

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202003009

· 论著 ·

吡非尼酮抑制大鼠气管瘢痕狭窄和成纤维细胞功能的实验研究

汪 玮, 吴 平, 李 鑫, 唐瑶云, 樊玉华, 方 兴

(中南大学湘雅医院耳鼻咽喉头颈外科耳鼻咽喉重大疾病研究湖南省重点实验室湖南省咽喉嗓音疾病临床研究中心, 湖南长沙 410008)

摘要: **目的** 探讨吡非尼酮(PFD)对大鼠气管瘢痕狭窄及成纤维细胞功能的影响。**方法** 将20只SD雄性大鼠通过气管切开和气管损伤手术构建气管狭窄模型,随机分成2组,实验组(10只)予以PFD胶囊粉末经口灌喂,50 mg/(只·d);对照组(10只)予以无菌水经口灌喂,5 mL/(只·d),两组连续灌喂10 d。手术14 d后HE染色检测气管瘢痕厚度,免疫组织化学检测TGFβ1、Collagen I和α-SMA的表达情况。使用不同浓度的PFD处理RFL-6细胞,CCK-8法检测细胞存活率,划痕和Transwell实验检测细胞侵袭转移能力,Western blot法检测蛋白表达水平。**结果** HE染色显示PFD实验组大鼠气管瘢痕厚度为(337.5 ± 33.5) μm,明显低于对照组瘢痕厚度(537.0 ± 38.8) μm ($P < 0.05$);免疫组织化学结果显示TGFβ1、Collagen I和α-SMA在实验组的表达强度明显低于对照组,两组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞实验结果显示PFD能抑制RFL-6细胞的生长,浓度为1.5 mM时效果明显($P < 0.05$);PFD能减弱细胞的划痕愈合以及穿出Transwell小室的能力,与对照组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot检测显示PFD能明显下调RFL-6细胞中TGFβ1、Collagen I和α-SMA的表达($P < 0.05$)。**结论** PFD能显著拮抗大鼠气管瘢痕形成,并能抑制成纤维细胞的增殖和转化、迁移愈合能力以及细胞外基质的分泌能力。

关键词: 喉气管狭窄;吡非尼酮;转化生长因子β1;成纤维细胞

中图分类号:R768.1⁺1

Experimental study of pirfenidone inhibiting tracheal scar stenosis and fibroblast function in rats

WANG Wei, WU Ping, LI Xin, TANG Yaoyun, FAN Yuhua, FANG Xing

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Hunan Province Key Laboratory of Otolaryngology Critical Diseases, Hunan Province Clinical Research Center of Laryngopharyngeal and Voice Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of pirfenidone (PFD) on tracheal scar stenosis and fibroblast function in rats. **Methods** 20 SD male rats were undergone tracheotomy and tracheal injury surgery to establish tracheal stenosis model, and then randomly divided into two groups. The rats of experimental group ($n = 10$) were fed with PFD capsule powder by gavage at 50 mg/case/day, and those of control group were treated with sterile water at 5 ml/case/day. All rats in both groups were continuously administered for 10 days. Fourteen days after surgery, the thickness of tracheal scar was detected on HE staining, and the expressions of TGFβ1, Collagen I and α-SMA in scar tissue were detected by immunohistochemistry. Survival rates of RFL-6 cells treated with PFD of different concentrations were measured by CCK-8, cell invasion and metastasis ability was determined by scratch and transwell experiments, and protein expression level was detected by Western blot. **Results** HE staining showed that the thickness of tracheal scar of the experimental group was (337.5 ± 33.5) μm, which was significantly lower than that of the control group [(537.0 ± 38.8) μm] ($P < 0.05$). Immunohistochemical results showed that the expression intensities of TGFβ1, Collagen I and α-SMA in the experimental

group were significantly weaker than those in the control group (all $P < 0.05$). PFD inhibited the growth of RFL-6 cells with most obvious effect at the concentration of 1.5 mM ($P < 0.05$). Moreover, PFD reduced the scratch healing of cells and the ability to penetrate the transwell cell ($P < 0.05$). Western blot revealed significantly down-regulated expressions of TGF β 1, collagen I and α -SMA in RFL-6 cells by PFD (all $P < 0.05$). **Conclusion** PFD can significantly attenuate tracheal scar formation in rats, and inhibit the function of proliferation, transformation, migration, healing and the secretion of extracellular matrix in fibroblasts.

Keywords: Laryngotracheal stenosis; Pirfenidone; Transforming growth factor-beta; Fibroblast

喉气管狭窄(laryngotracheal stenosis, LTS)是指由各种原因造成的喉气管软骨支架畸形、塌陷或缺损,喉气管黏膜瘢痕形成或黏膜下组织增生导致呼吸困难的一种疾病^[1]。LTS常见病因为长时间气管插管内插管机械通气、颈部外伤,其次为喉气管手术后,如喉癌、气管肿瘤、气管切开术等。另外,喉气管放射治疗、炎症感染性疾病也可以导致该疾病的发生^[2]。吡非尼酮(pirfenidone, PFD)是一种新的具有广谱抗纤维化作用的吡啶酮类化合物,能够防止和逆转纤维化和瘢痕的形成,在治疗肺纤维化和肝纤维化的应用中取得了良好的效果^[3]。本实验通过建立SD大鼠气管瘢痕狭窄模型,予以口服PFD,观察对气管瘢痕形成情况及瘢痕发生相关蛋白转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF β 1)、I型胶原蛋白(Collagen I)及 α -平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α -SMA)表达的影响。另外,通过细胞实验,观察PFD对气管瘢痕来源成纤维细胞生长、增殖、侵袭转移能力以及相关因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

PFD胶囊购自北京康蒂尼药业有限公司(100mg),PFD试剂购自Selleck公司(美国),兔二步法检测试剂盒(PV-9001)购自中杉金桥公司(中国),CCK-8购自日本同仁,DMSO购自Invitrogen公司(美国),DMEM购自Hyclone公司(美国),特级胎牛血清购自Gibco公司,抗TGF β 1、Collagen I、 α -SMA抗体均购自Abcam公司(英国),抗 β -actin抗体购自碧云天生物(北京),大鼠成纤维细胞RFL-6购自中国科学院细胞库(上海)。

1.2 实验动物

选取普通级别SD雄性大鼠24只,体健,体重约200g,实验用大鼠由中南大学动物学部提供。本研究通过了中南大学湘雅医院伦理委员会批准。

1.3 实验方法

1.3.1 构建气管瘢痕狭窄大鼠模型 SD大鼠术前使用10%水合氯醛麻醉,按0.3 mL/100 g剂量腹腔

内注射,待麻醉生效后,用剃毛器剃除大鼠颈前毛发,使用乙醇棉球消毒,在中线处作垂直皮肤切口,从甲状软骨的上缘延伸至胸骨上缘。逐层分离皮肤和皮下组织,分离带状肌,露出喉气管结构。将气管前筋膜分离后,在第3~4颈气管环进行平行于气管环切开气管,使用刮匙刮掉上段气管前部分黏膜4次,勿损伤软骨,避免气管塌陷。之后用2 mm的硅胶管给大鼠行经口气管插管,缝合气管壁及颈前切口。手术出现出血应及时用棉球止血,避免血液流入气管造成窒息,术后1~2 h内待大鼠麻醉彻底苏醒后拔除气管插管。

1.3.2 分组及给药方法 手术后第3天,选取20只造模成功的大鼠,随机分为2个组,每组各10只大鼠。对照组给予无菌水灌喂,5 mL/(只·d);实验组给予溶于无菌水的PFD胶囊粉末经口灌喂,50 mg/(只·d)。两组连续灌喂10 d,实验过程中大鼠正常饲养饲料和水,每天换药观察大鼠呼吸及活动状况。

1.3.3 取材 手术14 d后,用过量的10%水合氯醛处死大鼠。取大鼠气管,切除第一气管环上缘至第七气管环下缘之间的气管,于气切口下2 mm处将气管剪成两段,分别装入装有4%多聚甲醛的EP管内,做好标记。

1.3.4 免疫组织化学染色及结果判定 采用免疫组化PV-9001二步法。具体实验步骤为:石蜡切片脱蜡后常规水化,将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液中,微波炉中火加热至沸腾,然后持续小火加热15 min,冷却后PBS洗5 min×3次。以3%去离子水孵育10 min阻断内源性过氧化物酶反应。PBS洗5 min×3次,滴加一抗,4℃过夜。PBS洗5 min×3次,滴加试剂1,室温下孵育15 min,取出后PBS洗5 min×3次。滴加试剂2,室温下孵育15 min,取出后PBS洗5 min×3次。新鲜配制的DAB显色,苏木素染核,盐酸乙醇分化,冲洗15 min。脱水、透明,中性树胶封片。

1.3.5 DAB图像量化分析 使用Image J SAAinc软件打开要处理的免疫组化图像。然后选择Image菜单-Colour子选项-Colour Deconvolution处理图像。在弹出的向量窗口中选择“H-DAB”选项,选择确定

后会出现3张新图像,其中标题为 Colour 2 的是经过处理得到的 DAB 图像,应用于下一步量化分析。接着点击菜单栏中 Analyze 选项,选择 Set Measurements 进行参数设置,只选择 Mean gray value 和 Display label 两个选项,至此全部参数设置完毕。最后选择 Colour 2 窗口,点击菜单栏中的 Analyze,选择 Measure 选项,将对 DAB 信号产生的图像平均暗度进行量化,将得到的数据输入 Graphpad Prism 软件进行分析和可视化。

1.3.6 细胞培养 将大鼠成纤维细胞系 RFL-6 培养在含 10% FBS 的 DMEM 中。在 5% CO₂, 温度为 37°C 培养箱中培养,每隔天换液,细胞扩增至满瓶后用体积分数 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 溶液消化传代。

1.3.7 CCK-8 法检测细胞生长情况 将处在对数生长期的细胞消化后接种于 96 孔板中,每孔细胞约 2×10^3 个,分成不同的 PFD 药物浓度组及阴性对照组培养。48 h 后,吸净培养基,每孔分别加入浓度为 10% 的 CCK-8 培养基混合溶液,充分混匀后继续培养细胞 1 h;在酶标仪上测量各孔在波长 450 nm 处的 OD 值,并做好记录,实验重复 3 次。

1.3.8 划痕实验 接种 5×10^5 个细胞铺至 6 孔板中,细胞长至融合度超过 90% 时用 100 μ L 无菌 Tip 头在 6 孔板底部划一笔直且均匀的划痕。清洗去除漂浮的细胞,拍照后加入无血清培养基继续培养。并在 24、36 h 后,观察划痕愈合情况,设置复孔并重复 3 次。

1.3.9 Transwell 细胞迁移实验 准备好无血清细胞悬液,每个小室上室中加入含 8.0×10^3 个的细胞 200 μ L 细胞悬液,下室中加入 600 μ L 含有 10% 特级胎牛血清培养基作为趋化因子,处理完毕后,放入培养箱中继续培养。24 h 后将小室取出,PBS 清洗 3 遍,加入甲醇固定细胞 30 min,0.1% 结晶紫(Sigma)染色 20 min。将结晶紫吸出,用 PBS 清洗 3 遍,放在显微镜下($\times 200$)观察,随机选取 5 个高倍视野,计算基底膜下室面染色的细胞数量,每个标本重复 3 次,取其平均值。

1.3.10 Western blot 分析相关蛋白表达情况 转染 48 h 后收集各组细胞提取总蛋白,采用 BCA 法对蛋白定量后,取 30 μ g 蛋白加入上样缓冲液后混匀,95 °C 水浴变性 5 min。60V 浓缩胶,100V 分离胶电泳分离蛋白质,280mA 100 min 将蛋白质转移至 PVDF 膜上。转膜结束后,置入 5% 脱脂奶封闭 1 h 加入 I 抗,4 °C 摇床孵育过夜,PBST 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。加入辣根过氧化物酶标记的 II 抗

室温孵育 1 h,PBST 溶液漂洗 3 次,每次 5 min,将 ECL 液工作液均匀滴加在条带表面,于凝胶自动成像系统曝光,用 Image J 软件进行分析。

1.4 统计学方法

用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用独立样本 *t* 检验,多组数据比较采用 ANOVA 方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 气管瘢痕厚度比较

气管瘢痕厚度是以垂直于气管软骨,气管黏膜到气管软骨之间的长度为测量值,每张 HE 染色图片测量 4 个不同部位。结果显示 PFD 实验组气管瘢痕厚度为 $(337.5 \pm 33.5) \mu\text{m}$,对照组气管瘢痕厚度为 $(537.0 \pm 38.8) \mu\text{m}$,实验组明显低于对照组,差异具有统计学意义($t = 8.712, P < 0.05$, 图 1A)。

2.2 TGF β 1、Collagen I 和 α -SMA 在气管瘢痕组织中的表达情况

免疫组织化学检测 TGF β 1、Collagen I 和 α -SMA 蛋白分别在两组气管瘢痕组织中的表达情况。结果显示 TGF β 1 和 α -SMA 主要在胞浆中表达,而 Collagen I 在胞浆与细胞间质中均表达。3 种蛋白在对照组中的表达强度明显均明显高于 PFD 实验组,两组比较均具有统计学差异(TGF β 1: $t = 8.971, P < 0.05$; Collagen I: $t = 7.405, P < 0.05$; α -SMA: $t = 6.878, P < 0.05$; 图 1B)。

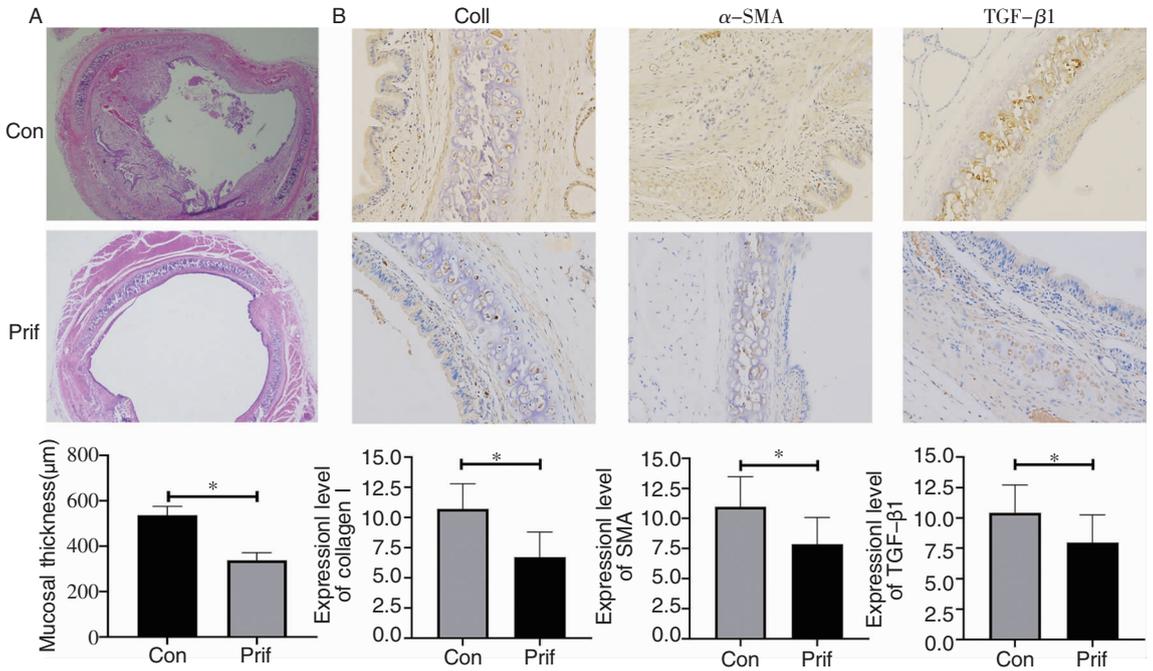
2.3 PFD 对大鼠成纤维细胞增殖和迁徙愈合能力的影响

用 1mM 和 1.5mM 两种浓度 PFD 处理 RFL-6 细胞,48 h 后观察细胞增殖情况。结果显示与对照组相比,实验组细胞增殖均受到抑制,其中 1.5mM 的 PFD 对细胞抑制最明显,两实验组与对照组比较均有统计学差异(1mM: $t = 2.428, P = 0.048$; 1.5mM: $t = 10.290, P < 0.05$; 图 2)。接下来使用 1.5mM 的 PFD 进行 Transwell 实验和划痕实验。Transwell 实验显示实验组在 24 h 和 36 h 两个不同时间点穿出细胞均明显少于对照组,两组比较差异具有统计学意义(24 h: $t = 2.986, P = 0.041$; 36 h: $t = 22.250, P < 0.05$; 图 2A、B);划痕实验显示实验组在 24 h 和 36 h 两个不同时间点划痕愈合面积均高于对照组,两组比较差异具有统计学意义(24 h: $t = 4.487, P = 0.011$; 36 h: $t = 3.375, P = 0.028$; 图 2C、D)。

2.4 PFD 对大鼠成纤维细胞 TGF β 1、Collagen I 和 α -SMA 表达的影响

使用 1mM 和 1.5mM 两种不同浓度的 PFD 处理 RFL-6 细胞,48 h 后提取细胞总蛋白进行 Western blot 分析。结果显示 PFD 能抑制 RFL-6 细胞

TGF β 1、CollagenI 和 α -SMA 的表达,在浓度 1.5mM 最为明显,与对照组相比均有统计学差异(Collagen I: $t=9.767, P<0.05$; TGF β 1: $t=10.660, P<0.05$; α -SMA: $t=15.720, P<0.05$; 图 2E~I)。



注:Control (Con) 为对照组; Prifenidone (Prif) 为实验组; * 表示 $P<0.05$ 。下同。

图 1 两组 HE 染色及免疫组织化学结果 A: 对照组与实验组气管瘢痕形成情况及两组瘢痕厚度测量值比较 (HE $\times 40$); B: TGF β 1、Collagen I 和 α -SMA 在两组瘢痕组织中的表达情况及 DAB 测量值比较 (免疫组化 $\times 200$)

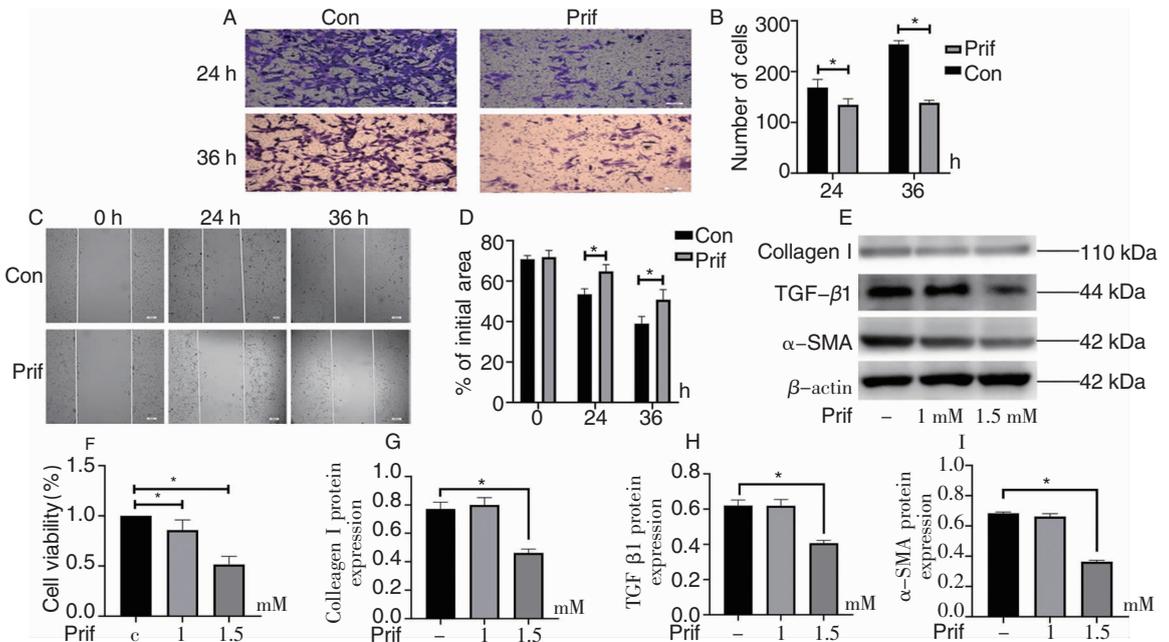


图 2 PFD 影响 RFL-6 细胞功能及蛋白表达的实验结果 A、B: Transwell 实验显示 PFD 处理组和对照组在 24 h 与 36 h 时细胞穿出情况; C、D: 细胞划痕实验显示 PFD 处理组和对照组细胞在 24 h 与 36 h 时的愈合情况; E、F: CCK-8 法检测不同浓度下细胞的存活情况; G~I: Western blot 显示 PFD 对 Collagen I、TGF β 1 和 α -SMA 蛋白表达的影响

3 讨论

LTS 根据不同的狭窄部位可分为喉狭窄、气管狭窄、LTS,其主要的临床表现为呼吸困难和声音嘶哑,呼吸困难的程度与狭窄程度和病情发展的速度有关。对于 LTS 迄今无可靠的治疗手段,临床上较为常见治疗方法是手术治疗和药物治疗。丝裂霉素 C、糖皮质激素、红霉素、氟尿嘧啶等药物通过抑制瘢痕组织的形成,对 LTS 也有一定的治疗效果,但目前依然缺乏大规模临床试验的有效证据^[4-7]。

LTS 发生的主要病理机制是喉气管损伤后引起组织细胞变性、坏死,继而发生慢性炎性细胞浸润和纤维组织增生、修复,导致损伤处腔内黏膜层明显增厚、胶原沉积和软骨膜炎,最终形成组织重塑和气道瘢痕。目前,关于气道瘢痕形成的分子机制研究不多,但气道瘢痕与皮肤瘢痕组织的形成机制有许多相同之处。与皮肤损伤修复类似,气道损伤修复是一种动态复杂的过程,当气道出现损伤后,局部引起血小板、炎症细胞、成纤维细胞聚集,纤维蛋白原沉淀,炎性细胞分泌多种细胞因子并清除感染和坏死物质,成纤维细胞增殖并转化为肌成纤维细胞,后者分泌胶原蛋白和胞外基质(extracellular matrix, ECM),形成新生物肉芽组织,周围上皮细胞逐渐迁移并覆盖新生组织,最后愈合伤口。如果该过程中成纤维细胞与肌成纤维细胞过度激活增殖,和/或 ECM 降解抑制,将引起 ECM 合成与降解的平衡打破,可致使瘢痕组织过度增长,最终形成病理性瘢痕^[8-9]。

成纤维细胞是参与伤口愈合和瘢痕形成的关键效应细胞,它可分泌 ECM 的主要成分 Collagen I、Collagen III 和 Fibronectin,以及自分泌 TGF β 、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)等多种细胞因子^[8]。TGF β 是目前已知的与瘢痕形成最密切的一种细胞因子,包括 TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3,其中 TGF β 1 和 TGF β 2 具有促进瘢痕形成的作用,TGF β 3 具有抑制瘢痕形成的作用。TGF β 1 所占比例最高,活性最强,可刺激成纤维细胞增殖分化,上调 α -SMA 及胶原蛋白的表达,促进 ECM 的合成及血管生成^[10]。

近年来,已有一些实验研究通过抑制 TGF β 的产生或阻断 TGF β /Smad 信号通路来限制瘢痕组织生长。红霉素在体内体外实验中发现能抑制瘢痕组

织中 TGF β 1、Collagen I、Collagen III 的表达并能阻断 TGF β 1 诱导 VEGF 的生成^[6, 11]。动物实验中,TGF β 的拮抗剂 P17 能够减轻气管瘢痕组织的厚度以及减少 α -SMA 和 CTGF 的表达,但气管管腔面积无明显改善^[12]。

目前,国外有少数动物实验研究 PFD 治疗声带和气管瘢痕的报道,研究表明 PFD 能够减轻喉气管的瘢痕组织形成,并能抑制瘢痕组织中 TGF β 1、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 和 α -SMA 的表达,但 PFD 对成纤维细胞的增殖和侵袭分化功能的影响尚无详细的研究报道^[13-15]。本研究在动物实验中明确 PFD 有拮抗气管瘢痕形成的疗效后,进一步在细胞实验中证实 PFD 对成纤维细胞功能的影响。我们在该研究中通过气管切开和气管黏膜损伤来构建 SD 大鼠气管狭窄模型,发现术后第 14 天对照组气管瘢痕增生明显,而 PFD 实验组瘢痕增生较对照组明显减少;另外,免疫组织化学检测发现实验组瘢痕组织中 TGF β 1、Collagen I、 α -SMA 表达较对照组减弱。细胞实验发现,PFD 能够抑制成纤维细胞的生长增殖能力以及侵袭转移能力,并能下调 TGF β 1、Collagen I 和 α -SMA 的表达,这说明 PFD 有抑制成纤维细胞增殖和分化以及分泌 ECM 的作用。虽然这些结果表明 PFD 有明确的拮抗 LTS 的疗效,但长期疗效仍需要实验继续观察。

本研究成功构建了 SD 大鼠气管狭窄模型,证实了 PFD 不仅能抑制成纤维细胞增殖分化和分泌 ECM,并且有拮抗 LTS 形成的能力,为 LTS 的药物治疗提供新的方法和理论依据。

参考文献:

- [1] 中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会咽喉学组,中华医学会耳鼻咽喉头颈外科学分会嗓音学组,中华医学会中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会咽喉组. 喉气管狭窄诊断与治疗专家共识[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2018,53(6):410-413.
- [2] Gelbard A, Francis DO, Sandulache VC, et al. Causes and consequences of adult laryngotracheal stenosis [J]. Laryngoscope, 2015,125(5):1137-1143.
- [3] Richeldi L, Yasothan U, Kirkpatrick P. Pirfenidone[J]. Nat Rev Drug Discov,2011,10(7):489-490.
- [4] Whited CW, Dailey SH. Is mitomycin C useful as an adjuvant therapy in endoscopic treatment of laryngotracheal stenosis [J]. Laryngoscope,2015,125(10):2243-2244.
- [5] Agarwal A, Singh DK. Bronchoscopic topical steroid instillation in

- prevention of tracheal stenosis[J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2014,30(1):91-93.
- [6] Enyuan Q, Mingpeng X, Luoman G, et al. Erythromycin combined with corticosteroid reduced inflammation and modified trauma-induced tracheal stenosis in a rabbit model[J]. *Ther Adv Respir Dis*,2018,12: :1753466618773707.
- [7] Guven M, Turan F, Eybilen A, et al. A comparison of the efficacy of 5-fluorouracil/triamcinolone, carnitine and dexamethasone therapy on wound healing in tracheal injury: potential for preventing tracheal stenosis [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(1):201-206.
- [8] van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation [J]. *Burns*,2009,35(1):15-29.
- [9] Hirshoren N, Eliashar R. Wound-healing modulation in upper airway stenosis-Myths and facts[J]. *Head Neck*,2009,31(1):111-126.
- [10] Kiritsi D, Nyström A. The role of TGF β in wound healing pathologies[J]. *Mech Ageing Dev*,2018,172:51-58.
- [11] Lee Y, Hung M, Liu L, et al. The roles of transforming growth factor- β and vascular endothelial growth factor in the tracheal granulation formation[J]. *Pulm Pharmacol Ther*,2011,24(1):23-31.
- [12] Antón-Pacheco JL, Usategui A, Martínez I, et al. TGF- β antagonist attenuates fibrosis but not luminal narrowing in experimental tracheal stenosis[J]. *Laryngoscope*,2017,127(3):561-567.
- [13] Hall CL, Wells AR, Leung KP. Pirfenidone reduces profibrotic responses in human dermal myofibroblasts, in vitro[J]. *Lab Invest*,2018,98(5):640-655.
- [14] Kodama H, Kumai Y, Nishimoto K, et al. Potential treatment for vocal fold scar with pirfenidone [J]. *Laryngoscope*, 2018, 128(5):E171-E177.
- [15] Yamada T, Kumai Y, Kodama H, et al. Effect of pirfenidone injection on ferret vocal fold scars: A preliminary in vivo study[J]. *Laryngoscope*,2020,130(3):726-731.

(收稿日期:2020-03-15)

本文引用格式:汪 玮,吴 平,李 鑫,等.吡非尼酮抑制大鼠气管瘢痕狭窄和成纤维细胞功能的实验研究[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2020,26(3):272-277. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202003009

Cite this article as:WANG Wei, WU Ping, LI Xin, et al. Experimental study of pirfenidone inhibiting tracheal scar stenosis and fibroblast function in rats[J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2020, 26(3):272-277. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202003009