

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.20.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200812.1743.010.html\(2020-08-13\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200812.1743.010.html(2020-08-13))

盐酸罗哌卡因对低氧诱导的肺癌细胞生长和转移能力的影响*

赖晓红,杨承祥,刘洪珍,梁桦,李露君,周桥灵,王汉兵
(广东省佛山市第一人民医院麻醉科 528000)

[摘要] **目的** 探讨盐酸罗哌卡因对低氧诱导的肺癌细胞生长和转移能力的影响。**方法** 用培养板接种人肺腺癌 A549 细胞,培养 24 h 后,按照随机数字表法分为 5 组:常氧组(N 组)、低氧组(H 组)、0.5 mmol/L 盐酸罗哌卡因联合低氧组(R1H)、1.0 mmol/L 盐酸罗哌卡因联合低氧组(R2H)、2.0 mmol/L 盐酸罗哌卡因联合低氧组(R3H)分别处理 A549 细胞。采用 CCK-8 法检测各组细胞处理 0、2、4、6 h 后的增殖抑制率。采用流式细胞仪检测各组细胞处理 4 h 的细胞凋亡率。采用 Transwell 法检测各组细胞处理 4 h 的侵袭和迁移能力。采用 Western blot 法检测各组细胞处理 4 h 后的低氧诱导因子(HIF)-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达水平。**结果** 低氧促进 A549 细胞增殖和转移,抑制细胞凋亡($P < 0.05$)。盐酸罗哌卡因抑制低氧诱导的 A549 细胞增殖、侵袭和迁移,促进细胞凋亡,HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达显著下调($P < 0.05$)。随着盐酸罗哌卡因浓度的增加,R1H、R2H、R3H 组中 A549 细胞的数量、侵袭和迁移细胞数依次降低($P < 0.05$)。HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达依次下调($P < 0.05$)。**结论** 盐酸罗哌卡因抑制低氧诱导肺癌细胞的增殖和转移,促进细胞凋亡,此作用可能与调控 HIF-1 α 有关。

[关键词] 肺癌细胞;低氧诱导因子-1 α ;盐酸罗哌卡因**[中图分类号]** R4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)20-3337-05**Effect of ropivacaine hydrochloride on growth and metastasis ability of hypoxic-induced lung cancer cells***LAI Xiaohong, YANG Chengxiang, LIU Hongzhen, LIANG Hua,
LI Lujun, ZHOU Qiaoling, WANG Hanbing(Department of Anesthesiology, Foshan Municipal First People's Hospital,
Foshan, Guangdong 528000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of ropivacaine hydrochloride on the growth and metastasis ability of lung cancer cells induced by hypoxia. **Methods** The human lung cancer A549 cells were inoculated in the culture plates. After culturing for 24 h, they were divided into the five groups according to the random number table method: normoxic group (group N), hypoxic group (group H), 0.5 mmol/L ropivacaine hydrochloride combined hypoxic group (R1H), 1.0 mmol/L ropivacaine hydrochloride combined hypoxic group (R2H) and 2.0 mmol/L ropivacaine hydrochloride combined hypoxic group (R3H). Then the five groups were treated respectively. The proliferation inhibition rate of cells in each group was detected by CCK-8 at 0, 2, 4, 6 h after treatment. The cellular apoptosis rate was detected by adopting the flow cytometry at 4 h after treatment. The cellular invasion and migration ability was determined by adopting the Transwell method at 4 h after treatment. The protein expressions of HIF-1 α , RhoA, ROCK1 in each group were detected by adopting the Western blot method at 4 h after treatment. **Results** Hypoxia promoted the proliferation and migration of A549 cells, inhibited the apoptosis of A549 cells ($P < 0.05$). Ropivacaine hydrochloride inhibited the proliferation, invasion and migration of hypoxia-induced A549 cell, promoted the apoptosis of A549 cells, and significantly down-regulated the protein expressions of HIF-1 α , RhoA and ROCK1 ($P < 0.05$). The cells number, invasion and the migration cells number in the R1H, R2H and R3H groups were significantly decreased in turn with ropivacaine hydrochloride concentration increase ($P < 0.05$). The protein expressions of HIF-1 α , RhoA and ROCK1 in the R1H, R2H and R3H groups were down-regulated in turn ($P < 0.05$). **Conclusion** Ropivacaine hydrochloride inhibits the proliferation and migration of lung cancer cells induced by hypoxia, promotes the

cellular apoptosis. This effect may be related to the regulation of HIF-1 α .

[Key words] lung cancer; HIF-1 α ; ropivacaine hydrochloride

肺癌已成为世界上发病率最高的癌症,具有预后差、早期转移、病死率高的特点^[1]。手术切除是治疗肺癌的有效方法之一^[2],但手术操作、应激和麻醉因素通过刺激下丘脑垂体肾上腺轴(HPA)-交感神经轴(SNS)会抑制机体的免疫功能,增强围术期肺癌细胞的侵袭性,导致肿瘤复发和转移,给患者预后造成不良的影响^[3-4]。因此防治手术期间肺癌细胞生长和转移有利于改善患者的转归。

低氧是实体肿瘤的基本特征,因氧供和氧需失衡所致。越来越多的体外细胞研究发现,低氧可促进肿瘤细胞的增殖、抑制肿瘤细胞凋亡,且可促进肿瘤细胞生长和转移^[5-6]。单肺通气(OLV)是肺癌切除术普遍应用的一项麻醉技术。单肺通气期间,肿瘤侧肺由于长时间处于无通气状态,导致通气/血流比值失调,从而加剧肺癌组织的低氧状态,促进肺癌细胞发生转移^[7]。因此,防止肺癌手术期间低氧导致的肿瘤细胞发生转移有利于降低术后患者肿瘤的转移和复发。

近期研究表明,局部麻醉药可抑制肿瘤转移、促进肿瘤细胞凋亡^[8]。盐酸罗哌卡因镇痛效果优良、作用时间长、毒性小,是目前临床广泛应用的局部麻醉药。肺癌手术创伤大、应激反应强、疼痛剧烈,临床上常复合椎旁神经阻滞或硬膜外阻滞术后镇痛来减轻围术期的创伤应激反应和术后疼痛,以期促进患者术后恢复^[9]。研究证实,盐酸罗哌卡因抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的 NCI-H838 肺癌细胞转移^[10]。但盐酸罗哌卡因是否能抑制低氧诱导的肺癌细胞的生长和转移能力尚不明确。因此,本文拟探讨盐酸罗哌卡因对低氧诱导肺癌细胞的生长和转移能力的影响。由于低氧诱导因子(HIF)-1 α 是调节肿瘤细胞适应和耐受低氧环境的核心转录因子^[11],本文还研究了盐酸罗哌卡因对低氧诱导肺癌细胞的生长和转移的影响是否与调控 HIF-1 α 表达有关。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

人肺腺癌 A549 细胞(中国科学院上海细胞生物医学研究所提供),盐酸罗哌卡因注射液(批号 NA-ZL, AstraZeneca 公司,瑞典),HIF-1 α 抗体(货号 ab1, Abcam 公司,英国),RhoA 抗体(货号 ab187027, Abcam 公司,英国),ROCK1 抗体(货号 ab134181, Abcam 公司,英国),CCK-8 溶液(Cat. No. C0037, 碧云天生物技术研究所,中国),10%胎牛血清(Hyclone 公司,美国),DMEM-高糖培养基(Hyclone 公司,美国),RPMI1640 培养基(Hyclone 公司,美国),PVDF 膜(Millipore 公司,美国),Transwell 小室(Corning 公司,美国),Matrigel 胶(BD 公司,美国),HRP 标记 GAPDH 内参(Abcam 公司,美国)。

1.2 细胞培养及分组

将人肺腺癌 A549 细胞放入含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养液,每毫升含链霉素 100 U 和青霉素 100 U,于 5%CO₂、37℃ 的培养箱中培养。每隔 2~3 d 更换 1 次培养基,以胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。取对数生长期细胞进行实验。低氧培养:将细胞放入密闭玻璃容器,通入 94% N₂、5%CO₂ 和 1%O₂,维持 37℃。低氧后复氧:细胞放回 5%CO₂ 的培养箱。取对数生长期的 A549 细胞,于培养板接种,接种 24 h 后进行实验。常氧组(N 组)细胞通入 95%空气、5%CO₂ 混合气体,6 L/min,持续 4 h;低氧组(H 组)通入 94%N₂、5%CO₂ 和 1%O₂,6 L/min,持续 4 h;盐酸罗哌卡因+低氧组(R1H 组、R2H 组、R3H 组)则分别加入 0.5、1.0、2.0 mmol/L 罗哌卡因和 94%N₂、5%CO₂ 和 1%O₂,6 L/min,持续 4 h。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

检测细胞增殖抑制率:A549 细胞接种于 96 孔板,每孔 1×10^4 个/mL,接种 24 h 后,细胞分别经低氧或盐酸罗哌卡因处理 2、4、6 h,再将细胞置入于 CO₂ 培养箱孵育 24 h。每组取 3 个培养孔。在每孔中加入 CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,酶标仪读板,CCK-8 检测读取 450 nm 时各孔光吸收值(OD 值)。计算细胞增殖抑制率(%)=(1-用药孔 OD 值/对照孔 OD 值)×100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

检测细胞凋亡率:将细胞浓度为 2×10^5 /mL 的 A549 细胞接种于 12 孔的培养板,于每孔加入 1 000 μ L 的细胞悬液。培养 24 h 后,细胞分别经低氧或盐酸罗哌卡因处理 4 h 后,置入条件为 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h。每组取 3 个培养孔,取细胞离心、收集悬浮细胞。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,离心后收集细胞,用 500 μ L 的 1×结合缓冲液重悬细胞,加入磷脂结合蛋白 V-荧光素 1.25 μ L,于 24℃ 避光反应 15 min,加入 10 μ L 的碘化丙啶,染色 5 min、4℃ 避光 5 min 后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.5 Transwell 法检测细胞侵袭和迁移能力

检测细胞侵袭:A549 细胞接种于 24 孔板,每孔 2×10^5 个,接种 24 h 后经低氧和盐酸罗哌卡因处理 4 h。取 Matrigel 胶,放在 4℃ 的冰箱中,溶解 24 h。后取 50 μ L 铺在 Transwell 小室上、下室之间,即铺在聚碳酸酯微孔膜(孔径为 8 μ m)上,于 37℃ 下放置 30 min。细胞(每孔 1×10^5 个)接种在上室,加入无血清的 RPMI1640 培养基 100 μ L,下室加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基 600 μ L,在 37℃ 下放置 12 h。洗涤、消化细胞,用含 0.2%BSA 的无血清培养基重悬后收集细胞,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养 24 h。在室温下用甲醛固定,时间为 15 min,去除固定液,加入 0.5%的结晶紫染液,于室温中作用 10 min。用

表 1 5 组人肺腺癌 A549 细胞增殖抑制率的比较 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	处理 0 h	处理 2 h	处理 4 h	处理 6 h
N 组	0	0	0	0
H 组	-0.59 ± 0.08^a	-2.86 ± 0.79^a	-6.94 ± 0.33^a	-9.10 ± 0.20^a
R1H 组	0.29 ± 0.27^b	15.17 ± 0.64^{bc}	21.94 ± 0.23^{bef}	30.76 ± 0.52^{befg}
R2H 组	0.44 ± 0.16^{bc}	21.75 ± 1.45^{bce}	32.21 ± 0.53^{bef}	41.78 ± 1.98^{bcefg}
R3H 组	0.65 ± 0.12^{bcd}	34.26 ± 0.73^{bede}	42.45 ± 1.09^{bedef}	51.53 ± 0.53^{bedefg}

^a: $P < 0.05$, 与 N 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 H 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 R1H 组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 R2H 组比较; ^e: $P < 0.05$, 与相同浓度 0 h 比较; ^f: $P < 0.05$, 与相同浓度 2 h 比较; ^g: $P < 0.05$, 与相同浓度 4 h 比较。

棉签擦去基质胶和上室未穿过膜的细胞, 拍照并计数穿过滤膜的细胞数。随机选取 5 个视野 ($\times 100$), 取平均值。相同条件重复本实验 3 次, 取平均值。检测细胞迁移: 实验与上述检测细胞侵袭能力实验基本一致, 但不使用 Matrigel 胶。

1.6 Western blot 法检测 HIF-1 α , RhoA 和 ROCK1 蛋白表达

检测蛋白的表达: A549 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10^6 个, 接种 24 h 后经低氧和盐酸罗哌卡因处理 4 h, 收集细胞, 每组取 3 个培养孔。加入胰酶消化细胞, 离心 10 min, 除去培养液, 用 PBS 洗涤, 后加入细胞裂解液 100 μ L, 裂解细胞并离心 5 min, 收集上清液。用 BCA 溶液测定总蛋白浓度。提取样品蛋白溶液 10 μ g, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 后冲洗。将蛋白转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 (含 0.1% Tween20) 封闭抗原, 后分别加入抗 HIF-1 α 、抗 RhoA 抗体和抗 ROCK1 抗体, 孵育过夜, 用 TBST 漂洗膜 3 次, 每次漂洗 15 min, 加入相应二抗 [由辣根过氧化物酶体 (HRP) 标记], 避光孵育 1 h, 后用 TBST 避光将膜漂洗 3 次, 每次漂洗 15 min, 后放在暗盒中显影。扫描 PVDF 膜, 将 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 的光密度值与 GAPDH 的光密度值作对比, 其比值反映 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达水平。相同条件下重复本实验 3 次, 取平均值。

1.7 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计学软件分析数据, 计量资料采用统计学处理表示。增殖抑制率比较采用两因素析因设计的方差分析, 单独效应分析采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 法 (方差齐) 或 Dunnett's T3 法 (方差不齐) 分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组 A549 细胞增殖抑制率的比较

结果显示, 与 N 组相比, H 组细胞的增殖抑制率明显降低 ($P < 0.05$)。与 H 组相比, 盐酸罗哌卡因 + 低氧组的增殖抑制率明显上升 ($P < 0.05$)。经析因分析发现, 不同盐酸罗哌卡因处理浓度的各组间增殖抑制率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同盐酸罗哌卡因处理时间各组间增殖抑制率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。不同盐酸罗哌卡因处理浓度与罗哌卡因处理时间这两个因素无交互效应 ($P > 0.05$)。各个处理时间的 R2H、R3H 组增殖抑制率均高于 R1H

($P < 0.05$), 其中 R3H 组增殖抑制率大于 R2H 组增殖抑制率 ($P < 0.05$); R1H、R2H、R3H 组处理 6 h 的增殖抑制率大于处理 4 h 的增殖抑制率大于处理 2 h 的增殖抑制率 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 各组 A549 细胞凋亡率、侵袭力和迁移能力的比较

结果显示, 与 N 组相比, H 组细胞的凋亡率明显降低 ($P < 0.05$), 侵袭力和迁移能力明显增加 ($P < 0.05$)。与 H 组相比, 盐酸罗哌卡因 + 低氧组的细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.05$), 侵袭数和迁移数明显减少 ($P < 0.05$)。随着盐酸罗哌卡因浓度的升高, R1H、R2H 和 R3H 组的细胞凋亡率依次上升 ($P < 0.05$), 侵袭数和迁移数依次减少 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 5 组人肺腺癌 A549 细胞凋亡率、侵袭细胞数和迁移细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡率 (%)	侵袭细胞数 (个/视野)	迁移细胞数 (个/视野)
N 组	5.32 ± 0.23	90 ± 6	9 ± 2
H 组	1.14 ± 0.11^a	266 ± 6^a	74 ± 5^a
R1H 组	28.53 ± 0.84^b	237 ± 3^b	54 ± 4^b
R2H 组	42.46 ± 1.96^{bc}	215 ± 13^{bc}	38 ± 3^{bc}
R3H 组	53.05 ± 2.38^{bcd}	155 ± 7^{bcd}	20 ± 4^{bcd}

^a: $P < 0.05$, 与 N 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 H 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 R1H 组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 R2H 组比较。

表 3 5 组人肺腺癌 A549 细胞 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达的比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	RhoA	ROCK1
N 组	0.24 ± 0.02	0.72 ± 0.01	0.60 ± 0.03
H 组	1.31 ± 0.11^a	1.74 ± 0.16^a	1.82 ± 0.24^a
R1H 组	1.01 ± 0.06^b	1.44 ± 0.12^b	1.38 ± 0.11^b
R2H 组	0.64 ± 0.02^{bc}	1.02 ± 0.07^{bc}	0.91 ± 0.08^{bc}
R3H 组	0.52 ± 0.02^{bcd}	0.65 ± 0.04^{bcd}	0.47 ± 0.01^{bcd}

^a: $P < 0.05$, 与 N 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 H 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 R1H 组比较; ^d: $P < 0.05$, 与 R2H 组比较。

2.3 各组 A549 细胞 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 表达的影响

Western blot 结果显示, 与 N 组相比, 低氧处理可显著上调 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 表达水平 ($P < 0.05$)。与 H 组相比, 盐酸罗哌卡因 + 低氧组 HIF-

1 α 、RhoA 和 ROCK1 表达水平明显下调($P < 0.05$)。随着盐酸罗哌卡因浓度的升高,R1H、R2H 和 R3H 组 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 表达水平依次下调($P < 0.05$)。见表 3 和图 1。

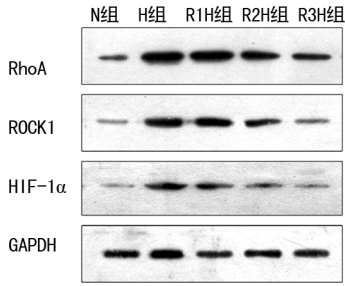


图 1 5 组人肺腺癌 A549 细胞 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达图

3 讨 论

低氧是肺癌、乳腺癌等实体肿瘤内环境的基本现象,因肿瘤细胞的快速增殖与异常的血管结构所致,在肿瘤转移的过程中起重要作用^[12]。研究表明,低氧微环境促进肿瘤的增殖、侵袭和迁移,抑制肿瘤细胞的凋亡^[13-14],且与肺癌转移及其不良预后息息相关^[15]。临床上,单肺通气是广泛用于肺癌手术的一项技术,此技术导致通气/血流比值失调,加剧低氧,促进肺癌的转移^[7]。本研究发现,低氧促进肺癌细胞增殖、侵袭和迁移,抑制细胞凋亡。本研究参照文献^[16]和预实验中盐酸罗哌卡因的作用浓度和时间,选择盐酸罗哌卡因的浓度为 0.5、1.0、2.0 mmol/L,时间为 4 h。结果表明,盐酸罗哌卡因可抑制低氧诱导的肺癌细胞增殖;随着盐酸罗哌卡因浓度和作用时间的增加,抑制细胞增殖的作用随之增强。同时,盐酸罗哌卡因也可抑制低氧诱导的肺癌细胞发生侵袭和迁移,促进细胞凋亡,且随着盐酸罗哌卡因浓度的增加,这一作用也随之增强。

低氧可激活肿瘤细胞内一系列信号转导通路产生应答反应,其中重要的产物之一是 HIF-1,因为它常常在常氧细胞中迅速降解^[17]。已证实,HIF-1 在肿瘤细胞的生长及转移的过程中发挥了重要的作用^[18]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成的异二聚体转录因子,其中 HIF-1 α 不仅在多种恶性肿瘤中均高表达,而且是调节肿瘤细胞适应低氧环境的核心转录因子,与肺癌、胃癌等恶性肿瘤发生增殖、凋亡、血管再生、侵袭与转移息息相关^[19]。本研究的结果表明,在低氧状态下,HIF-1 α 蛋白水平明显升高,盐酸罗哌卡因可显著下调低氧状态下细胞 HIF-1 α 的表达,提示盐酸罗哌卡因抑制低氧诱导肺癌细胞增殖、转移和促进细胞凋亡的作用可能与下调 HIF-1 α 蛋白水平有关。

小 G 蛋白 RhoA 是 Rho 家族中最为关键的蛋白之一,参与调节几种重要转录因子的表达,其中包括低氧状态下对 HIF-1 α 的调节^[20]。ROCK 是其重要的下游蛋白之一,包括具有高度同源性的 ROCK1 和

ROCK2,其中 ROCK1 高度表达于肺癌、肝癌等肿瘤细胞^[21]。RhoA 和 ROCK1 的高表达与肿瘤的进展密切相关,RhoA/ROCK1 信号转导通路激活后,通过重建细胞骨架、改变细胞的黏附力等,促进肺癌、卵巢癌、膀胱癌和神经胶质细胞瘤等肿瘤细胞的生长和转移,提示 RhoA/ROCK1 信号转导通路在肿瘤细胞的生长和转移的过程中发挥着重要的作用^[22-24]。目前已有研究证实,低氧激活 RhoA/ROCK1 信号通路,可上调 HIF-1 α 的表达^[20,25]。同时研究显示,在低氧状态下,RhoA/ROCK1 信号通路激活后可上调 HIF-1 α 的表达,抑制卵巢癌细胞的凋亡^[26]。本研究的结果表明,在低氧状态下,RhoA 和 ROCK1 蛋白表达增高,盐酸罗哌卡因可显著下调低氧状态下的 RhoA 和 ROCK1 蛋白的表达,这与 HIF-1 α 表达的变化是一致的,表明盐酸罗哌卡因可抑制低氧诱导的肺癌细胞的生长和转移,下调 HIF-1 α 、RhoA 和 ROCK1 蛋白的表达,从而提示盐酸罗哌卡因抑制肺癌细胞的生长和转移可能与 RhoA/ROCK1- HIF-1 α 信号通路有关。

综上所述,盐酸罗哌卡因可抑制体外培养人肺腺癌 A549 细胞的生长和转移,其机制可能与抑制 RhoA/ROCK1- HIF-1 α 信号转导通路有关。

参考文献

- [1] AMANDA M, APAR K G. Lung cancer-A global perspective[J]. J Surg Oncol, 2017, 115 (5): 550-554.
- [2] BANIK A, LUSZCZYNSKA A, PAWLOWSKA I, et al. Enabling, not cultivating: received social support and self-efficacy explain quality of life after lung cancer surgery[J]. Ann Behav Med, 2016, 51(1): 1-12.
- [3] OSCAR PÉREZ-GONZÁLEZ, LUIS F. CUÉLLAR-GUZMÁN, JOSÉ SOLIZ, et al. Impact of regional anesthesia on recurrence, metastasis, and immune response in breast cancer surgery [J]. Reg Anesth Pain Med, 2017, 42(6): 751-756.
- [4] RYUNGSA K. Anesthetic technique and cancer recurrence in oncologic surgery: unraveling the puzzle[J]. Cancer Metastasis Rev, 2017, 36(1): 159-177.
- [5] WANG Y, QI Z H, ZHOU M L, et al. Stanniocalcin-1 promotes cell proliferation, chemoresistance and metastasis in hypoxic gastric cancer cells via Bcl-2 [J]. Oncol Rep, 2019, 41(3): 1998-2008.
- [6] JI R C. Hypoxia and lymphangiogenesis in tumor microenvironment and metastasis [J]. Cancer Lett, 2014, 346(1): 6-16.

- [7] KINSEY C M, ESTEPAR R S, ZHAO Y, et al. Invasive adenocarcinoma of the lung is associated with the upper lung regions [J]. *Lung Cancer*, 2014, 84(2): 145-150.
- [8] CHANG Y C, LIU C L, CHEN M J, et al. Local anesthetics induce apoptosis in human breast tumor cells [J]. *Anesth Analg*, 2014, 118(1): 116-124.
- [9] CATA J P, GOTTUMUKKALA V, THAKAR D, et al. Effects of postoperative epidural analgesia on recurrence-free and overall survival in patients with nonsmall cell lung cancer [J]. *J Clin Anesth*, 2014, 26(1): 3-17.
- [10] PIEGELER T, SCHLAPFER M, DULL RO, et al. Clinically relevant concentrations of lidocaine and ropivacaine inhibit TNF α -induced invasion of lung adenocarcinoma cells in vitro by blocking the activation of Akt and focal adhesion kinase [J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(5): 784-791.
- [11] CHANG J, ERLER J. Hypoxia-mediated metastasis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 772(1): 55-81.
- [12] JOSH W D, DANIELE M G. Tumor hypoxia as an enhancer of inflammation-mediated metastasis: emerging therapeutic strategies [J]. *Target Oncol*, 2018, 13(2): 157-173.
- [13] LI L, REN F Y, QI C, et al. Intermittent hypoxia promotes melanoma lung metastasis via oxidative stress and inflammation responses in a mouse model of obstructive sleep apnea [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 19-28.
- [14] LI X C, LIU X S, XU Y J, et al. KLF5 promotes hypoxia-induced survival and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer cells via HIF-1 α [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(4): 1507-1514.
- [15] HONG C F, CHEN W Y, WU C W. Upregulation of Wnt signaling under hypoxia promotes lung cancer progression [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1706-1714.
- [16] BUNDSCHERER A, MALSY M, GEBHARDT K, et al. Effects of ropivacaine, bupivacaine and sufentanil in colon and pancreatic cancer cells in vitro [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 95(1): 126-131.
- [17] CHRISTOS K K, SOTIRIOS G P, MARIOS A D, et al. mRNA overexpression of the hypoxia inducible factor 1 alpha subunit gene (HIF1A): an independent predictor of poor overall survival in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Leukemia Research*, 2017, 53(1): 65-73.
- [18] KUMAR V, GABRILOVICH D I. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment [J]. *Immunology*, 2014, 143(4): 512-519.
- [19] QIAN J L, BAI H, GAO Z Q, et al. Downregulation of HIF-1 α inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer NCI-H157 cells [J]. *Oncol Letters*, 2016, 11(3): 1738-1744.
- [20] KIM J G, ISLAM R, JUNG Y C, et al. Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [21] MATSUBARA M, BISSELL M J. Inhibitors of Rho kinase (ROCK) signaling revert the malignant phenotype of breast cancer cells in 3D context [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 31602-31622.
- [22] MU G G, DING Q S, LI H Y, et al. Gastrin stimulates pancreatic cancer cell directional migration by activating the G α 12/13-RhoA-ROCK signaling pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(5): 1-14.
- [23] WANG X Y, HAN L N, SHAN S M, et al. KRT14 promoting invasion and migration of lung cancer cells through ROCK-1 signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017, 10(1): 795-803.
- [24] DENG B L, LIU R R, TIAN X, et al. Simulated microgravity inhibits the viability and migration of glioma via FAK/RhoA/Rock and FAK/Nek2 signaling [J]. *In Vitro Cell Dev Bio Anim*, 2019, 55(4): 260-271.
- [25] GONZALEZ R P, FALCON D, CASTRO M J, et al. Hypoxic induction of T-type Ca (2+) channels in rat cardiomyocytes; role of HIF-1 α and RhoA/ROCK signaling [J]. *J Physiol*, 2015, 593(21): 4729-4745.
- [26] TSUYOSHI O, TOSHIFUMI T, TAE S, et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(1): 25-33.