doi:10.11659/jjssx.05E024125

·基础研究·

circ-0058063对食管癌细胞铁死亡作用机制的研究

胡东玉,李 慧,杨 东,刘海英,谷振芳 (济宁医学院附属医院肿瘤科,山东 济宁 272029)

[摘 要] **目的** 探究circ-0058063调控ERK/MAPK信号通路对食管癌细胞铁死亡的作用机制。**方法** 将EC9706细胞随机分为Control组、si-NC组、si-circ-0058063组和si-circ-0058063+ISO组。qRT-PCR检测食管癌组织及细胞中circ-0058063表达;CCK-8和克隆形成实验检测细胞增殖能力;检测细胞中Fe^{2+}、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和活性氧(ROS)水平;Western blot检测细胞中ERK/MAPK信号通路及铁死亡相关蛋白表达。**结果** 与癌旁组织相比,食管癌组织中circ-0058063表达水平明显升高($P<0.05$);人食管癌细胞EC9706中circ-0058063表达水平明显高于人正常食管上皮细胞HEEC($P<0.05$)。与Control组相比,si-circ-0058063组细胞中circ-0058063表达水平、细胞存活率、克隆细胞数、GSH水平、p-ERK1/2/ERK1/2和p-p38MAPK/p38MAPK比值及SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),细胞中Fe^{2+}、MDA及ROS水平均明显增加($P<0.05$);与si-circ-0058063组相比,si-circ-0058063+ISO组细胞中circ-0058063表达水平、细胞存活率、克隆细胞数、GSH水平、p-ERK1/2/ERK1/2和p-p38MAPK/p38MAPK比值及SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),Fe^{2+}、MDA及ROS水平均明显降低($P<0.05$)。**结论** 敲减circ-0058063可抑制食管癌细胞增殖,诱导食管癌细胞铁死亡,其作用机制可能与抑制ERK/MAPK信号通路激活有关。

[关键词] circ-0058063;食管癌;铁死亡;ERK/MAPK信号通路
[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-05-27

Mechanism of circ-0058063 on ferroptosis in esophageal cancer cells

HU Dong-yu, LI Hui, YANG Dong, LIU Hai-ying, GU Zhen-fang (Department of Oncology, Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining Shandong 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of action of circ-0058063 regulating ERK/MAPK signaling pathway on ferroptosis in esophageal cancer cells. **Methods** EC9706 cells were randomly divided into the Control group, the si-NC group, the si-circ-0058063 group, and the si-circ-0058063+ISO group. qRT-PCR was used to detect the expression of circ-0058063 in esophageal cancer tissues and cells; CCK-8 and clone formation assay were used to detect the cell proliferation ability. The levels of Fe^{2+}, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and reactive oxygen species (ROS) in cells were detected. Western blot was used to detect the ERK/MAPK signaling pathway and the expression of ferroptosis-related protein in cells. **Results** The expression level of circ-0058063 in esophageal cancer tissue was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$); the expression level of circ-0058063 in human esophageal cancer cell EC9706 was significantly higher than that in human normal esophageal epithelial cell HEEC ($P<0.05$). Compared with the Control group, the expression level of circ-0058063 in cells, cell survival rate, number of cloned cells, GSH level, ratios of p-ERK1/2/ERK1/2 and p-p38MAPK/p38MAPK, as well as the expression levels of SLC7A11 and GPX4 protein in the si-circ-0058063 group were significantly reduced ($P<0.05$), while the levels of Fe^{2+}, MDA, and ROS in cells were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the si-circ-0058063 group, the expression level of circ-0058063 in cells, cell survival rate, number of cloned cells, GSH level, ratios of p-ERK1/2/ERK1/2 and p-p38MAPK/p38MAPK, as well as the expression levels of SLC7A11 and GPX4 protein in the si-circ-0058063+ISO group were significantly increased ($P<0.05$), while the levels of Fe^{2+}, MDA, and ROS in cells were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Knockdown of circ-0058063 can inhibit the proliferation of esophageal cancer cells and induce ferroptosis, and its mechanism of action may be related to the inhibition of ERK/MAPK signaling pathway activation.

Keywords: circ-0058063; esophageal cancer; ferroptosis; ERK/MAPK signaling pathway

食管癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,据2022年统计显示,我国食管癌新发病例约253 000例,死亡约194 000例,严重威胁患者的生命健康[1]。食管癌早期临床症状不显著,随着肿瘤的生长恶化,患者通常会表现出吞咽困难、胸痛和体质量减轻[2]。由于食管癌侵袭性强、病死率高等特点,仅有少数中晚期患者从手术、放化疗中受益,但术后易转移和复发,导致5年生存率仍低于20%[3]。因此,探究有效治疗食管癌的靶点是目前临床亟需解决的难题。铁死亡是近年来新发现的细胞死亡方式之一,不同于细胞凋亡和坏

[基金项目] 济宁市重点研发计划项目(2022YXNS050)
[通信作者] 谷振芳,E-mail:guzhenfang616@163.com

死,其主要特征为铁依赖的活性氧(reactive oxygen species,ROS)累积和脂质过氧化反应[4]。有研究显示,铁死亡可介导多种肿瘤的发生发展,诱导肿瘤细胞铁死亡可能成为治疗食管癌的关键因素[5]。环状RNA(circular RNA,circRNA)是一类共价闭合的环状结构非编码RNA,具有高度的稳定性和保守性,可调控人类多种疾病,广泛用于肿瘤的诊断和治疗[6]。circ-0058063是一种特定的环状RNA,来源于ATIC基因位点,全长1 640 bp,虽然目前关于circ-0058063的研究尚不丰富,但已有的研究表明,circ-0058063参与了食管癌的进展[7],但其介导食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma,ESCC)的发生机制目前尚不清楚。胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)/促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)在调控细胞过程中起关键作用,ERK磷酸化激活后可从胞质转移到细胞核,从而激活MAPK信号通路调控细胞增殖、分化、凋亡等多种生物学活性[8]。激活ERK/MAPK信号通路可促进结肠癌、甲状腺癌等多种肿瘤的发生发展[9],但其是否是circ-0058063调控ESCC铁死亡的机制目前尚不明确。因此,本研究探究circ-0058063能否通过调控ERK/MAPK信号通路调控食管癌细胞铁死亡,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集2021年6月至2023年6月我院收治的45例食管癌患者的组织标本及其癌旁组织标本,置于-80 ℃超低温冰箱保存。其中男25例,女20例;患者年龄49~62岁,平均(56.1±3.4)岁。纳入标准:经病理组织检查证实为食管癌;术前均未接受过放疗或化疗;临床资料完整。排除标准:伴有其他恶性肿瘤或器质性疾病;不配合本研究。本研究经我院伦理委员会批准(伦理批号:210411),所有患者均知情本研究并签署同意书。

1.2 细胞系

人正常食管上皮细胞HEEC和人食管癌细胞EC9706均购自北京北纳微生物及细胞资源宝藏中心。将HEEC和EC9706细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素的RPMI 1640培养基,置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养,24 h后收集处于对数生长期的细胞进行实验。

1.3 试剂和仪器

胎牛血清(普利莱基因技术有限公司);circ-0058063小干扰RNA(si-circ-0058063)及其阴性对照RNA(si-NC,广州锐博生物科技有限公司);HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(美国Abcam公司);ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK抗体和铁死亡相关蛋白SLC7A11、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)抗体(英国Abcam公司);ERK/MAPK信号通路激活剂异丙肾上腺素(isoprenaline,ISO;美国MCE公司);CCK-8试剂盒(上海连麦生物科技有限公司)。荧光定量PCR仪器(美国ABI公司);倒置荧光显微镜(先纳光学仪器有限公司);酶标仪(深圳思安生物技术有限公司)。

1.4 分组

取对数生长期的EC9706细胞,用不含血清的培养基分别稀释Lipofectamine2000、si-NC和si-circ-0058063,5 min后,将转染物稀释液与转染试剂充分混合均匀,室温孵育20 min;调整EC9706细胞密度为2×10^5/mL,接种于6孔板中,每孔100 μL,将上述混合液按照每孔200 μL加入孔板中,培养48 h后分别设为si-NC组和si-circ-0058063组;将si-circ-0058063组细胞培养于含20 μmol/L ISO的培养基中24 h,设为si-circ-0058063+ISO组;将不转染任何质粒的EC9706细胞设为Control组。

1.5 qRT-PCR检测组织和细胞中circ-0058063表达

在细胞和组织中加入TRIzol裂解液,于冰上裂解成悬液,根据试剂盒说明书提取组织中总RNA,测定浓度后,根据逆转录试剂盒说明书,将总RNA逆转为cDNA,然后进行qRT-PCR扩增。引物序列见表1。分别取0.5 μL正向引物和0.5 μL反向引物,6 μL SYBR Green Mix,2 μL cDNA,然后加入6 μL ddH_2O,保证总反应体系为15 μL。根据PCR反应条件孵育,预变性95 ℃ 60 s;变性95 ℃ 15 s,退火65 ℃ 45 s,延伸72 ℃ 30 s,共35个循环。用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法分析circ-0058063的相对表达量。本研究所用引物参考Sun等[10]研究设计的引物序列。

表1 引物序列

基因		引物序列
circ-0058063	正向	5′-CAGCTCTGATGCCTTCTTCC-3′
	反向	5′-GGAAGCGACCAGATTCAAAC-3′
GAPDH	正向	5′-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3′
	反向	5′-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3′

1.6 CCK-8检测细胞增殖能力

将各组EC9706细胞以每孔1.5×10^4/mL的密度接种于96孔板中,置于37 ℃、5%CO_2的培养箱,分别在培养24 h、48 h、72 h时将CCK-8溶液(100 μL)加入孔板中,继续培养3.5 h后,于酶标仪450 nm处测定酶标仪光密度(optical density,OD)值。

1.7 克隆形成实验检测细胞增殖

将各组EC9706细胞以每孔1.5×10^4/mL的密度接

种于96孔板中，于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养24 h，固定细胞于4%CO_2的多聚甲醛溶液中，在室温中固定10 min，将1%结晶紫加入到细胞中，染色5 min后，将细胞置于显微镜下观察细胞克隆情况，并计算细胞克隆数。

1.8 细胞中Fe^{2+}、谷胱甘肽(glutathione，GSH)、丙二醛(malondialdehyde，MDA)水平检测

将各组EC9706细胞以每孔1×10^6个的密度接种于6孔板中，培养24 h后收集细胞，加入RIPA裂解细胞，根据试剂盒说明书，分别检测细胞裂解液中Fe^{2+}、GSH、MDA水平。

1.9 DCFH-DA探针检测ROS水平

将各组EC9706细胞以每孔1×10^6个的密度接种于6孔板中，孵育1.5 h，PBS洗涤细胞后，加入提前用PBS稀释为10 μmol/L的DCFH-DA，于37 ℃避光环境中孵育，30 min后用PBS再次洗涤细胞，PBS重悬收集细胞，于流式细胞仪检测细胞ROS水平。

1.10 Western blot检测细胞中ERK/MAPK信号通路及铁死亡相关蛋白表达

用BCA法测定细胞中总蛋白浓度。热水煮沸蛋白样品(终浓度为2 μg/mL)10 min，于-20 ℃保存。取蛋白上样50 μg，加入上样缓冲液后煮沸，将变性的蛋白样品用SDS-PAGE分离，后转移蛋白样品于PVDF膜上，加入质量分数为5%的脱脂牛奶封闭，1 h后用TBST溶液清洗PVDF膜，加入一抗ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK、SLC7A11、GPX4(均1∶1 000)，于4 ℃下避光孵育过夜；加入HRP标记的二抗(1∶5 000)，室温孵育2 h。将ECL发光液加入细胞中显影，曝光后拍照，用Image Lab软件分析各蛋白条带。

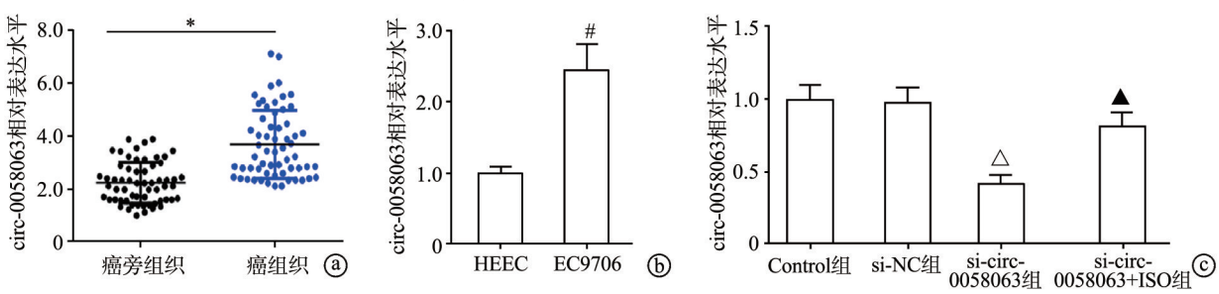
1.11 统计学分析

数据采用Graphpad priam 8.0软件进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。不同组间数据采用重复测量方差和单因素方差(*one-way ANOVA*)分析，各组间两两比较采用*LSD-t*检验，$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织和细胞中circ-0058063表达比较

食管癌组织中circ-0058063表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$)，见图1a。与人正常食管上皮细胞HEEC相比，人食管癌细胞EC9706中circ-0058063表达水平明显较高($P<0.05$)，见图1b。Control组与si-NC组EC9706细胞中circ-0058063表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)；si-circ-0058063组细胞中circ-0058063表达水平明显低于Control组($P<0.05$)；与si-circ-0058063组相比，si-circ-0058063+ISO组细胞中circ-0058063表达水平明显较高($P<0.05$)，见图1c。



a：食管癌组织及癌旁组织中circ-0058063表达；b：人正常食管上皮细胞HEEC和人食管癌细胞EC9706中circ-0058063表达；c：各组EC9706细胞中circ-0058063表达 *：$P<0.05$；#：与HEEC相比，$P<0.05$；△：与Control组相比，$P<0.05$；▲：与si-circ-0058063组相比，$P<0.05$

图1 组织和细胞中circ-0058063表达比较

2.2 各组细胞增殖能力比较

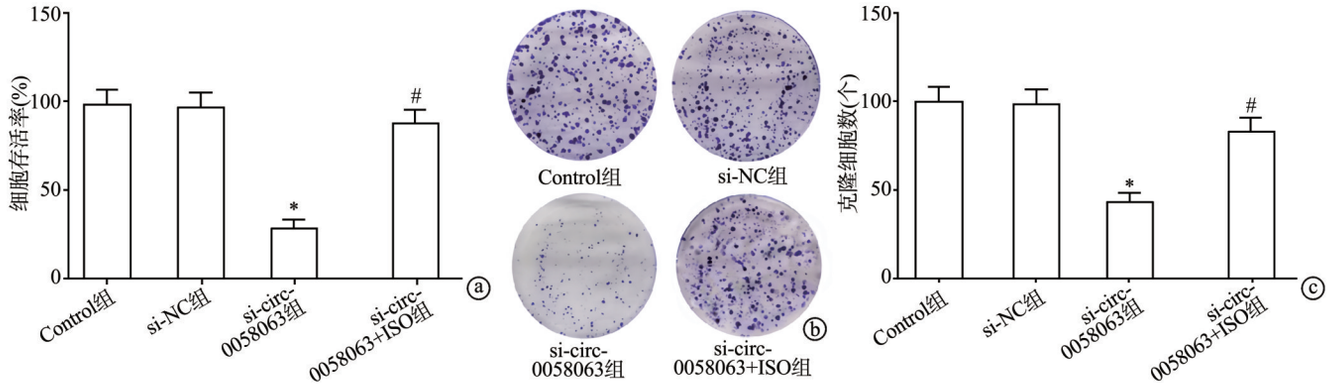
Control组与si-NC组细胞存活率、克隆细胞数比较差异无统计学意义($P>0.05$)；与Control组相比，si-circ-0058063组细胞存活率和克隆细胞数均明显降低/减少($P<0.05$)；与si-circ-0058063组相比，si-circ-0058063+ISO组细胞存活率和克隆细胞数均明显升高/增加($P<0.05$)，见图2。

2.3 各组细胞中Fe^{2+}、GSH、MDA水平比较

Control组与si-NC组细胞中Fe^{2+}、GSH、MDA水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)；si-circ-0058063组细胞中Fe^{2+}、MDA水平均明显高于Control组($P<0.05$)，GSH水平明显低于Control组($P<0.05$)；与si-circ-0058063组相比，si-circ-0058063+ISO组细胞中Fe^{2+}、MDA水平均明显降低($P<0.05$)，GSH水平明显增加($P<0.05$)，见图3。

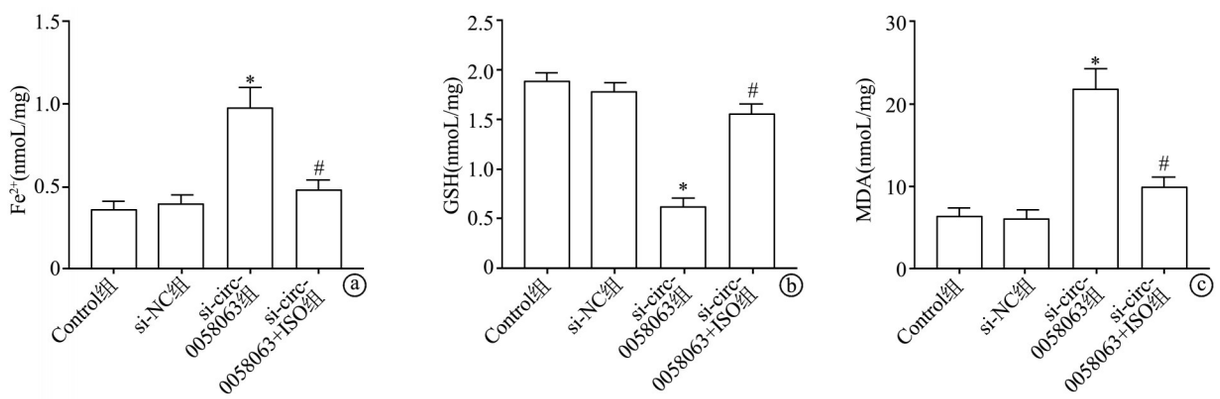
2.4 各组细胞中ROS水平比较

Control组与si-NC组细胞中ROS水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)；si-circ-0058063组细胞中ROS水平明显高于Control组($P<0.05$)；与si-circ-0058063组相比，si-circ-0058063+ISO组细胞中ROS水平明显降低($P<0.05$)，见图4。



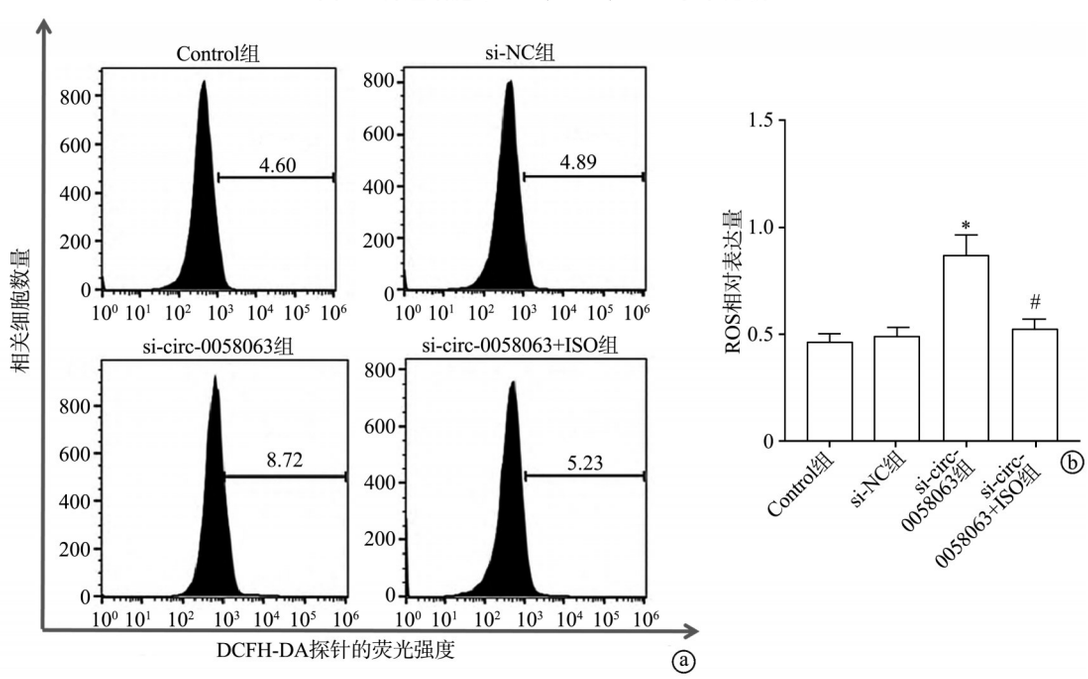
a:细胞存活率;b:克隆实验检测细胞增殖(×200);c:克隆细胞数 *:与 Control 组相比,$P<0.05$;#:与 si-circ-0058063 组相比,$P<0.05$

图2 各组细胞增殖能力比较



a:Fe^{2+}水平;b:GSH 水平;c:MDA 水平 *:与 Control 组相比,$P<0.05$;#:与 si-circ-0058063 组相比,$P<0.05$

图3 各组细胞中 Fe^{2+}、GSH、MDA 水平比较



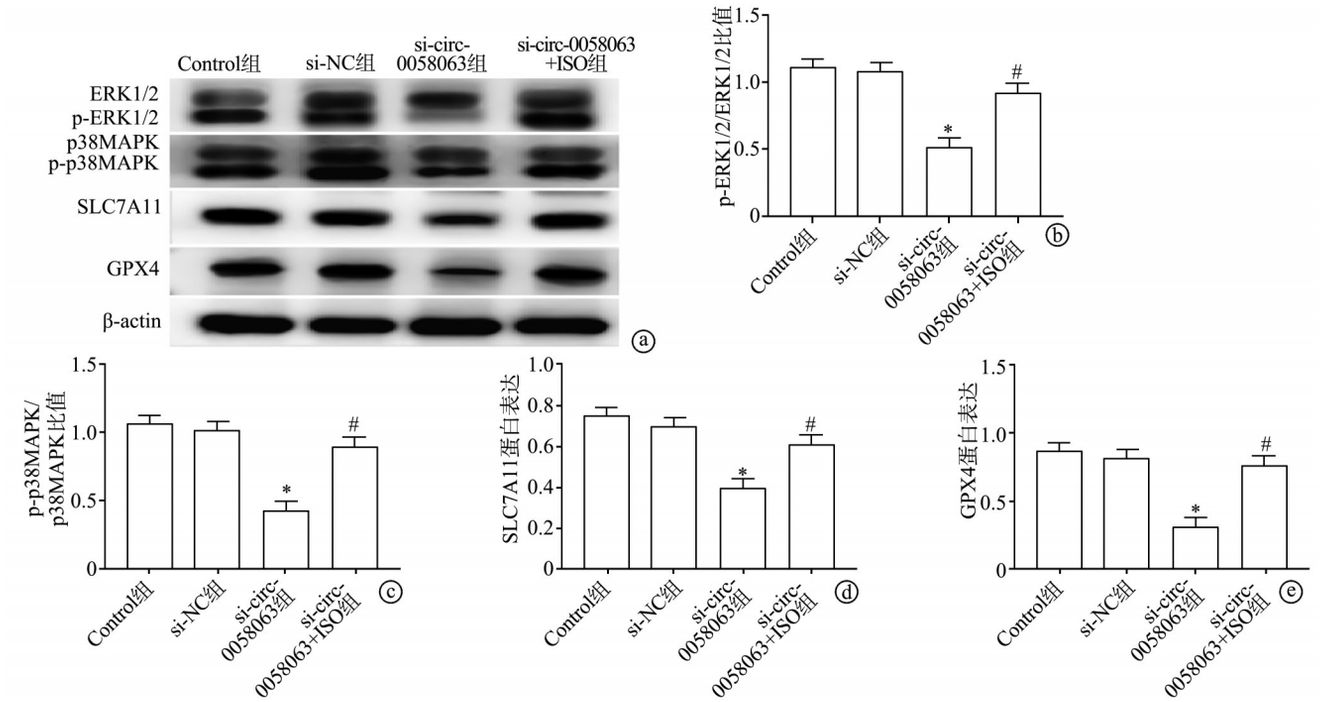
a:ROS 水平;b:ROS 水平定量统计 *:与 Control 组相比,$P<0.05$;#:与 si-circ-0058063 组相比,$P<0.05$

图4 各组细胞中 ROS 水平比较

2.5 各组细胞中 ERK1/2、p-ERK1/2、p38MAPK、p-p38MAPK、SLC7A11、GPX4 蛋白表达比较

Control 组与 si-NC 组细胞中 p-ERK1/2/ERK1/2 比值、p-p38MAPK/p38MAPK 比值和 SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$);si-circ-0058063 组细胞中 p-ERK1/2/ERK1/2 比值、

p-p38MAPK/p38MAPK比值和SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均低于Control组($P<0.05$);与si-circ-0058063组相比,si-circ-0058063+ISO组细胞中p-ERK1/2/ERK1/2比值、p-p38MAPK/p38MAPK比值和SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均明显增加($P<0.05$),见图5。



a:蛋白条带图;b:p-ERK1/2/ERK1/2比值;c:p-p38MAPK/p38MAPK比值;d:SLC7A11蛋白表达水平;e:GPX4蛋白表达水平 *:与Control组相比,$P<0.05$;#:与si-circ-0058063组相比,$P<0.05$

图5 各组细胞中p-ERK1/2/ERK1/2比值、p-p38MAPK/p38MAPK比值和SLC7A11、GPX4蛋白表达水平比较

3 讨论

目前食管癌的治疗方法不断进步,但早期的食管癌无明显症状,多数患者确诊时已为中晚期,且多伴有淋巴结转移,往往错过了最佳的手术时机,由于放化疗耐药等局限性,导致患者5年生存率仅为16%~20%[11]。因此,探究食管癌的发病机制以及治疗食管癌的药物,对延长患者的预后有重要意义。

近年来研究发现,circRNA可介导肿瘤的发生发展,参与基因的转录和调节,因其具有较好的体内稳定性和保守性,有望成为肿瘤发生的潜在标志物[12]。Liu等[13]研究发现,circRNA-141539在ESCC中呈高表达,其可通过海绵化miR-4469作为ESCC的致癌因子。李冬铭等[14]研究证实,食管癌组织中circCCDC66表达明显上调,敲减食管癌中circCCDC66可抑制细胞增殖并发挥促凋亡作用。Xing等[15]研究发现,食管鳞癌组织中circ-Foxo3表达明显低于癌旁组织,过表达circ-Foxo3可有效增加食管鳞癌细胞的放射敏感性。目前,circ-0058063的功能仅在膀胱中被研究,王乾等[16]研究发现,circ-0058063在膀胱癌中表达升高,过表达circ-0058063可通过海绵化miR-338-3p上调COX4表达,抑制细胞增殖和侵袭;Liang等[17]研究证实,敲低circ-0058063可显著抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭,并促进膀胱癌细胞凋亡。因此猜测,circ-0058063可能成为肿瘤的有效治疗靶点。本研究结果显示,食管癌组织和细胞中circ-0058063均呈高表达,敲减circ-0058063表达可抑制食管癌细胞增殖,从而抑制食管癌的发生发展。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式,其是由铁依赖的ROS异常堆积导致的脂质过氧化反应,最终导致细胞死亡[18]。铁死亡的调控涉及多种信号通路,其中最主要为胱氨酸/谷氨酸逆转运体(system xc-)和GPX4调控。system xc-是一个重要的抗氧化系统,主要由SLC7A11和SLC3A2两个亚基组成,其中SLC7A11亚基在转运活性中发挥主要作用。当system xc-系统被破坏时,胱氨酸减少吸收会影响GSH的合成,从而导致GPX4的失活和脂质过氧化物累积,促进铁死亡的发生。脂质过氧化物MDA被定义为铁死亡的标志物之一。张鹏等[19]研究证实,咪达唑仑可增加Fe^{2+}、MDA、ROS水平,抑制GSH、GPX4水平,诱导宫颈癌细胞铁死亡。本研究结果显示,敲减circ-0058063可增

加Fe^{2+}、MDA、ROS水平，抑制GSH水平和SLC7A11、GPX4蛋白表达，提示敲减circ-0058063促进食管癌细胞铁死亡，从而抑制食管癌的发生发展，但其具体作用机制还需进一步探究。

MAPK信号通路参与多种生理病理过程，包括细胞增殖、分化和凋亡。ERK是MAPK的3条主要信号转导通路之一，受上游特异性刺激分子MRK1/2双磷酸化激活，活化后以二聚体形式存在，可通过细胞质转位到细胞核调控系列转录因子，从而导致细胞增殖分化[20]。李险波等[21]研究证实，敲减食管癌细胞中LIMD2表达，可通过抑制ERK/MAPK信号通路促进细胞凋亡。本研究结果显示，敲减circ-0058063可降低食管癌细胞中p-ERK1/2/ERK1/2和p-p38MAPK/p38MAPK比值，因此推测，敲减circ-0058063可能通过抑制ERK/MAPK信号通路激活诱导食管癌细胞铁死亡，从而抑制食管癌的发生发展。为了验证这一猜想，本研究采用ERK/MAPK信号通路激活剂ISO联合si-circ-0058063共同干预食管癌细胞，结果显示，ISO可减弱敲减circ-0058063对食管癌细胞铁死亡的促进作用以及对食管癌细胞增殖的抑制作用。由此可见，敲减circ-0058063可能通过抑制ERK/MAPK信号通路抑制食管癌细胞增殖。

综上所述，敲减circ-0058063可抑制食管癌细胞增殖，诱导食管癌细胞铁死亡，其作用机制可能与抑制ERK/MAPK信号通路激活有关。

[参考文献]

[1] Dobashi A, Li DK, Mavrogenis G, et al. Endoscopic management of esophageal cancer[J]. Thorac Surg Clin, 2022, 32(4): 479-495. doi: 10.1016/j.thorsurg.2022.07.005.

[2] Ren Q, Zhang P, Zhang X, et al. A fibroblast-associated signature predicts prognosis and immunotherapy in esophageal squamous cell cancer[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1199040. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199040.

[3] Xi Y, Shen Y, Wu D, et al. CircBCAR3 accelerates esophageal cancer tumorigenesis and metastasis via sponging miR-27a-3p [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 145. doi: 10.1186/s12943-022-01615-8.

[4] Kim R, Taylor D, Vonderheide RH, et al. Ferroptosis of immune cells in the tumor microenvironment[J]. Trends Pharmacol Sci, 2023, 44(8): 542-552. doi: 10.1016/j.tips.2023.06.005.

[5] Li J, Liu J, Zhou Z, et al. Tumor-specific GPX4 degradation enhances ferroptosis-initiated antitumor immune response in mouse models of pancreatic cancer[J]. Sci Transl Med, 2023, 15(720): eadg3049. doi: 10.1126/scitranslmed.adg3049.

[6] Chen S, Li K, Guo J, et al. circNEIL3 inhibits tumor metastasis through recruiting the E3 ubiquitin ligase Nedd4L to degrade YBX1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(13): e2215132120. doi: 10.1073/pnas.2215132120.

[7] Yang Y, Zhu B, Ning Z, et al. Circ_0058063 regulates cell vitality and proliferation in oesophageal squamous-cell carcinomas[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023, 37(11): e23470. doi: 10.1002/jbt.23470.

[8] Si H, Zhang N, Shi C, et al. Tumor-suppressive miR-29c binds to MAPK1 inhibiting the ERK/MAPK pathway in pancreatic cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2023, 25(3): 803-816. doi: 10.1007/s12094-022-02991-9.

[9] Meng XY, Zhang HZ, Ren YY, et al. Pinin promotes tumor progression via activating CREB through PI3K/AKT and ERK/MAPK pathway in prostate cancer[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(4): 1286-1303. doi: 10.21203/rs.3.rs-40235/v1.

[10] Sun M, Liu X, Zhao W, et al. Circ_0058063 contributes to cisplatin-resistance of bladder cancer cells by upregulating B2M through acting as RNA sponges for miR-335-5p[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 313. doi: 10.1186/s12885-022-09419-1.

[11] Yin LB, Li ZW, Wang JL, et al. Sulfasalazine inhibits esophageal cancer cell proliferation by mediating ferroptosis[J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 102(4): 730-737. doi: 10.1111/cbdd.14281.

[12] Hu T, Peng H, Yang F, et al. Circ_0024108 promotes the progression of esophageal cancer cells[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2023, 71(7): 418-431. doi: 10.1007/s11748-023-01909-8.

[13] Liu ZH, Yang SZ, Li WY, et al. circRNA_141539 can serve as an oncogenic factor in esophageal squamous cell carcinoma by sponging miR-4469 and activating CDK3 gene[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(8): 12179-12193. doi: 10.18632/aging.103071.

[14] 李冬铭，向可敏，魏云佳. 沉默circCCDC66靶向miR-129-5p对食管癌细胞Eca-109增殖及凋亡的影响[J]. 中国细胞生物学学报，2023，45(9)：1331-1340. doi：10.11844/cjcb.2023.09.0005.

[15] Xing Y, Zha WJ, Li XM, et al. Circular RNA circ-Foxo3 inhibits esophageal squamous cell cancer progression via the miR-23a/PTEN axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(3): 2595-2605. doi: 10.1002/jcb.29481.

[16] 王 乾，沈 伟，孙 宾，等. Circ_0058063通过miR-338-3p靶向SOX4调控膀胱癌细胞增殖，迁移和侵袭的机制研究[J]. 现代肿瘤医学，2023，31(21)：3939-3945. doi：10.3969/j.issn.1672-4992.2023.21.007.

[17] Liang H, Huang H, Li Y, et al. CircRNA_0058063 functions as a ceRNA in bladder cancer progression via targeting miR-486-3p/FOXP4 axis[J]. Biosci Rep, 2020, 40(3): BSR20193484. doi: 10.1042/BSR20193484.

[18] Wang Z, Wu S, Zhu C, et al. The role of ferroptosis in esophageal cancer[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 266. doi: 10.1186/s12935-022-02685-w.

[19] 张 鹏，葛 亮，孔令国，等. 咪达唑仑通过调节Nrf2/HO-1信号通路对宫颈癌细胞铁死亡的作用及机制研究[J]. 实用医学杂志，2023，39(14)：1740-1745. doi：10.3969/j.issn.1006-5725.2023.14.003.

[20] Zhang BX, Yu T, Yu Z, et al. MicroRNA-148a regulates the MAPK/ERK signaling pathway and suppresses the development of esophagus squamous cell carcinoma via targeting MAP3K9[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(15): 6497-6504. doi: 10.26355/eurrev_201908_18533.

[21] 李险波，张志强，韩小勇，等. LIMD2基因表达对食管癌细胞增殖、凋亡及ERK/MAPK信号通路的影响[J]. 局解手术学杂志，2022，31(8)：669-675. doi：10.11659/jjssx.12E021138.

(编辑：贺绍梅)