

氯胺酮对人肺癌 A549 细胞生长的影响及相关机制研究

陈小红¹, 黄涛¹, 门艳华¹, 吴溪兴², 曹汉忠^{1*}

(¹南通大学附属肿瘤医院麻醉科, 江苏 南通 226361; ²南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨麻醉类药物氯胺酮和吗啡对人肺癌 A549 细胞生长的影响及相关作用机制。方法:体外培养肺癌细胞系 A549, 细胞培养 24 h 后, 随机分为 3 组:对照组(NC 组, 加 0.9% NaCl 处理)、氯胺酮组(K1、K2、K3 组, 分别加氯胺酮 100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理)和吗啡组(M1、M2、M3 组, 分别加吗啡 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理)。持续作用 24 h 后, Transwell 小室培养体系测定肿瘤细胞的迁移率; 双荧光素酶报告基因法测定 NF- κB 转录活性; 48 h 后 MTT 法测定细胞增殖抑制率; Western blot 技术测定 NF- κB P65 的蛋白表达; QPCR 技术检测细胞内 IL-1 β 和 COX-2 的 mRNA 表达。结果:①与 NC 组比较, M1、M2 组表现为促进 A549 细胞迁移($P < 0.05$), M3 组作用不明显; K1、K2、K3 组表现为抑制 A549 细胞迁移($P < 0.05$); ②与 NC 组比较, M1、M2 组表现为促进 A549 细胞增殖($P < 0.05$), M3 组作用不明显; K2、K3 组表现为抑制 A549 细胞增殖($P < 0.05$), K1 组不明显; ③与 NC 组比较, M1、M2、M3 组表现为促进 IL-1 β 、COX-2 的 mRNA 表达($P < 0.05$); K2、K3 组表现为抑制 IL-1 β 、COX-2 的 mRNA 表达($P < 0.05$), K1 组不明显; ④与 NC 组比较, M1、M2、M3 组表现为促进 P65 的转录和蛋白表达($P < 0.05$), K1、K2、K3 组表现为抑制 P65 的转录和蛋白表达($P < 0.05$)。结论:与阿片类药物不同, 氯胺酮通过 NF- κB 信号通路及其下游因子 IL-1 β 和 COX-2 抑制人肺腺癌细胞 A549 的迁移和增殖, 可能更适用于肺癌患者的术后镇痛。

[关键词] A549 细胞; 氯胺酮; 吗啡; NF- κB

[中图分类号] R971.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1387-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20151011

The effect and mechanism of ketamine on proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells

Chen Xiaohong¹, Huang Tao¹, Men Yanhua¹, Wu Lixing², Cao Hanzhong^{1*}

(¹Department of Anesthesiology, Nantong Tumor Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226361; ²School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of anesthetic ketamine and morphine on the proliferation of cultured human lung adenocarcinoma A549 cell. **Methods:** Human lung adenocarcinoma A549 cells were treated with different concentration of ketamine(K1, K2, K3 is 100, 200, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and morphine(M1, M2, M3 is 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) for 24 and 48 h. After cultured for 24 h, the effect of ketamine and morphine on the invasive ability of A549 cells were measured by transwell invasion. NF- κB transcription activity were determined by luciferase assay. After cultured for 48 h, the proliferation inhibition rates of A549 cells were assessed by methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay. Protein expressions of NF- κB P65 were determined by Western blot. IL-1 β and COX-2 expression were determined by QPCR. **Results:** (1) Compared with the control group, M1 and M2 enhanced A549 cell proliferation and migration ($P < 0.05$), while K1, K2 and K3 suppressed A549 cells migration ($P < 0.05$). (2) M1, M2 and M3 enhanced IL-1 β and COX-2 expression($P < 0.05$), but K2 and K3 had opposing effects($P < 0.05$). M1, M2, and M3 enhanced NF- κB and P65 transcription activity and protein expressions ($P < 0.05$), while K1, K2 and K3 had opposing effects($P < 0.05$). **Conclusion:** Unlike opioids, ketamine inhibits the proliferation and migration of A549 through NF- κB and its downstream factor IL-1 β and COX-2, may be more suitable for lung cancer patients postoperative analgesia.

[Key words] A549; ketamine; morphine; NF- κB

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1387-1392]

[基金项目] 南通市市级科技计划(指导性, HS13928)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chz-zp@163.com

近年来,由于环境因素、生活压力等多种因素的作用,肺癌发病率逐年升高,外科手术是治疗早期肺癌的首选方法,也是肺癌综合治疗的前提和基础。但是术后肿瘤复发与转移加速仍是恶性肿瘤患者死亡的最主要原因,也是临床工作中非常棘手的一个问题。早在 19 世纪 80 年代,有学者发现手术可以促进肿瘤细胞的生长,并观察到肿瘤患者术后复发现象^[1]。近年来,有研究者发现麻醉药物或麻醉方法对肿瘤患者术后转归也有影响^[2]。虽然手术后肿瘤的复发转移主要与术前肿瘤的生物学特性、病理类型、浸润程度等因素有关,然而术后镇痛对肿瘤复发与转移的影响不可忽视。阿片类药物因其强大的镇痛作用被广泛应用于癌性疼痛及恶性肿瘤患者的术后镇痛治疗。研究发现术后使用吗啡镇痛,可导致自然杀伤细胞(NK 细胞)数量减少和功能抑制,削弱免疫屏障作用^[3],阿片类药物还可以促进 Th0 淋巴细胞向 Th2 淋巴细胞方向分化,抑制 T 细胞免疫^[4]。最新的直接证据表明,阿片受体激动剂可以促进肿瘤细胞的生长,阿片受体拮抗剂或阿片受体基因敲除可以在体外抑制包括肺癌细胞在内的恶性肿瘤细胞的生长和侵袭^[5-6]。

因此,面临日益增多的肿瘤患者,寻求可抑制术后残余肿瘤细胞生长与转移的镇痛途径与药物,以减少或替代阿片类药物的使用非常必要。氯胺酮(ketamine)是一种 NMDA 受体拮抗剂,还兼具较弱的 μ 受体与 δ 受体结合作用,在临床麻醉与镇痛领域具有广泛的应用价值。研究发现亚麻醉剂量的氯胺酮具有良好的术后镇痛作用^[7-8],手术后使用氯胺酮可以减少疼痛患者吗啡的消耗量^[9],不仅如此,单独使用氯胺酮对顽固性癌性疼痛、癌痛中的爆发痛具有很好的治疗作用^[10]。因此,本文拟在细胞水平研究氯胺酮相比于阿片类药物在对癌细胞的迁移和增殖方面有无不同之处,并初步探索其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞购自中科院上海细胞生物医学研究所,由本院实验室保存。吗啡(morphine,批号:140303-2,东北制药集团沈阳第一制药有限公司),氯胺酮(ketamine,批号:KH140406,江苏恒瑞医药股份有限公司),miRNA 定量试剂盒(上海依祥生物技术有限公司),F-12K 培养基(Gibco 公司,美国),FBS 胎牛血清(杭州四季青生物技术公司),0.25%胰蛋白酶(Hyclone 公司,美国),TRIzol RNA 抽提试剂(Invitrogen 公司,美

国),反转录试剂,SYBR Green Mix(大连宝生物),兔抗人 NF- κ B P65 抗体(Abcam 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 人肺腺癌 A549 细胞的培养

细胞复苏培养成功后,取对数期生长的 A549 细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中。

1.2.2 Transwell 法检测细胞迁移能力

细胞接种于 12 孔培养板中培养 24 h 后,接受不同浓度吗啡 [M1 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、M2 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、M3 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)]、氯胺酮 [K1 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、K2 (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、K3 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)] 处理。处理完毕后放回 37°C 、5% CO_2 培养箱中。继续培养 24 h 后采用 Transwell 小室测细胞迁移能力。细胞采用结晶紫染色,显微镜下观察、拍照。采用 ImageJ 软件分析紫色细胞的面积,然后计算抑制率 = $[1 - (\text{处理组细胞面积} - \text{对照组细胞面积}) / \text{对照组细胞面积}] \times 100\%$ 。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖能力

细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 5×10^3 个细胞,培养 24 h 后采用上述不同浓度的药物处理,每组设 5 个平行孔,继续培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,继续 37°C 孵育 4 h 后,吸尽培养液,加入 150 μL DMSO 孵育 10 min 后,采用酶标仪检测 570 nm 各孔的吸光度(OD 值)。计算增殖抑制率 = $[1 - (\text{处理组 OD 值} - \text{对照组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值}] \times 100\%$ 。

1.2.4 QPCR 检测细胞 IL-1 β 和 COX-2 mRNA 的表达影响

细胞接种于 24 孔培养板培养 24 h,采用上述不同浓度的药物处理,继续培养 48 h 后,弃去上清培养液,PBS 冲洗 2 次,采用 TRIzol 法提取总 RNA,进一步采用反转录试剂盒将各组细胞总 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,采用目的基因 IL-1 β 、COX-2 及内参 GAPDH 引物(表 1)进行实时荧光定量 PCR 鉴定,扩增程序为 95°C 5 min 预变性。 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s,扩增 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量,分析各组细胞的基因表达差异。

1.2.5 双荧光素酶报告基因法测定 NF- κ B P65 转录活性

上述不同浓度药物干预细胞 A549 的同时,将 NF- κ B 萤火虫荧光素酶报告质粒 pNF κ B-TA-luc 和海肾荧光素酶 pRL-TK 内参照质粒按 10:1 的比例混合后,采用 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche 公司,美国)转染 A549 细胞,加入

表 1 引物序列及 PCR 产物大小

Table 1 Primer sequences and product size		
基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
IL-1 β	上游 TCCCCAGCCCTTTTGTGA	91
	下游 TTAGAACCAAATGTGGCCGTG	
COX-2	上游 TGAGTACCGCAAACGCTTTA	143
	下游 GCTTTTCTACCAGAAGGGCA	
GAPDH	上游 GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	225
	下游 GAAGATGCTGATGGGATTTTC	

100 μ L 裂解液裂解细胞,采用双荧光素酶报告检测试剂检测萤火虫荧光素酶活性 (firefly activity, FA)和海肾荧光素酶活性 (renilla activity, RA);以海肾荧光素酶活性 (RA)做均一化,计算 NF- κ B 激活的相对活性。

1.2.6 Western blot 检测麻醉剂干预后对细胞胞浆蛋白 NF- κ B P65 表达的影响

上述不同浓度的药物处理 A549 细胞 48 h 后提取细胞胞浆蛋白,BCA 法测细胞蛋白浓度,取等量蛋白 (40 μ g) 经 SDS-PAGE 电泳,然后转移至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,一抗室温孵育 2 h 后,TBST 洗涤 3 次,加入二抗室温孵育 2 h,TB-

ST 洗涤 3 次,然后 ECL 显色,暗室曝光。

1.3 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析及 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯胺酮和吗啡对 A549 细胞迁移能力的影响

与 NC 组比较,M1、M2 组促进细胞的迁移 ($P < 0.05$),M3 组促进细胞迁移作用不明显 ($P > 0.05$);K1、K2、K3 组抑制细胞的迁移 ($P < 0.05$,图 1)。

2.2 氯胺酮和吗啡对 A549 细胞增殖抑制率的影响

与 NC 组比较,M1、M2 组对细胞增殖有一定的促进作用 ($P < 0.05$),M3 组对细胞增殖的促进作用不明显 ($P > 0.05$);K2、K3 组对细胞增殖有抑制作用 ($P < 0.05$),K1 组对细胞增殖抑制作用不明显 ($P > 0.05$,图 2)。

2.3 氯胺酮和吗啡对 A549 细胞 NF- κ B P65 蛋白表达水平的影响

与 NC 组比较,M1、M2、M3 组促进 P65 蛋白表

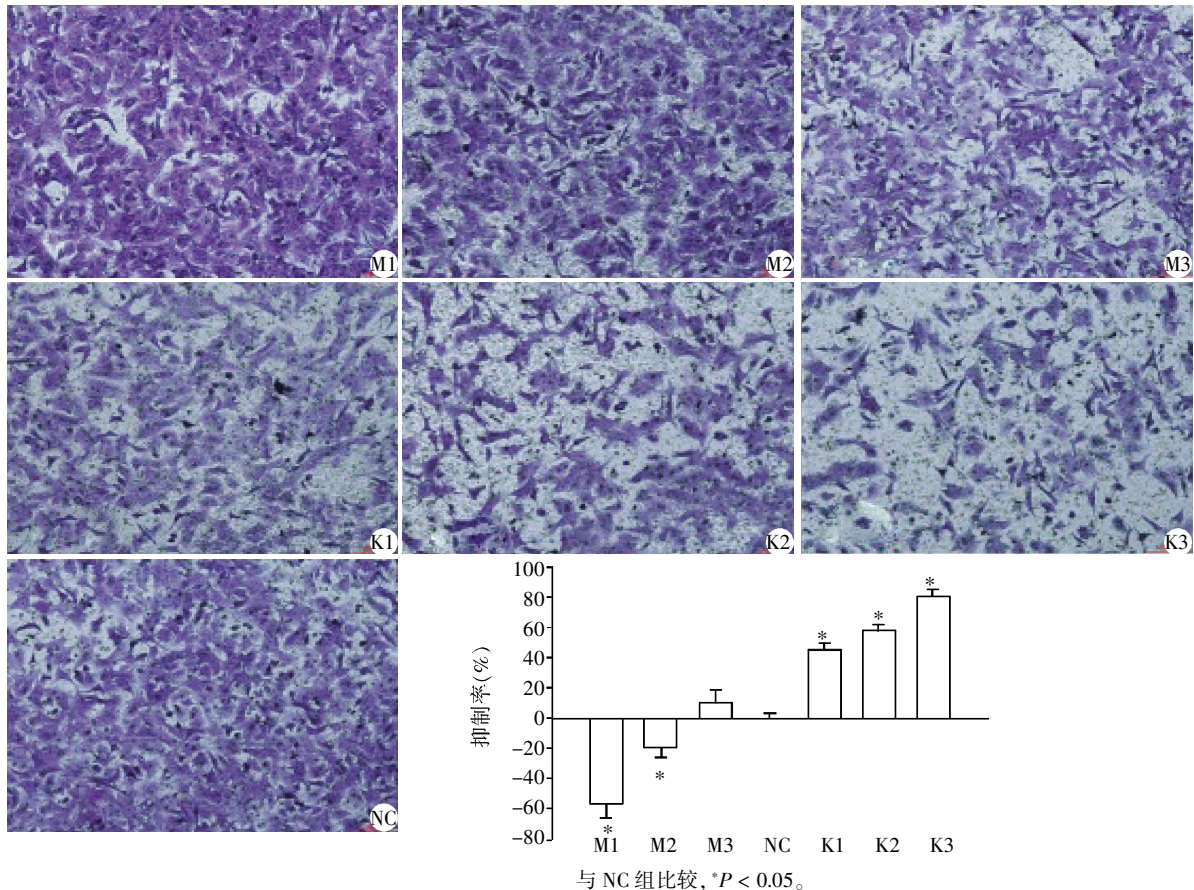


图 1 各组细胞迁移能力的比较 ($\times 40$)

Figure 1 The migration ability of each group ($\times 40$)

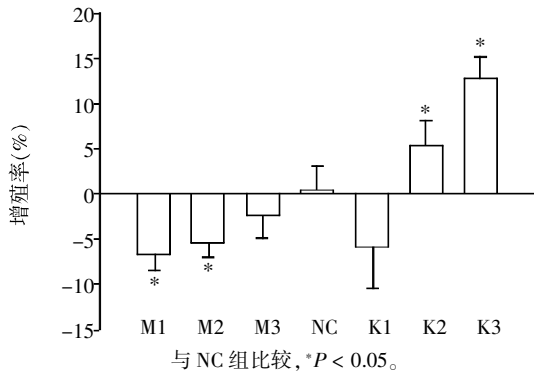


图 2 各组细胞增殖能力的比较

Figure 2 The proliferation ability of each group

达($P < 0.05$), K1、K2、K3 组抑制 P65 蛋白表达($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 氯胺酮和吗啡对 A549 细胞 IL-1 β 和 COX-2, mRNA 表达水平的影响

与 NC 组比较, M1、M2、M3 组促进 IL-1 β mRNA 的表达($P < 0.05$), K2、K3 组抑制 IL-1 β mRNA 的表达($P < 0.05$, 图 4); 与 NC 组比较, M1、M2、M3 组促进 COX-2 mRNA 的表达($P < 0.05$), K2、K3 组抑制 COX-2 mRNA 的表达($P < 0.05$, 图 5)。

2.5 氯胺酮和吗啡对 A549 细胞 NF- κ B P65 转录活性的影响

与 NC 组比较, M1、M2、M3 组促进 P65 的转录($P < 0.05$), K1、K2、K3 组抑制 P65 的转录($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

肺癌根治性手术因解剖结构复杂, 导致疼痛的伤害性刺激因素多, 手术创伤大等特点引起开胸后

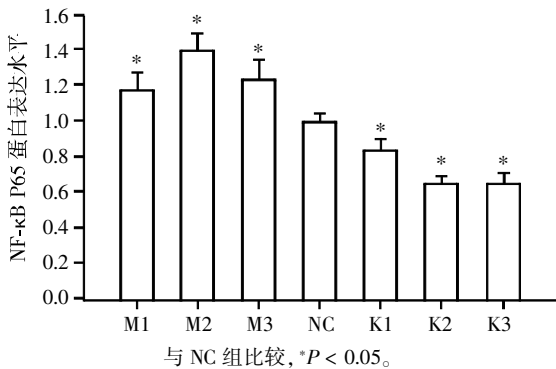
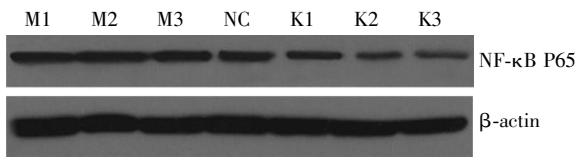


图 3 Western blot 检测各组细胞 NF- κ B P65 蛋白表达

Figure 3 Western blot test each cell NF- κ B P65 protein expression

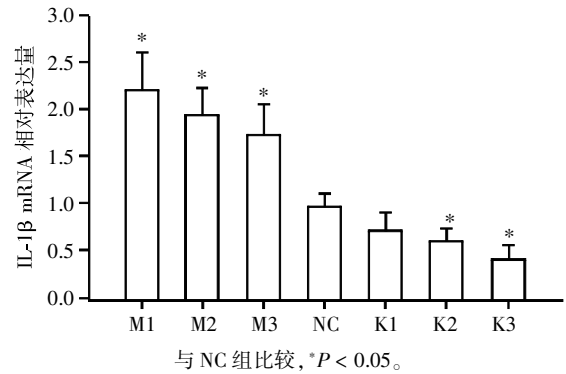


图 4 各组细胞 IL-1 β mRNA 表达水平比较

Figure 4 IL-1 β mRNA expression level of each group

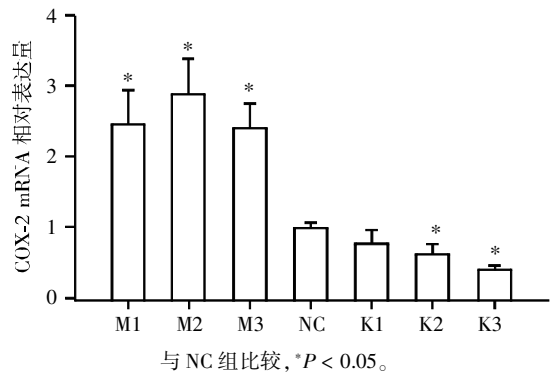


图 5 各组细胞 COX-2 mRNA 表达水平比较

Figure 5 COX-2 mRNA expression level of each group

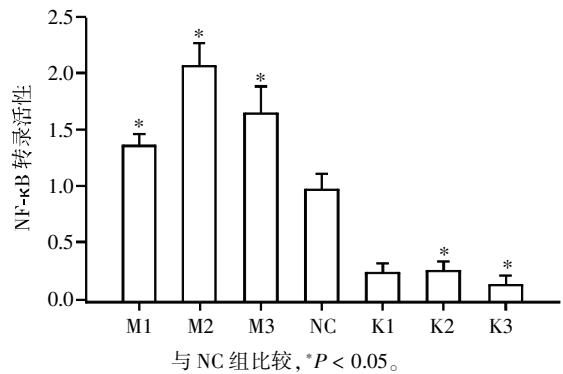


图 6 各组细胞 NF- κ B P65 转录活性比较

Figure 6 NF- κ B P65 transcriptional activity of each group

疼痛剧烈, 易发生术后并发症, 严重影响患者康复。因此, 此类患者围手术期管理和生理功能恢复尤为重要。

已有学者证实术后镇痛在术后恢复过程中的积极作用^[1]。阿片类药物因其强大的镇痛作用被广泛应用于癌性疼痛及恶性肿瘤患者的术后镇痛治疗。研究发现术后使用吗啡镇痛, 可导致 NK 细胞数量减少和功能抑制, 削弱免疫屏障作用^[3], 阿片类药物还可以促进 Th0 淋巴细胞向 Th2 淋巴细胞方向分化, 抑制 T 细胞免疫^[4]。最新的直接证据表明, 阿片受体激动剂可以促进肿瘤细胞的生长, 阿片受体

拮抗剂或阿片受体基因敲除可以在体外抑制包括肺癌细胞在内的恶性肿瘤细胞的生长和侵袭^[5-6]。手术和麻醉均会导致机体处于应激状态,抑制患者的免疫功能,一些炎症因子(如 IL-6、IL-8)也处于较高水平。Shavit 等^[12]研究也发现,绝大多数阿片类药物对免疫调节功能有抑制作用。本研究结果显示,与 NC 组比较,M1、M2 组促进 A549 细胞的迁移 ($P < 0.05$),M3 组不明显 ($P > 0.05$),与 NC 组比较,M1、M2 组对 A549 细胞增殖有一定的促进作用 ($P < 0.05$),M3 组不明显 ($P > 0.05$),表明吗啡低浓度促进肺癌 A549 细胞的生长和迁移,在高浓度时该促进作用不明显。吗啡对肿瘤细胞的影响是否与剂量相关,还有待进一步研究。

氯胺酮是一种 NMDA 受体拮抗剂,还兼具较弱的 μ 受体与 δ 受体结合作用,在临床麻醉与镇痛领域受到广泛应用。研究发现小剂量氯胺酮具有良好的术后镇痛作用^[7-8],手术后使用氯胺酮可以减少疼痛患者吗啡的消耗量^[9],不仅如此,单独使用氯胺酮对顽固性癌性疼痛、癌痛中的爆发痛具有很好的治疗作用^[10]。近年来小剂量氯胺酮(0.5 mg/kg)静脉注射,可大大降低不良反应的发生率^[13]WHO 已经把氯胺酮列为治疗神经病理性疼痛的基本药物,用于对阿片类受体的耐受和依赖的患者以及对大剂量吗啡不再敏感的患者。Correll 等^[14]研究发现,33 例慢性和传统疗法无效的复杂性局部疼痛综合征患者静脉应用小剂量氯胺酮后保持完全无痛时间明显延长,且没有发生明显的不良反应。小剂量氯胺酮也可用于儿童癌症患者,Finkel 等^[15]研究发现 11 例癌症晚期儿童及青春期少年在服用大剂量吗啡但癌痛没得到有效控制时,用吗啡联合小剂量氯胺酮镇痛,有 8 例患者疼痛得到明显控制,而吗啡相关的不良反应减少。Bentley 等^[16]研究表明,在口腔颌面恶性肿瘤术后,使用小剂量氯胺酮(0.5 mg/kg)镇痛(尤其是女性患者),可降低肿瘤的转移,这可能与术后镇痛使机体的免疫功能增强有关。本研究结果显示,与 NC 组比较,K1、K2、K3 组明显抑制肺癌 A549 细胞的迁移 ($P < 0.05$),K2、K3 组对肺癌 A549 细胞增殖有明显抑制作用 ($P < 0.05$),表明氯胺酮可抑制肺癌 A549 细胞的生长和迁移。

哺乳动物 NF- κ B 主要由 p50/p65 两个亚单位组成的二聚体。近年来很多研究发现 NF- κ B 能够控制细胞增殖和癌变,调控细胞周期及凋亡,影响细胞分化,促进肿瘤转移^[17]。特别是 p65 亚基可反式

激活很多基因,调节肿瘤细胞的生长、凋亡、血管形成和侵袭转移^[18-19]。NF- κ B 的激活促进癌基因的表达导致肺癌发生^[20]。在肺癌组织中 NF- κ B 的表达显著高于正常肺组织^[21]。NF- κ B 高表达与肺癌耐药明显相关,多药耐药基因的启动子区域包含 NF- κ B 结合序列。这些都间接或直接说明 NF- κ B 在肺癌发生发展过程中发挥重要作用^[22]。

IL-1 β 与 COX-2 是受 NF- κ B 调控的下游因子,在肿瘤发生发展中起到非常关键的作用。IL-1 β 在体外促进肺癌细胞 A549 生长、迁移,并促进其表达多种与肿瘤生长相关的信号物质如细胞因子、血管内皮生长因子^[23]。肺癌特别是腺癌细胞中环氧化酶 COX-2 的表达明显增高,COX-2 可以上调肺癌细胞表达血管内皮生长因子^[24],干扰 COX-2 基因表达将显著抑制肺癌细胞 A549 细胞生长和侵袭力,针对 COX-2 的抑制药物具有明显的抗肿瘤作用。已知氯胺酮可以抑制炎症反应时炎症细胞中核因子 NF- κ B 的激活,并能抑制 NF- κ B 调控的下游炎症因子的表达^[25]。研究发现氯胺酮可以抑制内毒素刺激后血浆炎症因子的升高,抑制多种组织内炎症因子的水平,阻止 NF- κ B 的激活,进一步的体外实验证实氯胺酮可以抑制内毒素刺激后单核巨噬细胞内 NF- κ B 的激活,并能抑制 NF- κ B 调控的下游炎症基因^[26]。氯胺酮的某些抗炎作用与抑制 COX-2 的表达密切相关,氯胺酮还能抑制 IL-1 β 的表达。本研究结果表明,与 NC 组比较,M1、M2、M3 组促进肺癌 A549 细胞 NF- κ B p65 蛋白表达和转录 ($P < 0.05$),K1、K2、K3 组抑制肺癌 A549 细胞 NF- κ B p65 蛋白表达和转录 ($P < 0.05$)。与 NC 组比较,M1、M2、M3 组促进肺癌 A549 细胞 IL-1 β 、COX-2 mRNA 的表达 ($P < 0.05$),K2、K3 组抑制肺癌 A549 细胞 IL-1 β 、COX-2 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。表明氯胺酮和吗啡对人肺腺癌 A549 细胞的影响与 NF- κ B 信号通路及其下游因子 IL-1 β 和 COX-2 有关。

因此,对肺癌手术患者围手术期镇痛及晚期肺癌患者癌痛治疗联合应用小剂量氯胺酮可减少阿片类药物的用量,以减少对患者免疫功能的抑制,但由于缺乏长期随访结果,患者术后远期恢复情况和生存率还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Gottschalk A, Sharma S, Ford J, et al. Review article: the role of the perioperative period in recurrence after cancer surgery[J]. Anesth Analg, 2010, 110(6): 1636-1643
- [2] Sessler DI. Long term consequences of anesthetic man-

- agement[J]. *Anesthesiology*, 2009, 111(1):1-4
- [3] Vallejo R, de Leon-Casasola O, Benyamin R. Opioid therapy and immunosuppression; a review[J]. *Am J Therap*, 2004, 11(5):354-365
- [4] Roy S, Balasubramanian S, Sumandeep S, et al. Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation[J]. *Surgery*, 2001, 130(2):304-309
- [5] Mathew B, Lennon FE, Siegler J, et al. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression; a laboratory investigation [J]. *Anesth Analg*, 2011, 112(3):558-567
- [6] Singleton PA, Moss J. Effect of perioperative opioids on cancer recurrence; a hypothesis[J]. *Future Oncol*, 2010, 6(8):1237-1242
- [7] Ryu HG, Lee CJ, Kim YT, et al. Preemptive Low-dose epidural ketamine for preventing chronic postthoracotomy pain: A prospective, double-blinded, randomized, clinical trial[J]. *Clin J Pain*, 2011, 27(4):304-308
- [8] Chazan S, Buda I, Neshner N, et al. Low-dose ketamine via intravenous patient-controlled analgesia device after various transthoracic procedures improves analgesia and patient and family satisfaction[J]. *Pain Manag Nurs*, 2010, 11(3):169-176
- [9] Neshner N, Ekstein MP, Paz Y, et al. Morphine with adjuvant ketamine vs higher dose of morphine alone for immediate postthoracotomy analgesia[J]. *Chest*, 2009, 136(1):245-252
- [10] Jackson K, Ashby M, Howell D, et al. The effectiveness and adverse effects profile of "burst" ketamine in refractory cancer pain: The VCOG PM 1-00 study[J]. *J Palliative Care*, 2010, 26(3):176-183
- [11] Joshi GP, Bonnet F, Shah R, et al. A systematic review of randomized trials evaluating regional techniques for post-thoracotomy analgesia[J]. *Anesth Analg*, 2008, 107(3):1026-1040
- [12] Shavit Y, Ben-Eliyahu S, Zeidel A, et al. Effects of fentanyl on Natural killer cell activity and on resistance to tumor metastasis in rats. Dose and timing study[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2004, 11(4):255-260
- [13] White RF. The role of non-opioid analgesic techniques in the management of pain after ambulatory surgery [J]. *Anesth Analg*, 2002, 94(3):577-585
- [14] Correll GE, Maleki J, Gracely EJ, et al. Subanesthetic ketamine infusion therapy; analysis of a novel therapeutic approach to complex regional pain syndrome[J]. *Pain Med*, 2004, 5(3):263-275
- [15] Finkel JC, Pestieau SR, Quezado ZM, et al. Ketamine as an adjuvant for treatment of cancer pain in children and adolescents[J]. *J Pain*, 2007, 8(6):515-521
- [16] Bentley MW, Stas JM, Johnson JM, et al. Effects of preincisional ketamine treatment on natural killer cell activity and postoperative pain management after oral maxillofacial surgery[J]. *AANA J*, 2005, 73(6):427-436
- [17] Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, et al. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells [J]. *FASEB J*, 2004, 18(15):1897-1899
- [18] Wiener Z, Otsouka EC, Jakob S, et al. Synergistic induction of the Fas (CD95) ligand promoter by Max and NFkappaB in human non-small lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 299(1):227-235
- [19] Chiou WF, Chen CC, Wei BL. 8-Prenylkaempferol suppresses influenza A virus-induced RANTES production in A549 cells via blocking PI3K-mediated transcriptional activation of NF-kB and IRF3 [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:920828
- [20] Ning Q, Wang X. Role of Rel A and I kappa B of nuclear factor kappa B in the release of interleukin-8 by cyclic mechanical strain in human alveolar type II epithelial cells A549[J]. *Respirology*, 2007, 12(6):792-798
- [21] Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(11):1652-1662
- [22] Luo H, Chen Z, Jin H, et al. Cyclooxygenase-2 up-regulates vascular endothelial growth factor via a protein kinase C pathway in non-small cell lung cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 30:6
- [23] Zhu YM, Azahri NS, Yu DC, et al. Effects of COX-2 inhibition on expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in lung cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:218
- [24] Chang HC, Lin KH, Tai YT, et al. Lipoteichoic acid-induced TNF-alpha and IL-6 gene expressions and oxidative stress production in macrophages are suppressed by ketamine through downregulating Toll-like receptor 2-mediated activation of ERK1/2 and NFkappaB [J]. *Shock*, 2010, 33(5):485-492
- [25] Suliburk JW, Helmer KS, Gonzalez EA, et al. Ketamine attenuates liver injury attributed to endotoxemia; role of cyclooxygenase-2[J]. *Surgery*, 2005, 138(2):134-140
- [26] Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, et al. Exploring the neuroimmunopharmacology of opioids; an integrative review of mechanisms of central immune signaling and their implications for opioid analgesia [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(3):772-810