)0.5 μL,下游引物(10 μmol/L)0.5 μL,2×Master Mix 10 μL,每孔加入对应的 cDNA 2.0 μL,加 ddH₂O 补足至 20.0 μL。将上述 96-PCR 板放置于 real time PCR 仪上进行反应,按照如下程序进行:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s;60 ℃ 40 s,40 个循环。为了建立 PCR 产物的熔解曲线,扩增反应结束后,按 95 ℃,10 s;60 ℃,60 s;95 ℃ 15 s;并从 60 ℃ 缓慢加热到 99 ℃。VEGF、bFGF 引物设计见表 1。

1.7 统计学处理 采用 SPSS21.0 进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	引物	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
VEGF	上游	CAAAGCCAGCACATAGGAGAGAT	133
	下游	TTTTTGCAGGAACATTTACACGTC	
bFGF	上游	AAGGAAGATGGACGGCTGCT	115
	下游	TACCAACTGGAGTATTTCCGTGAC	
GAPDH	上游	CCTTCCGTGTTCTACCCC	131
	下游	GCCAGGATGCCCTTAGTG	

2 结 果

2.1 血清 FSH、LH、E₂、AMH 水平的测定 与空白组相比,模型组、造模前组、造模中组、造模后组血清中 FSH、LH 水平明显增高,E₂、AMH 水平明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组相比,各给药组血清 FSH、LH 水平明显降低,E₂、AMH 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明坤泰胶囊可通过调节血清 FSH、LH、E₂、AMH 的水平,改善激素水平,防止卵泡过快过早耗尽;与西药组相比,造模前组血清 FSH、LH、E₂、AMH 差异无统计学意义($P > 0.05$);造模中组及造模后组血清 FSH、LH、E₂、AMH 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),说明使用坤泰胶囊预防卵巢早衰效果与西药组相同。

表 2 大鼠血清水平 FSH、LH、E₂、AMH 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH(IU/L)	LH(ng/L)	E ₂ ((ng/L)	AMH(pg/mL)
空白组	10	16.926±1.031	21.263±0.764	97.117±1.565	297.417±23.376
模型组	10	33.389±0.900 ^a	41.761±0.951 ^a	55.661±1.892 ^a	142.715±17.894 ^a
造模前组	10	19.587±1.125 ^{ab}	24.458±1.032 ^{ab}	93.782±1.291 ^{ab}	276.313±14.068 ^{ab}
造模中组	10	26.383±0.962 ^{abc}	27.762±0.947 ^{abc}	88.322±1.109 ^{abc}	228.622±27.128 ^{abc}
造模后组	10	24.941±0.937 ^{abc}	26.012±0.639 ^{abc}	75.340±1.072 ^{abc}	220.188±15.031 ^{abc}
西药组	10	17.625±0.418 ^b	22.400±1.017 ^b	93.961±2.097 ^b	280.755±24.471 ^b

^a: $P < 0.05$,与空白组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较;^c: $P < 0.05$,与西药组比较。

2.2 大鼠卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达 与空白组相比,模型组卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达明显降低($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组卵巢 VEGF、bFGF mRNA 的表达明显升高($P < 0.01$),说明坤泰胶囊有修复并促进受损卵巢新生血管生成的作用;与西药组相比,造模前组卵巢 VEGF mRNA

的表达差异无统计学意义($P > 0.05$),造模中组及造模后组 bFGF mRNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。从表中还可以看出 VEGF、bFGF mRNA 的表达从造模前到造模后组逐渐降低,见表 3、4。

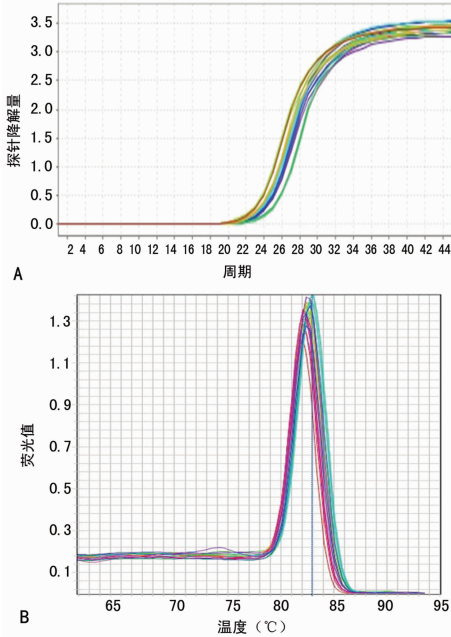
2.3 各样本实时扩增曲线图和样本扩增产物曲线图 见

图 1~3。

表 3 实时荧光 PCR 大鼠卵巢 VEGF mRNA 的相对表达

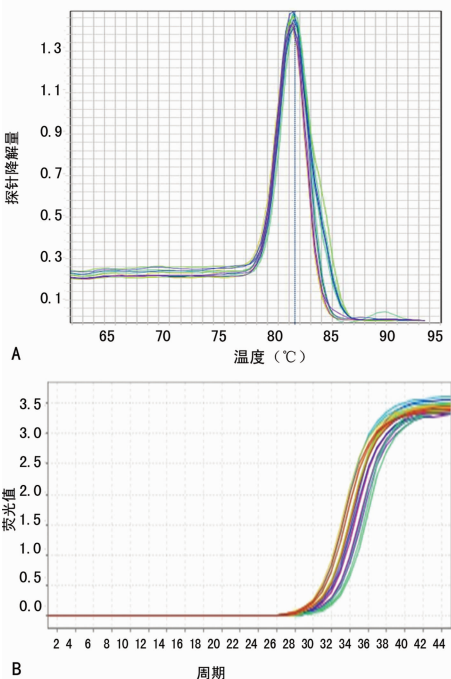
组别	<i>n</i>	$\Delta\text{CT}(\bar{x}\pm s)$	$\Delta\Delta\text{CT}$	$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
空白组	10	1.132 6±0.069 6	0	1
模型组	10	3.899 8±0.046 5	2.767 2	0.146 89 ^{ac}
造模前组	10	1.145 6±0.038 6	0.013 0	0.991 02 ^b
造模中组	10	1.194 4±0.036 2	0.811 6	0.569 70 ^{abc}
造模后组	10	2.484 0±0.094 4	1.351 4	0.391 90 ^{abc}
西药组	10	1.140 5±0.105 7	0.007 9	0.994 50 ^b

^a: $P < 0.05$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与西药组比较。



A: 扩增曲线图; B: 溶解曲线图。

图 1 VEGF 基因实时扩增曲线图及产物溶解曲线图



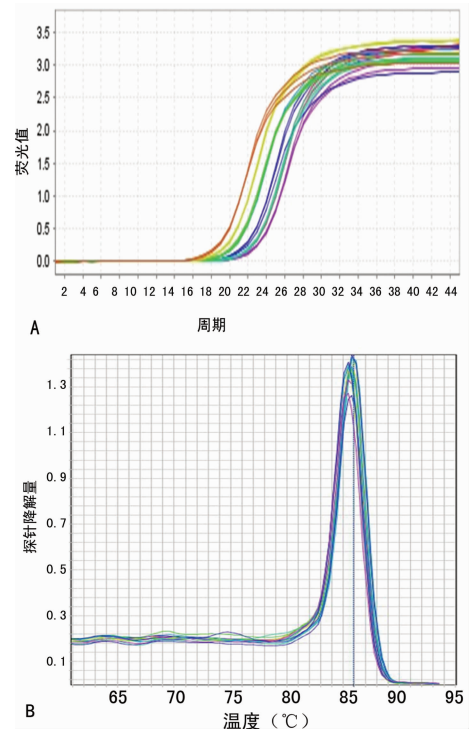
A: 扩增曲线图; B: 溶解曲线图。

图 2 bFGF 基因实时扩增曲线图及产物溶解曲线图

表 4 实时荧光 PCR 大鼠卵巢 bFGF mRNA 的相对表达

组别	<i>n</i>	$\Delta\text{CT}(\bar{x}\pm s)$	$\Delta\Delta\text{CT}$	$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
空白组	10	8.686 6±0.069 6	0	1
模型组	10	15.222 8±0.880 0	6.536 2	0.010 7 ^a
造模前组	10	8.997 0±0.110 9	0.310 4	0.806 4 ^{abc}
造模中组	10	10.228 0±0.064 5	1.541 4	0.343 5 ^{abc}
造模后组	10	11.274 1±0.078 9	2.587 5	0.166 3 ^{abc}
西药组	10	8.744 5±0.105 7	0.057 9	0.960 6 ^b

^a: $P < 0.05$, 与空白组比较; ^b: $P < 0.01$, 与模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与西药组比较。



A: 扩增曲线图; B: 溶解曲线图。

图 3 GAPDH 基因实时扩增曲线图及产物溶解曲线图

3 讨论

雷公藤多苷片为中草药雷公藤植物根茎中的提取物,具有抗炎及抗肿瘤等活性成份,广泛应用于肾炎、类风湿性关节炎等疾病。但其不良反应明显,长期使用会对消化系统、血管系统等器官造成损害,尤以生殖系统的损害最为严重^[2]。王瑛等^[3]在临床观察中发现使用雷公藤药物制剂治疗类风湿性关节炎、肾炎等疾病时,可引起女性月经不调及闭经等症状,因此怀疑雷公藤多苷片可损伤卵巢功能。首创使用雷公藤药物制剂造成 SD 大鼠卵巢早衰模型^[4]。本实验在造模后发现大鼠出现弓背、蜷缩、脱毛、行动缓慢、体质量下降等,阴道图片显示动情间期时间较长,性激素检测模型组 FSH、LH 血清水平明显升高($P < 0.05$), E_2 、AMH 水平明显降低($P < 0.05$),提示造模成功。FSH 是检测卵巢早衰的最重要指标,也用来判断损伤程度^[5]。卵巢早衰患者由于体内性激素水平低下,可引起脂质代谢紊乱,极易导致高脂血症、动脉粥样硬化、冠状动脉性心脏病等,因此对卵巢早衰的治疗已涉及预防保健的范畴^[6]。中医“治未病”思想提出未病先防,已病防变,认为治病应防重于治^[7]。卵巢早衰的发病是一种渐进性过程,从卵巢储备功能下降到卵巢功能衰竭大约需要 1~6 年^[8]。本课题在造模后组

基础上进一步研究预防卵巢早衰的疗效,建立造模前组及造模中组。认为造模前组及造模中组为卵巢储备功能下降的“未病”阶段,造模后组为卵巢早衰的“已病”阶段,分别给药。

卵巢早衰的发病原因主要是原始卵泡储备过少,卵泡闭锁或者耗竭太快。卵巢血流是维持卵泡生长,类固醇激素分泌及卵泡对促性腺激素敏感性的重要因素^[9],VEGF、bFGF为血管内皮生长因子,可改善受损卵巢血管通透性,尤其可以特异性地促进类固醇激素生成器官的细胞增殖存活和趋化,促进新生血管生成^[10]。

LISA 结果显示:与模型组比较,各给药组在灌胃坤泰胶囊后, E_2 、AMH 水平明显升高($P<0.05$),FSH、LH 水平明显降低($P<0.05$),提示坤泰胶囊能提高血清中 E_2 、AMH 的水平,降低 FSH、LH 的水平,改善卵巢功能。RT-PCR 结果显示:模型组中 VEGF、bFGF 的表达明显减少($P<0.05$),说明卵巢内血流减少,卵泡减少,血管受损。灌胃坤泰胶囊后 VEGF、bFGF 表达明显升高($P<0.05$)。说明坤泰胶囊可保护血管内皮细胞,使卵巢内血液运行通畅,提高卵巢储备能力,防止卵巢早衰。进一步研究发现:致病因素时间不同,VEGF、bFGF 的表达不同。实验表明造模前组的表达及造模中组高于造模后组。

卵巢早衰是妇科常见的内分泌疾病,西医治疗主要结合实验室检查及患者临床表现给予激素替代疗法,此疗法可恢复月经规律,促进生殖器官发育,但长时间用药会导致各种不良反应的发生,增加其他疾病的患病率^[11]。而中成药治疗具有良好的调节作用,也无长期使用激素的不良反应,为卵巢早衰的治疗提供新的治法。和颜坤泰胶囊主要成分为熟地黄、白芍、阿胶、茯苓、黄芩、黄连等六味中药组成。其中熟地黄为君药,滋阴养血、补肾、生精益髓;黄连、白芍、阿胶为臣药,黄连清虚火、清心除烦,与熟地黄配伍,滋阴降火、交通心肾;白芍、阿胶补血养阴,补而不滞,养阴不腻,且能收敛精气,固摄元气;黄芩、茯苓为佐药,黄芩清热泻火,茯苓健脾益气,安神,以上六味中药合用,起到滋阴养血,补精益髓,安神除烦,交通心肾,调节阴阳平衡的作用^[12],通过调补肾阴肾阳可增加卵巢供血及营养,从而达到激活卵巢功能的效果^[13]。其中熟地黄含有的 5-羟甲基糖醛成分具有改善血液循环的作用,阿胶具有补血滋阴的作用二者均可以上调 VEGF、bFGF mRNA 的表达^[13],促进卵泡发育,改善受损卵巢。

实验证明,坤泰胶囊有治疗卵巢早衰的作用,其预防作用更为明显。通过调节激素水平及上调 VEGF、bFGF mRNA 的表达减轻雷公藤多苷片对卵巢功能造成的损害,延缓或阻遏卵

巢早衰,促进卵泡发育,改善卵巢功能。

参考文献

- [1] 杨芸. 坤泰胶囊治疗女性围绝经期综合征的临床观察[J]. 天津药学, 2010, 22(3): 34-35.
- [2] 高慧, 杨涓. 药物型卵巢早衰动物模型的研究[J]. 国医论坛, 2007, 22(3): 22-26.
- [3] 伍义行, 黄利权. 中药生殖药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(12): 28-30.
- [4] 张丽娟, 陶仕英, 赵丕文, 等. 细胞凋亡途径探讨二仙汤治疗大鼠卵巢早衰实验研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(4): 812-818.
- [5] 刘梅云. 坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床研究[D]. 河北: 河北大学, 2014.
- [6] 陈冬丽. 坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床研究[D]. 湖北: 湖北中医药大学, 2011.
- [7] 陈玥. “治未病”思想在卵巢储备功能减退中的应用体会[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(1): 46-48.
- [8] Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Tziotis J, et al. Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles[J]. Fertil Steril, 2004, 81(5): 1322-1327.
- [9] Keramidas M, Faudot C, Cibiel A, et al. Mitogenic functions of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bombesin-like peptide 8 on steroidogenic adrenocortical cells[J]. Endocrinol, 2008, 196(3): 473-482.
- [10] 王玉洁, 宁琳. 四物合剂联合坤泰胶囊治疗卵巢储备功能下降及卵巢早衰的临床观察[J]. 中国医学创新, 2014, 11(10): 118-119.
- [11] 王玮, 张云. 坤泰胶囊对 SD 大鼠生育力和早起胚胎毒性的研究[J]. 中成药, 2012, 34(10): 1869-1873.
- [12] 王瑛, 刘元. 坤泰胶囊治疗雷公藤引起类风湿关节炎卵巢早衰的临床观察[J]. 陕西中医, 2015, 36(7): 773-774.
- [13] 钟瑞华, 周娟颖. 坤泰胶囊对大鼠实验性子官异位内膜生长及其妊娠结局的影响[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(8): 517-523.
- [13] Reichenberger F, Mainwood A, Morrell NW, et al. Intravenous epoprostenol versus high dose inhaled iloprost for long-term treatment of pulmonary hypertension[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2011, 24(1): 169-173.
- [14] Li RC, Cindrova-Davies T, Skepper JN, et al. Prostacyclin induces apoptosis of vascular smooth muscle cells by a cAMP-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity and can counteract the mitogenic activity of endothelin-1 or basic fibroblast growth factor[J]. Circ Res, 2004, 94(6): 759-767.

(收稿日期: 2016-10-13 修回日期: 2016-11-16)

(收稿日期: 2016-10-23 修回日期: 2016-11-21)

(上接第 737 页)

- [10] Biasin V, Chwalek K, Wilhelm J, et al. Endothelin-1 driven proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells is c-fos dependent[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 54(8): 137-148.
- [11] Reichenberger F, Mainwood A, Doughty N, et al. Effects of nebulised iloprost on pulmonary function and gas exchange in severe pulmonary hypertension [J]. Respir Med, 2007, 101(2): 217-222.
- [12] Mirza S, Foley RJ. Clinical utility of treprostinil and its overall place in the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med, 2012, 6(1): 41-50.