

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2025. 12. 023

结直肠癌细胞来源外泌体 miR-21 对其细胞转移和侵袭的作用及机制*

马利辉¹,魏芳芳¹,王楠¹,霍浩然²,魏琦³,张蕾²

1. 河北省邯郸市中心医院急诊外一科,河北邯郸 056001;2. 河北省邯郸市中心医院普外科,河北邯郸 056001;3. 河北省邯郸市人民医院普外科,河北邯郸 056000

摘要:目的 探讨结直肠癌(CRC)细胞来源外泌体 miR-21 对 CRC 细胞转移和侵袭的作用及机制。方法 采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 miR-21 在人 CRC 细胞系 HCT116 和人正常结肠上皮细胞系 NCM460 中的表达差异,以及在 2 种细胞来源外泌体内的表达差异。通过小干扰 RNA 转染的方法构建 miR-21 敲低的 HCT116 细胞株。采用共培养试验检测 HCT116 细胞对荧光标记外泌体的摄取。采用伤口愈合试验检测摄取外泌体后 HCT116 细胞迁移能力变化。采用 Transwell 试验检测摄取外泌体后 HCT116 细胞侵袭能力变化。采用 Western blot 试验检测摄取外泌体后 HCT116 细胞内缺口同源物 1(Notch1)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和磷酸化 mTOR(p-mTOR)蛋白水平。采用 qRT-PCR 检测 Notch1 转录信使水平。结果 HCT116 细胞及其外泌体内 miR-21 水平均明显高于 NCM460 细胞及其外泌体,差异均有统计学意义($P<0.05$)。共聚焦显微镜观察结果显示,HCT116 细胞成功摄取了其他 HCT116 细胞来源外泌体。伤口愈合试验结果显示,摄取 miR-21 敲低的外泌体后 HCT116 细胞迁移能力受到抑制($P<0.05$)。Transwell 试验结果显示,摄取 miR-21 敲低的外泌体后 HCT116 细胞侵袭能力明显减弱($P<0.05$)。Western blot 试验结果显示,摄取了 miR-21 敲低外泌体的 HCT116 细胞内 Notch1 mRNA、PI3K、Akt、mTOR 蛋白水平与摄取了 miR-21 敲低对照外泌体的细胞比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);但摄取了 miR-21 敲低外泌体的 HCT116 细胞内 Notch1、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR 蛋白水平与摄取了 miR-21 敲低对照外泌体细胞比较明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 CRC 细胞来源外泌体 miR-21 通过靶向 Notch1/PI3K/Akt/mTOR 通路可促进肿瘤转移和侵袭。

关键词:结直肠癌; 外泌体; miR-21; 缺口同源物 1; 细胞转移; 细胞侵袭

中图法分类号:R735.3;R446.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2025)12-1702-05

Effect and mechanism of colorectal cancer cell-derived exosomal miR-21 on metastasis and invasion of colorectal cancer cells*

MA Lihui¹,WEI Fangfang¹,WANG Nan¹,HUO Haoran²,WEI Qi³,ZHANG Lei²

1. Department of Emergency Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China;
2. Department of General Surgery, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China;
3. Department of General Surgery, Handan People's Hospital, Handan, Hebei 056000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of colorectal cancer (CRC) cell-derived exosomal miR-21 on the metastasis and invasion of CRC cells. **Methods** Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-21 in human CRC cell line HCT116 and human normal colonic epithelial cell line NCM460, as well as the expression of Mir-21 in exosomes derived from the two cell lines. HCT116 cell line with knockdown of miR-21 was constructed by small interfering RNA transfection. Co-culture assay was used to detect the uptake of fluorescently labeled exosomes by HCT116 cells. Wound healing assay was used to detect the migration ability of HCT116 cells after exosome ingestion. Transwell assay was used to detect the changes in the invasion ability of HCT116 cells after exosome uptake. Western blot was used to detect the protein levels of nick homolog 1 (Notch1), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B(Akt), phosphorylated Akt (p-Akt), mammals rapamycin target protein (mTOR) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in HCT116 cells after exosome uptake, and qRT-PCR was used to detect the mrna level of Notch1. **Results** The level of miR-21 in HCT116 cells and their exosomes was significantly higher than that in NCM460 cells and their exo-

* 基金项目:河北省医学科学研究课题计划(20220035);河北省邯郸市科学技术研究与发展计划(23422083207)。
作者简介:马利辉,女,副主任医师,主要从事直肠癌方面的研究。

somes, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Confocal microscopy showed that HCT116 cells successfully ingested other HCT116 cell-derived exosomes. The results of wound healing assay showed that the migration ability of HCT116 cells was inhibited after the uptake of exosomes with knockdown of miR-21 ($P < 0.05$). Transwell assay showed that the invasion ability of HCT116 cells was significantly decreased after the uptake of exosomes with knockdown of miR-21 ($P < 0.05$). Western blot results showed that there was no significant difference in Notch1 mRNA, PI3K, AKT and mTOR protein levels between HCT116 cells that ingested exosomes from miR-21 knockdown and those that ingested exosomes from control miR-21 knockdown ($P > 0.05$). However, the levels of Notch1, p-PI3K, p-Akt and p-mTOR proteins in HCT116 cells that ingested exosomes from miR-21 knockdown were significantly lower than those in HCT116 cells that ingested exosomes from control miR-21 knockdown ($P < 0.05$). **Conclusion** CRC cell-derived exosomal miR-21 promotes tumor metastasis and invasion by targeting the Notch1/PI3K/AKT/mTOR pathway.

Key words: colorectal cancer; exosome; miR-21; notch homolog 1; cell transfer; cell invasion

结直肠癌 (CRC) 已被确定为第三大常见恶性肿瘤, 据统计, 在 2020 年约有 190 万人被诊断为 CRC。预计在未来几年, 由于人口增长和人口老龄化加速, CRC 的发病率和病死率将进一步大幅增加^[1], 这种癌症会影响人类的结肠和直肠。实际上, 在大多数情况下, CRC 会从结肠发展到直肠。大多数 CRC 的发生是由于衰老和生活方式因素, 例如肥胖、饮食、缺乏体育锻炼和吸烟等。由于超重和肥胖等主要危险因素流行趋势不利, 年轻一代 CRC 发病率不断上升^[2]。另一方面, 有研究表明, 通过以人群为基础的筛查措施, 包括内窥镜和粪便检查筛查, 可以预防大部分 CRC 进展^[3]。外泌体是一类直径为 100~200 nm 的小囊泡, 几乎所有细胞都可以释放外泌体。外泌体内包含多种生物活性分子, 如 DNA、RNA、微小 RNA (miR) 和蛋白质等^[4]。细胞通过释放外泌体及其载运物质进行细胞-细胞间信息传递和物质交换。miR 是一类非编码 RNA, 通过作用于信使 RNA (mRNA) 或靶基因发挥作用。外泌体 miR 与肿瘤的发生和发展有密切联系^[5]。有研究表明, 外泌体 miR 对 CRC 耐药性的产生有明显贡献^[6]。最近有研究表明, miR-21 在原发性 CRC 肿瘤血清中呈高表达, 在肝转移 CRC 肿瘤血清中表达降低^[7]。因此, 作者猜测 miR-21 可能参与 CRC 转移的发生但不参与转移后的生长。为探讨 miR-21 在 CRC 转移发生过程中的作用, 本研究重点研究了 CRC 细胞来源外泌体 miR-21 促进 CRC 细胞转移和侵袭的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系和培养 人 CRC 细胞系 HCT116 和人正常结肠上皮细胞系 NCM460 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 以添加了 15% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素混合液的 RPMI-1640 完全培养基培养。除非特别说明, 细胞每隔 2 d 进行一次培养基更换。

1.2 外泌体分离和鉴定 HCT116 细胞培养 48 h 后, 收集细胞上清液, 以离心力 300 g 离心 10 min, 2 000 g 离心 20 min, 10 000 g 离心 30 min 的顺序进行离心。之后上清液用 0.22 μm 过滤器过滤, 以离心力 100 000 g 离心 90 min, 1 100 000 g 离心 90 min,

最后得到的沉淀用磷酸盐缓冲液重悬。使用 Hitachi H7605 透射电子显微镜观察外泌体。通过纳米颗粒跟踪仪 (NTA) 检测外泌体的直径和丰度。采用 Western blot 试验对外泌体特异性标志物进行鉴定。

1.3 miR-21 表达敲低 将 HCT116 细胞接种到 6 孔板中, 培养至 70% 的汇合度, 然后根据制造商的说明书, 使用 Lipofectamine 3000 转染试剂盒瞬时转染靶向 miR-21 表达敲低的小干扰 RNA (siRNA)。首先分离和鉴定 HCT116 细胞、NCM460 细胞及其来源外泌体 (HCT116-exo、NCM460-exo)。转染 48 h 后, 收集细胞并用于后续试验。miR-21 的 siRNA 序列为 5'-CAG UACUUUUGUGUAGUACAA-3'。

1.4 外泌体标记和共培养 通过 siRNA 转染获得了 miR-21 敲低的 HCT116 细胞, 并将 HCT116-exo 分为 miR-21 敲低对照 (simiR-21-NC-exo-HCT116)、miR-21 敲低 (simiR-21-exo-HCT116)。收集到的外泌体通过绿色荧光标记染料 (PKH67) 进行标记。将染色的外泌体与 HCT116 共同培养于 24 孔 Transwell 板中。细胞培养于上室, 下室内加入含外泌体的完全培养基。24 h 后在共聚焦显微镜下观察细胞对外泌体的摄取情况。

1.5 伤口愈合试验 将细胞接种于 6 孔板内, 汇合度达到 60% 时, 用 10 μL 枪头对细胞进行划痕制造“伤口”, 并以无血清培养基继续培养。48 h 后在显微镜下观察“伤口”的面积变化。

1.6 Transwell 试验 使用覆盖有 Matrigel 胶的 24 孔 Transwell 板检测 HCT116 细胞的侵袭能力。向 Transwell 板上室内加入含 1 000 个细胞的无血清培养基, 向下室内加入 700 μL 完全培养基。48 h 后对细胞进行固定和染色, 在显微镜下观察和统计穿过 Matrigel 胶的细胞数量。

1.7 Western blot 试验 细胞和外泌体在含有蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀测定 (RIPA) 裂解缓冲液中裂解, 并使用双缩脲素法 (BCA) 蛋白检测试剂盒进行定量检测。随后对 30 μg 的变性蛋白样品 (每个样品) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 并转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下, 用 5% 的脱脂牛奶封闭聚偏二氟乙烯

膜 2 h, 并与与以下一抗在 4 ℃ 下孵育过夜。然后在室温下将聚偏二氟乙烯膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。最后, 用增强型化学发光液对膜进行曝光显影。一抗: β -微管蛋白(β -tubulin)、分化簇 3(CD63)、CD81、热休克蛋白 70(HSP70)、缺口同源物 1(Notch1)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)。二抗购自美国 Proteintech 公司, 用 1×TBST 稀释 5 000 倍使用。

1.8 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(qRT-PCR) 采用 miRNeasy 试剂盒从细胞样品和外泌体样品中分离总 RNA, 然后用 SuperScript III 反转录酶反转录合成 cDNA。在 CFX96TouchTM 序列检测系统上进行 qRT-PCR, 使用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒对 cDNA 进行扩增。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为标准化对照, GAPDH 正向: 5'-AA-ATCCCATCACCATCTTCC-3', 反向: 5'-TCACAC-CCA-TGACGAACA-3'; miR-21 正向: 5'-TGGATT-TTTGGAT-3', 反向: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; Notch1 正向: 5'-AATGGCCCTTTGATCT-3', 反向: 5'-CCGAAACCGTAAAGTC-3'。

1.9 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 miR-21 在 CRC 细胞来源外泌体内的水平比较 透射电子显微镜观察到 HCT116-exo、NCM460-exo 均呈杯状结构; NTA 检测 HCT116-exo、NCM460-exo 丰度和直径结果显示, HCT116-exo 丰度更高, 二者直径均集中在 100 nm; Western blot 试验验证了外泌体标志物的表达。qRT-PCR 检测结果显示, HCT116 细胞和 HCT116-exo 内的 miR-21 水平为 1.773 ± 0.035 、 1.063 ± 0.045 , 均明显高于 NCM460 细胞和 NCM460-exo 内的 1.360 ± 0.061 、 0.790 ± 0.026 , 差异均有统计学意义($t = 10.190$ 、 9.055 , $P = 0.000\ 5$ 、 $0.000\ 8$)。

2.2 CRC 细胞能够摄取其他 CRC 细胞来源外泌体 miR-21 simiR-21-NC-exo-HCT116 细胞的 miR-21 水平为 0.830 ± 0.056 , simiR-21-exo-HCT116 细胞的 miR-21 水平为 0.380 ± 0.056 , 差异有统计学意义($t = 9.899$, $P = 0.000\ 6$)。用 PKH67 对 simiR-21-exo-HCT116 细胞和 simiR-21-NC-exo-HCT116 细胞进行标记, 并分别与未经任何处理的 HCT116 细胞进行共培养, 细胞核以 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶蓝色染料标记, 共聚焦显微镜下观察外泌体和细胞核的相对位置, 证实了上述标记的外泌体被 HCT116 细胞成功摄取, 见图 1。

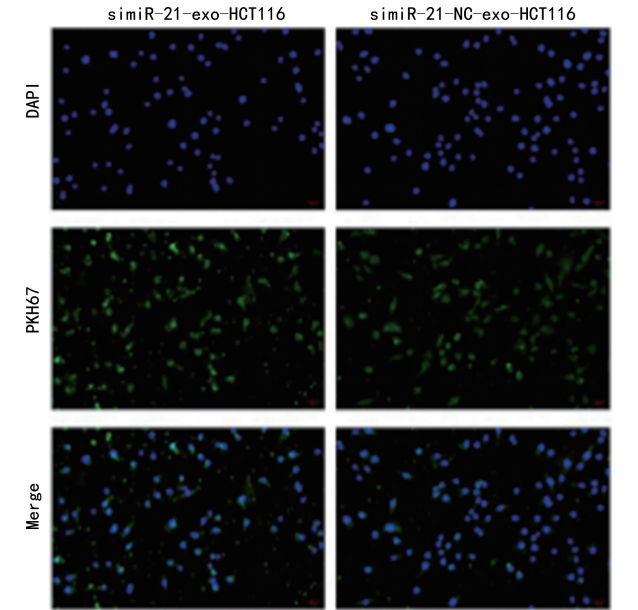
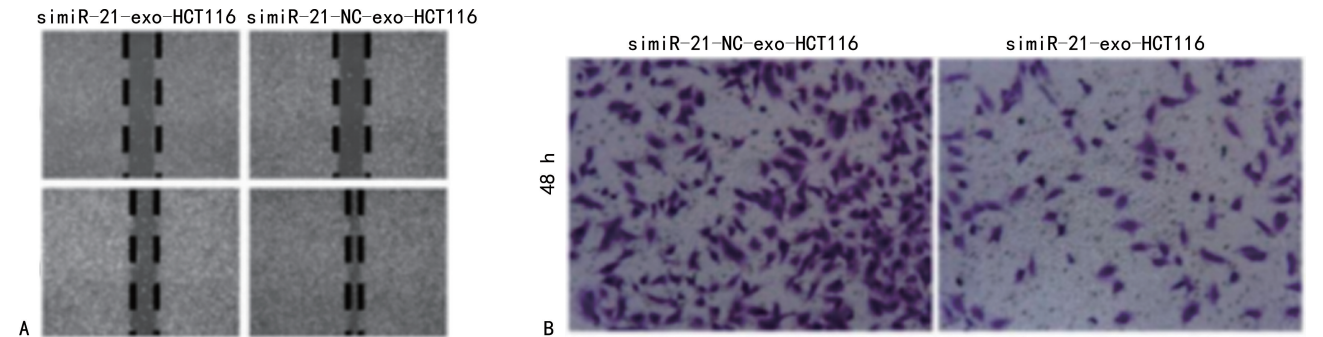


图 1 外泌体 miR-21 表达敲低和共培养(200×)

2.3 外泌体 miR-21 敲低后靶标 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力 48 h 伤口愈合试验结果显示, 由于摄取的外泌体内缺乏 miR-21, simiR-21-exo-HCT116 的伤口愈合面积比为 $(51.333 \pm 3.512)\%$, 明显低于 simiR-21-NC-exo-HCT116 的 $(82.667 \pm 3.055)\%$, 差异有统计学意义($t = 11.660$, $P = 0.000\ 3$); Transwell 试验结果显示, 相同原因导致 simiR-21-exo-HCT116 的侵袭细胞数量为 (45.333 ± 4.509) 个, 明显低于 simiR-21-NC-exo-HCT116 的 (82.667 ± 6.028) 个, 差异有统计学意义($t = 8.590$, $P = 0.001\ 0$)。见图 2。



注: A 为采用伤口愈合试验检测 HCT116 细胞的迁移能力; B 为采用 Transwell 试验检测 HCT116 细胞的侵袭能力(200×)。

图 2 外泌体 miR-21 敲低后靶标 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力

2.4 外泌体 miR-21 靶向作用于 HCT116 细胞内 Notch1/PI3K/Akt/mTOR 通路 Western blot 试验结果显示,与 simiR-21-NC-exo-HCT116 细胞比较, simiR-21-exo-HCT116 细胞内 Notch1、p-PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白水平均明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$),而 Notch1 mRNA、PI3K、Akt、mTOR 蛋白水平均无明显差异。见图 3。

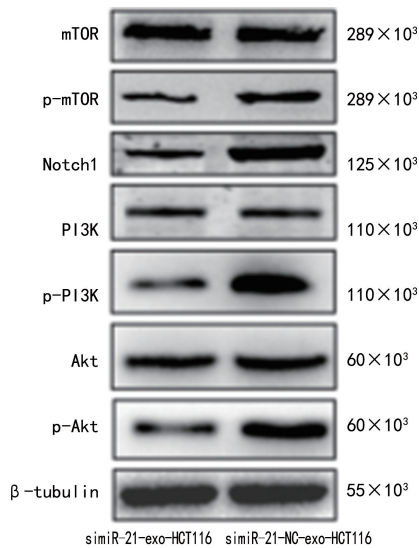


图 3 外泌体 miR-21 靶向作用于 HCT116 细胞内 Notch1/PI3K/Akt/mTOR 通路

3 讨论

CRC 是目前最主要的恶性肿瘤之一,其全球总体发病率和病死率逐步升高,给人们造成了极大的经济负担^[8]。中国、欧洲和北美等国家占全球 CRC 新病例和相关死亡人数的一半以上。最近,一些欧洲和北美国家 CRC 发病率和病死率有所下降;相反,中国的 CRC 发病率和病死率却持续上升。中国、欧洲和北美等国家 CRC 的总体 5 年相对生存率相似,但欧洲国家之间存在相当大的异质性。实施以人群为基础的 CRC 筛查计划可以有效应对日益加重的疾病负担^[9]。

肿瘤细胞分泌的外泌体至少比正常细胞多 10 倍,这类外泌体可以通过运输生长因子、趋化因子、miRNA 和其他小分子促进肿瘤细胞间或肿瘤细胞与其他类型细胞间信息传递了物质交换^[10]。有研究表明,不同细胞来源的外泌体含有独特的 miRNA 表达谱,也可能与其亲本细胞的特征不同^[11]。肿瘤环境中的免疫细胞、间充质细胞和癌细胞均可释放携带 miRNA 的外泌体,进入受体细胞并调节其功能^[12],这些外泌体内 miRNA 分子在癌症中发挥重要作用,既可能是肿瘤抑制因子,也可能是调节细胞增殖和迁移、上皮-间质转化、血管生成和肿瘤转移的促进因子。此外,外泌体 miRNA 还可以影响肿瘤微环境形成,包括细胞外基质的形成及免疫系统的激活/抑制^[13-15]。有研究证实,外泌体 miRNA 与 CRC 进展相关,涉及肿瘤细胞增殖、转移、化疗耐药和上皮-间质转化等多

方面^[16-17]。miR-21 在多种肿瘤的进展、诊断和预后中显示出重要作用^[18-19]。在 CRC 中,miR-21 的表达上调会促进 Wnt 信号通路激活,从而促进其靶基因细胞周期蛋白 D1 和 c-骨髓细胞瘤癌基因蛋白表达^[20]。抑制 miR-21 表达能够诱导 CRC 细胞凋亡增加^[21]。最近 1 项研究表明,携带 miR-21 抑制剂和化疗药物的工程外泌体通过靶向进入 CRC 细胞,抑制 miR-21 表达以逆转 CRC 的化疗耐药性^[22],由此表明,靶向抑制 miR-21 的表达是抗肿瘤治疗的有效策略。

Notch 信号通路在进化上高度保守,已被证明参与许多细胞的生物学活动。Notch 受体 1~4 及其配体属于跨膜蛋白,含有表皮生长因子样重复序列,通常需要受体-配体相互作用才能启动经典的 Notch 信号转导。有研究表明,Notch 信号通路在各种类型癌症中既可以充当致癌因子,也可以成为肿瘤抑制因子^[23]。过往的研究在不同亚型的 CRC 和转移性 CRC 肿瘤中观察到 Notch 信号通路的过度激活^[24-25],比如,肠上皮细胞 Notch 信号的激活可以促进 CRC 转移,特别是肝转移,并且可能诱发预后不良亚型 CRC 发生^[26]。

PI3K/Akt/mTOR 通路可以作为 Notch 信号的反向,在多种疾病的发病机制中发挥重要作用。Notch 信号可以通过多种方式控制 PI3K/Akt/mTOR 通路,并且 Notch 信号与 PI3K/Akt/mTORC1 通路之间的串扰已在多种类型的癌症中被揭示^[27]。本研究结果显示,CRC 细胞通过释放携带 miR-21 的外泌体被其他 CRC 细胞摄取吸收,miR-21 进入细胞内靶向作用于 Notch1 mRNA 翻译过程以调控 Notch1 蛋白水平,进一步激活 Notch1 反向 PI3K/Akt/mTOR 通路磷酸化,最终促进 CRC 转移和侵袭。未来的研究需要进一步明确 miR-21 对 Notch1 mRNA 靶向作用的具体分子机制。

综上所述,本研究结果为外泌体 miR-21 递送相关 CRC 转移机制提供了新的证据,可能为临床治疗转移性 CRC 提供新思路。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] HEISSER T, HOFFMEISTER M, TILLMANN H, et al. Impact of demographic changes and screening colonoscopy on long-term projection of incident colorectal cancer cases in germany: a modelling study[J]. Lancet Reg Health Eur, 2022, 20: 100451.
- [3] SHAUKAT A, LEVIN T R. Current and future colorectal cancer screening strategies[J]. Nat Rev Gastroenterol

Hepatol, 2022, 19(8):521-531.

[4] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. Science, 2020, 367(6478):eaau6977.

[5] SUN Z Q, SHI K, YANG S X, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1):147.

[6] MALEKI M, GOLCHIN A, JAVADI S, et al. Role of exosomal miRNA in chemotherapy resistance of Colorectal cancer: a systematic review[J]. Chem Biol Drug Des, 2023, 101(5):1096-1112.

[7] FEIERSINGER F, NOLTE E, WACH S, et al. MiRNA-21 expression decreases from primary tumors to liver metastases in colorectal carcinoma[J]. PLoS One, 2016, 11(2):e0148580.

[8] QU R Z, MA Y P, ZHANG Z P, et al. Increasing burden of colorectal cancer in China[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7(8):700.

[9] LI N, LU B, LUO C Y, et al. Incidence, mortality, survival, risk factor and screening of colorectal cancer: a comparison among China, europe, and northern America[J]. Cancer Lett, 2021, 522:255-268.

[10] MAO L, LI X, GONG S, et al. Serum exosomes contain ECRG4 mRNA that suppresses tumor growth via inhibition of genes involved in inflammation, cell proliferation, and angiogenesis[J]. Cancer Gene Ther, 2018, 25(9):248-259.

[11] CHAPUT N, THÉRY C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations[J]. Semin Immunopathol, 2011, 33(5):419-440.

[12] YANG F M, NING Z Q, MA L, et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):148.

[13] XU Z J, CHEN Y, MA L, et al. Role of exosomal non-coding RNAs from tumor cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment[J]. Mol Ther, 2022, 30(10):3133-3154.

[14] CARIELLO M, SQUILLA A, PIACENTE M, et al. Drug resistance: the role of exosomal mirna in the microenvironment of hematopoietic tumors[J]. Molecules, 2022, 28(1):116.

[15] YANG C G, DOU R Z, WEI C, et al. Tumor-derived exosomal microRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis[J]. Mol Ther, 2021, 29(6):2088-2107.

[16] MA J, WANG P L, HUANG L, et al. Bioinformatic analysis reveals an exosomal miRNA-mRNA network in colorectal cancer[J]. BMC Med Genomics, 2021, 14(1):60.

[17] AKHTARKHAVARI T, BAHRAMI A R, MATIN M M. Downregulation of miR-21 as a promising strategy to overcome drug resistance in cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 932:175233.

[18] FARASATI FAR B, VAKILI K, FATHI M, et al. The role of microRNA-21 (miR-21) in pathogenesis, diagnosis, and prognosis of gastrointestinal cancers: a review[J]. Life Sci, 2023, 316:121340.

[19] YU Y J, KANWAR S S, PATEL B B, et al. MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGFβR2) in colon cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(1):68-76.

[20] XIONG B H, CHENG Y, MA L, et al. MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 42(1):219-228.

[21] LIANG G F, ZHU Y L, ALI D J, et al. Engineered exosomes for targeted co-delivery of miR-21 inhibitor and chemotherapeutics to reverse drug resistance in colon cancer[J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1):10.

[22] SHI Q M, XUE C, ZENG Y F, et al. Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1):128.

[23] NOAH T K, SHROYER N F. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis[J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75:263-288.

[24] IRSHAD S, BANSAL M, GUARNIERI P, et al. Bone morphogenetic protein and Notch signalling crosstalk in poor-prognosis, mesenchymal-subtype colorectal cancer[J]. J Pathol, 2017, 242(2):178-192.

[25] JACKSTADT R, VAN H S, LEACH J D, et al. Epithelial NOTCH signaling rewires the tumor microenvironment of colorectal cancer to drive poor-prognosis subtypes and metastasis[J]. Cancer Cell, 2019, 36(3):319-336.

[26] PENG X C, ZHOU J R, LI B, et al. Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers DAPT and LY294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85(2):309-320.

[27] CZERWONKA A, KAŁAFUT J, NEES M. Modulation of notch signaling by small-molecular compounds and its potential in anticancer studies[J]. Cancers (Basel), 2023, 15(18):4563.