中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目： microRNA 通过调控 Nrf2 相关信号通路介导脑缺血再灌注损伤的研究进展
作者： 毕经壮，于进南，娄超，高琨，张坤，石瑞丽
收稿日期： 2026-03-01
网络首发日期： 2026-09-17
引用格式： 毕经壮，于进南，娄超，高琨，张坤，石瑞丽．microRNA 通过调控 Nrf2 相关信号通路介导脑缺血再灌注损伤的研究进展[J/OL]．中国比较医学杂志．https://link.cnki.net/urlid/11.4822.r.20260917.1115.002

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

microRNA 通过调控 Nrf2 相关信号通路介导脑缺血再灌注损伤的研究进展

毕经壮[1]，于进南[1]，娄 超[1]，高 琨[2]，张 坤[1]✉，石瑞丽[1]✉

（1.内蒙古科技大学包头医学院基础医学与法医学院，内蒙古 包头 014000；2.包头医学院第一附属医院，内蒙古 包头 014000）
*通信作者 张坤，女，博士，教授，硕士生导师，研究方向：病理生理学，E-mail：996222752@qq.com 石瑞丽，女，博士，教授，博士生导师，研究方向：生理学，E-mail：ruilishi@sina.com *共同通信作者

摘要 脑缺血再灌注（CIR）损伤是指脑组织在血流中断（缺血）后恢复血液供应（再灌注）时，反而引发更严重的组织损伤的现象，其核心病理特征为氧化应激、炎症反应及细胞凋亡的级联放大，严重影响患者神经功能恢复。Nrf2 相关信号通路在抑制 CIR 损伤过程中发挥着的重要作用，microRNA 能够以直接结合 Nrf2 或间接介导上游调控因子表达的方式调控 Nrf2 相关信号通路的活性。上调 Nrf2 的表达活性或调节相关 microRNA 水平对 CIR 损伤具有保护作用。本文将系统综述近年来 microRNA 调控 Nrf2 信号通路在 CIR 损伤中的研究进展，重点梳理直接与间接调控模式及其病理意义，旨在为脑缺血再灌注损伤的精准防治提供新的研究方向与潜在干预靶点。

关键词 脑缺血再灌注；microRNA；Nrf2
中图分类号 R743.31；R363；Q7 文献标志码 A

Research progress on microRNAs that mediate cerebral ischemia–reperfusion injury by regulating the Nrf2-related signaling pathway

BI Jingzhuang[1], YU Jinnan[1], LOU Chao[1], GAO Kun[2], ZHANG Kun[1]✉, SHI Ruili[1]✉

(1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014000, China. 2. the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014000)

Abstract Cerebral ischemia–reperfusion (CIR) injury refers to the phenomenon in which restoration of blood supply (reperfusion) after interruption of cerebral blood flow (ischemia) paradoxically aggravates tissue damage. Its core pathological features include the cascade amplification of oxidative stress, inflammatory responses, and apoptosis, which severely impair neurological functional recovery. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway plays an important role in protecting against CIR injury. MicroRNAs (miRNAs) can regulate the activity of Nrf2-related signaling pathways by directly binding to Nrf2 mRNA or indirectly modulating the expression of upstream regulatory factors. Increasing Nrf2 expression or activity, or modulating the levels of related miRNAs, exerts protective effects against CIR injury. This review systematically summarizes recent research on miRNA-mediated regulation of the Nrf2 signaling pathway in CIR injury, focusing on direct and indirect regulatory modes and their pathological significance, with the aim of providing new research directions and potential targets for the precise prevention and treatment of CIR injury.

Key words cerebral ischemia-reperfusion; microRNA; Nrf2

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑卒中是严重危害我国人民健康的重大慢性非传染性疾病，是我国成人致死、致残的首位病因，具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率、高经济负担五大特点，其中缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）约占脑卒中发病率的 72%[1]，严重威胁了人民生命健康。根据最新公布的数

收稿日期：2026-03-01
基金项目：国家自然科学基金（82360788）；2020 年度内蒙古人才开发基金项目。
作者简介：毕经壮，男，在读硕士研究生，研究方向：复杂疾病病理生理学。E-mail：1403347022@qq.com
网络首发时间：2026-09-17 17:35:51 网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.r.20260917.1115.002

据，IS 在国际上的流行病学情况呈现“总体数量激增，但年龄标准化率下降”的双重特征[2]。IS 发病机制主要是由于各种病因导致脑部血液供应障碍，进而引发局部脑组织缺血、缺氧性坏死，并出现相应的神经功能缺陷症状[3]。目前，IS 的临床有效治疗方法有限，主要依赖静脉溶栓和机械取栓为主以尽早恢复脑血流，但大脑血循环恢复后可能会引发脑缺血再灌注（cerebral ischemia-reperfusion，CIR）损伤[4]。CIR 损伤是指在恢复缺血脑组织血流后，因能量耗竭、钙超载及线粒体功能障碍引发爆发性氧化应激，进而激活炎症级联反应、破坏血脑屏障并启动凋亡等细胞死亡程序，导致梗死体积扩大、出血转化及长期认知障碍等不良预后；其中氧化应激作为中心环节，通过过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)攻击与抗氧化系统耗竭贯穿整个损伤过程[5]。

核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid-2-related factor 2，Nrf2）是一种核转录因子，能够调控多种抗氧化酶和解毒酶的表达，促进细胞存活以及维持细胞的氧化还原稳态[6]。已有研究表明，Nrf2 相关信号通路在氧化应激诱导的 CIR 损伤中起着重要作用[7]。此外，微小 RNA（microRNA，miR）被证明可以调控 Nrf2 的表达和激活[8]。因此，调控 Nrf2 相关信号通路的 miR 可能是治疗 CIR 损伤的潜在治疗靶点。

1 Nrf2 的结构、调控机制及其在 CIR 损伤中的神经保护作用

Nrf2 广泛存在于多个组织器官中，该分子包含 7 个结构域（Neh1~7）。Neh2、Neh6 和 Neh7 均能调节 Nrf2 的稳定性，其中 Neh2 含有胞浆蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1（kelch-like ECH associated protein-1，Keap1）的结合位点，Keap1 以泛素/蛋白酶体依赖途径促进 Nrf2 降解，负向调控 Nrf2 转录活性[9,10]。然而，在病理状态下，Keap1 的 4 个半胱氨酸残基（Cys226/Cys613/Cys622/Cys624）被修饰，构象发生改变，打破了 Keap1 与 Nrf2 的相互作用，从而促进 Nrf2 的激活及其核易位。核易位的 Nrf2 与 Maf、JunD、c-Jun 等转录因子形成异二聚体，之后再与激活转录因子 4（activating transcription factor 4，ATF4）以及 DNA 的抗氧化反应元件（antioxidant response elements，ARE）结合，进而导致内源保护基因表达，包括过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、血红素加氧酶-1、谷胱甘肽还蛋白、谷胱甘肽 S-转移酶等[11]。

许多研究表明，Nrf2 在 IS 中过表达，且 Nrf2 在大脑坏死区周围的含量高于坏死区中央[12]。尽管这种内源性上调本质上是一种代偿性保护反应，但适度激活 Nrf2 有利于减少脑缺血后的脑组织损伤，如天竺葵素可能通过激活 Nrf2/血红素氧合酶-1（heme oxygenase-1，HO-1）通路，抑制氧化应激和神经元凋亡，对 CIR 损伤发挥保护作用[13]。此外，转染 Nrf2 siRNA 可减少红车轴草素对氧糖剥夺（oxygen-glucose deprivation/recovery，OGD/R）HT22 细胞的保护作用[14]。Nrf2 发挥神经保护作用的机制可能涉及抗氧化应激、抗炎、调节线粒体功能、保护血脑屏障、调节铁死亡等[15]（见图 1），如 Nrf2 可通过促进线粒体自噬[16]以及改善线粒体动力功能障碍[17]等途径恢复线粒体功能，进而在 CIR 损伤中发挥保护作用。

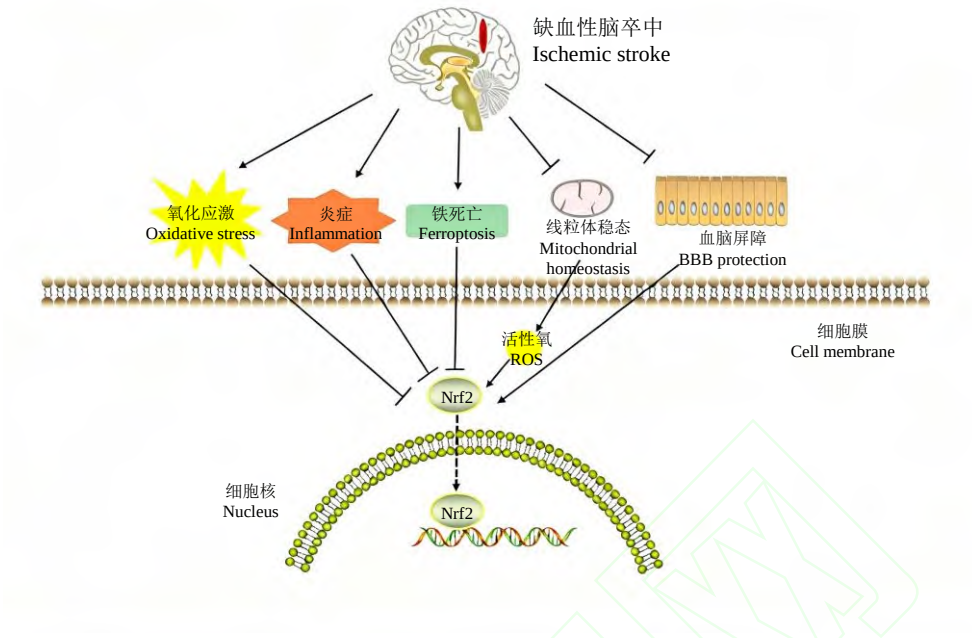

图 1 Nrf2 对缺血性脑卒中的影响机制
Figure 1 Mechanism of Nrf2's effect on ischemic stroke

2　miR 靶向调控 Nrf2 在 CIR 损伤中的作用

在小非编码 RNA 中，miR 可通过抑制转录或降解靶 mRNA 来调节蛋白质表达[18]。其具体机制是，成熟和活跃的 miR 可与靶 mRNA 的 3'-非翻译区（untranslated region，UTR）或 5'-UTR 的特定序列结合，抑制基因转录或分解靶 mRNA，miR 也可通过与基因的启动子区域相互作用来抑制或诱导转录。在 CIR 损伤中，miR 可通过靶向 Nrf2 或 Nrf2 的上游调控因子的 3'-UTR，进而调节 CIR 损伤的预后，以下总结了不同 miR 在 Nrf2 调控中的作用及其对 CIR 损伤的影响。

2.1　靶向 Nrf2 的 miR 及其调控机制

Wang 的研究发现大脑中动脉闭塞再灌注（middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R）小鼠再灌注后 24 h 和 48 h 大脑皮质中 miR-93 水平升高，使用 miR-93 拮抗剂可减少脑梗死体积、神经凋亡并恢复神经学评分。体外研究表明，抑制 miR-93 表达可减轻 OGD/R 诱导的神经元细胞的氧化应激水平。此外，研究还发现 miR-93 的下调增加了 Nrf2 和 HO-1 的表达，荧光素酶报告基因测定证实 miR-93 直接与 Nrf2 的 3'-UTR 靶位点结合。最后，研究发现敲除 Nrf2 或 HO-1 消除了 miR-93 拮抗剂诱导的对神经元细胞的神经保护。这些结果表明，miR-93 拮抗剂通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径减轻缺血性损伤[19]。

miR-98-5p 被认为是与应激相关的 miR，在调节多种应激诱导的细胞过程中发挥着关键作用，如细胞凋亡、细胞存活和氧化应激，过表达 miR-98-5p 可以减少 OGD/R 诱导的神经元细胞凋亡和 ROS 的产生[20]。此外，Sun 等[21]的研究表明，沉默 Nrf2 逆转了 miR-98-5p 对 CIR 损伤的保护作用，证明 Nrf2 是 miR-98-5p 在 CIR 损伤中的重要靶点。

LI 等[22]研究发现，茶黄素治疗可显著减少 MCAO/R 大鼠脑梗死体积，减轻神经损伤，从而改善记忆力和学习能力受损。茶黄素处理显著增强了神经干细胞增殖能力、降低凋亡率和抑制氧化应激。研究结果显示，茶黄素靶向抑制 miR-128-3p 并进一步激活 Nrf2 通路以减少氧化应激。综上所述，茶黄素可通过抑制 miR-128-3p 并激活 Nrf2 相关信号通路，减轻 CIR 损伤。

据报道，右美托咪定（dexmedetomidine，Dex）处理可抑制 miR-140-5p 表达，并升高转移相关肺腺癌转录物 1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1,MALAT1)和 Nrf2 表达。敲低 MALAT1 下调了神经元细胞中 Nrf2 的表达并促进了氧化应激。此外，miR-140-5p 在直接靶向抑制

Nrf2 的同时，亦为 MALAT1 的下游靶标 miR。Qin 等[23]研究表明，Dex 通过调节 MALAT1/miR-140-5p/Nrf2 轴，对 CIR 诱导的脑损伤起保护作用。

miR-142-5p 被认为是一种重要的细胞存活调节因子。研究表明，miR-142-5p 在 OGD/R 诱导的的神经元细胞中表达上调，而抑制 miR-142-5p 可以缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤和氧化应激，过表达 miR-142-5p 则会加剧细胞损伤和氧化应激。此外，Nrf2 被证明是 miR-142-5p 的直接靶点，Nrf2 在 miR-142-5p 过表达的细胞模型中被下调，敲低 Nrf2 可消除由抑制 miR-142-5p 介导的神经保护作用。综上所述，下调 miR-142-5p 可通过促进 Nrf2 表达，减轻 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤[24]。

Chu 等[25]研究表明，在 OGD/R 诱导的嗜铬细胞瘤细胞（Pheochromocytoma cells 12，PC12）中，人参皂苷 Rg1 具有减轻细胞损伤的作用，并显著降低 miR-144 的表达，促进 Nrf2 的核易位，增强 Nrf2/ARE 信号通路的表达，且随着 Rg1 的剂量增加，其保护作用愈加明显。而敲除 Nrf2 则消除了 Rg1 在 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中的神经保护作用，但对 miR-144 的表达没有影响，表明 miR-144 是 Nrf2 的上游调节因子。在 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中，敲除 miR-144 可逆转 Rg1 对 Nrf2/ARE 通路的激活。而在 MCAO/R 大鼠中，Rg1 给药减轻了缺血性损伤，并激活 Nrf2/ARE 通路，通过将 miR-144-shRNA 注射到预测的缺血半暗带中，则消除了 Rg1 的保护作用，这些证据表明 Rg1 是通过调节 miR-144 进而调节 Nrf2/ARE 信号通路。总之，上述研究表明，Rg1 可通过减少 miR-144 的表达并促进 Nrf2/ARE 通路来减轻 CIR 损伤。

研究发现 miR-153 在接受 OGD/R 诱导后的神经元细胞中显著上调，而抑制 miR-153 表达显著减轻了 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤和氧化应激，并显著促进了 Nrf2 和 HO-1 的表达，沉默 Nrf2 可阻断由抑制 miR-153 介导的神经保护作用。这些研究表明，抑制 miR-153 通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路保护神经元细胞免受 OGD/R 诱导的损伤[26]。

Zhai 等[27]研究发现，茯苓酸（pachymic acid，PA）可逆转由缺氧/复氧（hypoxia/re-oxygenation，H/R）造成的神经元细胞损伤，而抑制 miR-155 可通过激活 Nrf2/HO-1 通路提高细胞活力和减少细胞凋亡。PA 通过 miR-155/NRF2/HO-1 轴防止 H/R 诱导的神经元细胞损伤。

Zhang 等[28]研究证明，miR-302b-3p 可通过下调成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）15 加重 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤。此外，抑制 miR-302b-3p 可激活 Nrf2/ARE 信号通路，减少 ROS 生成，进而降低 OGD/R 诱导的氧化应激。证明了 miR-302b-3p 可通过调节 Nrf2/ARE 信号通路，进而影响 CIR 损伤。

2.2 miR 调控 GSK3β/Nrf2 信号通路在 CIR 损伤中的作用

糖原合成酶激酶 3β（glycogen synthase kinase 3 β，GSK3β）在神经元中大量表达，既往研究表明，下调 GSK3β 可通过激活 Nrf2/ARE 信号通路，有效减轻神经元死亡，保护神经元免受 CIR 损伤[29]。

FGF19 是一种重要的细胞保护调节因子，可在 CIR 损伤的不利条件下拮抗氧化应激并减轻细胞凋亡[30]。Zhou 等[31]研究表明，miR-9-3p 在 MCAO/R 小鼠脑组织和 OGD/R 诱导的 HT22 细胞中显著上调，下调 miR-9-3p 可显著升高 FGF19 表达水平，并减轻 MCAO/R 小鼠的梗死体积及 OGD/R 诱导的细胞损伤和氧化应激。其具体机制可能是，抑制 miR-9-3p 可增强 FGF19 的表达，进而调节 GSK3β/Nrf2/ARE 信号介通路导的抗氧化反应，最终减轻 CIR 损伤。

miR-135a 和 miR-135b-5p 是关键的细胞凋亡调节因子，已被证明在 CIR 损伤中发挥关键作用。OGD/R 诱导神经元细胞会导致 miR-135a 和 miR-135b-5p 的表达下调，而诱导这些 miR 过表达可通过下调 GSK3β 的表达，进而激活 Nrf2/ARE 信号通路，从而减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤和氧化应激[32,33]。

2.3 miR 调控 Brg1/Nrf2 信号通路在 CIR 损伤中的作用

Brahma 相关基因 1（brahma-related gene 1，Brg1）是哺乳动物转换/蔗糖不可发酵（switch defective / sucrose non-fermentable，SWI/SNF）复合物的一个中心催化亚基，通过调节哺乳动物细胞染色质激活和抑制，在基因表达中起着重要作用。在 CIR 损伤的情况下，Brg1 可通过激活 Nrf2 介导

的抗氧化反应来抑制氧化应激[34]。

Li 等[35]的研究表明，经 OGD/R 处理的神经元细胞中 miR-144-3p 表达水平下调；过表达 miR-144-3p 可加重氧化应激和神经元凋亡，而下调 miR-144-3p 则可减轻 OGD/R 所致的细胞损伤，发挥保护作用。此外，抑制 miR-144-3p 的表达促进了 Nrf2 的核易位和 ARE 活性的增加，并且敲低 Brg1 显著降低了抑制 miR-144-3p 介导的神经保护作用。表明过表达 miR-144-3p 可抑制 Brg1/Nrf2/ARE 信号通路，从而加重 OGD/R 诱导的细胞损伤。

Li 等[34]研究发现，在 OGD/R 诱导 HT22 神经元细胞后，细胞中的 miR-199a-5p 表达水平显著上调，miR-199a-5p 过表达可促进 OGD/R 诱导的神经元细胞凋亡和 ROS 产生，而抑制 miR-199a-5p 表达则减轻了上述现象。值得注意的是，研究发现 Brg1 是 miR-199a-5p 的下游分子。抑制 miR-199a-5p 可通过靶向 Brg1 促进 Nrf2/HO-1 信号通路激活，而沉默 Brg1 可逆转抑制 miR-199a-5p 介导的神经保护作用。综上所述，下调 miR-199a-5p 可通过上调 Brg1 表达，激活 Nrf2/HO-1 信号通路，保护神经元细胞免受 OGD/R 诱导的细胞损伤。

2.4　miR 调控 Keap1/Nrf2 信号通路在 CIR 损伤中的作用

Keap1 是 Cullin3（CUL3）泛素 E3 连接酶的一个组成部分，并且作为泛素 E3 连接酶的衔接蛋白成分发挥作用，调控着 Nrf2 的泛素化及其降解[36]。

Wei 等[37]研究发现，在 OGD/R 诱导后的 HT22 细胞模型中，miR-29 家族（miR-29a/b/c）的表达显著降低。miR-29 家族过表达逆转了 OGD/R 诱导的 HT22 细胞模型中 ROS 升高和基质金属蛋白酶（MMPs）的降低。此外，研究还发现，过表达 miR-29 可抑制 Keap1、B 细胞淋巴瘤 2 相关 X(B-cell lymphoma 2-associated X, Bax)蛋白和 p53 上调凋亡调节因子（p53 up-regulated modulator of apoptosis，PUMA）的表达，并增加了 Nrf2 的表达。表明 miR-29 家族可通过抑制促凋亡蛋白的表达，激活 Nrf2 相关信号通路，减轻 CIR 损伤。

据报道，在 MCAO/R 大鼠脑梗死区，miR-34b 表达水平以时间依赖性方式下调，而过表达 miR-34b 可通过降低脑梗死体积，增加 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平，同时增加总超氧化物歧化酶和锰超氧化物歧化酶来改善 CIR 损伤。而过表达 Keap1 可减弱 miR-34b 的神经保护作用，表明 miR-34b 可以通过直接靶向抑制 Keap1 的蛋白水平，减轻 CIR 损伤[38]。

研究表明，在 MCAO/R 和 OGD/R 诱导下，缺血皮质组织和原代神经元中观察到 miR-139-5p 下调、Keap1 上调、Nrf2 相关抗氧化途径失活以及 ROS 驱动的硫氧还蛋白相互作用蛋白过表达。但人参皂苷 Rd（Rd）可上调 miR-139-5p 的表达，抑制 Keap1 转录活性并激活 Nrf2 抗氧化途径，减轻 CIR 损伤[39]。

Zhou 等[40]研究表明，在 H/R 处理的 PC12 细胞中，miR-141 的表达下调，Keap1 表达水平升高，Nrf2 核易位水平下降。过表达 miR-141 处理可明显改善 H/R 诱导的细胞损伤，而 miR-141 抑制剂则显著加重细胞损伤。由此可见，miR-141 可介导 Keap1/Nrf2 信号通路促进细胞活力，抑制细胞凋亡，降低氧化应激，从而减轻 H/R 诱导的细胞损伤。

研究表明，白藜芦醇（resveratrol，Res）可以通过上调 miR-450b-5p 靶向抑制 Keap1 进而激活 Nrf2 通路。上调 miR-450b-5p 或下调 Keap1 可进一步促进 Res 的保护作用，而下调 miR-450b-5p 或上调 Keap1 则相反。该研究表明，Res 在 CIR 损伤中通过 miR-450b-5p/Keap1/Nrf2 通路发挥神经保护作用[41]。

Ma 等[42]研究表明，miR-602 在 OGD/R 诱导后的人脑微血管内皮（human brain microvascular endothelial，HMBE）细胞中上调，而 miR-602 可通过增加 Nrf2/ARE 信号通路的表达水平来降低 ROS 水平，并促进细胞存活。此外，研究还发现 Keap1 和羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1（HMG-CoA reductase degradation protein 1，Hrd1）是 miR-602 的下游因子，过表达 Keap1 和 Hrd1 可以逆转 miR-602 在 OGD/R 诱导的 HMBEC 中所起的保护作用。因此，miR-602 与其下游的 Keap1 和 Hrd1 可能成为防治 HMBEC 氧化应激损伤诱导的细胞凋亡的潜在靶点。

2.5 mi 调控其他 Nrf2 上游分子在 CIR 损伤中的作用

钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II（Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II，CaMKII）是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，可通过调节细胞内 Ca^{2+}稳态，在细胞凋亡中起关键作用[43]。腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine activated protein kinase，AMPK）是参与 CAMKK2 动态调控 Ca^{2+}-ATP 的关键底物，AMPK 可触发多条有利于 ATP 产生的信号通路[44,45]。已有研究表明，OL-FS13（一种源自大绿臭蛙的神经保护肽）对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞和 MCAO/R 大鼠具有保护作用，而 miR-21-3p 过表达可靶向抑制 CAMKK2 表达及 AMPK 磷酸化，并且抑制了 OL-FS13 对 CIR 损伤的治疗作用。而抑制 CAMKK2 可拮抗 OL-FS13 上调 Nrf2，从而消除 OL-FS13 的抗氧化活性。表明 OL-FS13 可通过抑制 miR-21-3p，激活 CAMKK2/AMPK/Nrf2 轴来减轻 CIR 损伤[46]。

沉默信息调节因子（silent mating type information regulation 2 homolog，SIRT）1 属于 Sirtuins 家族，而 Sirtuins 是一组烟酰胺腺嘌呤二核苷酸辅酶（nicotinamide adenine dinucleotide，NAD+）依赖性的去乙酰化酶，可调节多种生理和病理过程，包括细胞存活、凋亡、氧化应激、炎症和神经保护等[47]。已有研究表明，SIRT1/Nrf2 信号通路的失调参与了急性神经炎症以及神经退行性病变的发生过程[48]。Li 等[49]研究发现，miR-126 在 OGD/R 诱导的人脐静脉内皮（human umbilical vein endothelial，HUVE）细胞中表达显著降低；作为 CIR 损伤的体外模型，该细胞转染 miR-126 模拟物后，可逆转 OGD/R 诱导的细胞活力下降和氧化应激，其具体机制可能是 miR-126 通过促进 SIRT1/Nrf2 信号通路，减轻氧化应激和炎症反应，进而减轻了 OGD/R 对 HUVEC 细胞的神经毒性[49]。

环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）是一种重要的第二信使，可调节蛋白激酶的活性参与炎症和氧化应激等多种生化过程[50]。细胞内 cAMP 水平的升高可以通过介导环磷腺苷效应元件结合蛋白（cAMP-response element binding protein，CREB）的磷酸化来改变细胞的抗氧化能力，同时促进 Nrf2 的表达[51,52]。Wang 等[53]研究表明，在 CIR 损伤中，miR-134 的表达上调，从而抑制 CREB 的激活和表达，导致 ROS 生成和细胞损伤。而红花黄 B（safflower yellow，SYB）可通过增加细胞内 cAMP 水平，抑制 miR-134 表达，并激活 CREB/Nrf2 通路，减轻 CIR 损伤[53]。

Sestrins 是一类高度保守的应激诱导蛋白，通过多种机制保护细胞免 DNA 损伤、缺氧和氧化应激等病理因素损伤。Sestrin 2 是 Sestrins 蛋白亚型之一，可通过激活 Nrf2 相关信号通路，减少 ROS 的产生，从而抵抗氧化应激[54]。据报道，过表达 miR-148b-3p 可增加 ROS 的生成和神经元细胞凋亡。此外，miR-148b-3p 通过 Sestrin 2 介导 Nrf2 相关信号通路[55]。因此，沉默 miR-148b-3p 可通过上调 Sestrin 2 和激活 Nrf2 信号通路，发挥神经保护作用。

突触后致密蛋白-93（postsynaptic density protein-93，PSD-93）是膜结合鸟苷酸激酶（membrane-associated guanylate kinases，MAGUKs）的一个亚型，研究表明，敲低 PSD-93 可减轻脑缺血诱导的小鼠大脑功能障碍和神经元损伤[56]。Zhang 等[57]研究发现，OGD/R 诱导的神经元细胞中 miR-152-3p 表达下调，而 miR-152-3p 过表达可减轻 OGD/R 对神经元细胞的损伤，减少细胞凋亡和 ROS 的产生。相比之下，抑制 miR-152-3p 表达则加剧了 OGD/R 诱导的细胞损伤。试验结果显示过表达 PSD-93 或沉默 Nrf2 可逆转 OGD/R 诱导神经元中 miR-152-3p 的神经保护作用。总体而言，这些结果表明 miR-152-3p 通过抑制 PSD-93 的表达，促进 Nrf2/ARE 抗氧化信号通路的表达，保护神经元细胞免受 OGD/R 诱导的细胞凋亡。

SIRT6 属于 Sirtuins 家族，主要定位在细胞核中，在细胞代谢、DNA 损伤修复、氧化应激等生物学过程中有着重要作用[58]。Zhang 等[59]指出，在 CIR 损伤中，SIRT6 可作为 Nrf2/ARE 信号通路的正向调控因子，通过激活 Nrf2/ARE 信号通路来减轻 CIR 损伤。据报道，miR-370 在 MCAO/R 大鼠脑组织中上调，敲除 miR-370 可减少脑梗死体积，减轻 CIR 损伤，体外实验表明，敲低 miR-370 可增强细胞活力并减少 OGD/R 诱导的人神经母细胞瘤细胞凋亡。此外，miR-370 可抑制 SIRT6 表达并调节 Nrf2/ARE 信号通路，而过表达 SIRT6 可缓解由 miR-370 加剧的 OGD/R 诱导的细胞损伤[60]。表明 miR-370 通过靶向 SIRT6/Nrf2/ARE 信号通路加重 CIR 损伤。

磷脂酰肌醇 3 激酶（Phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB，AKT）信号转导通路可以促进细胞生存和抑制细胞凋亡，在 CIR 损伤时发挥神经保护作用[61]。Li 等[62]研究发现，低剂量脂多糖（lipopoly saccharide，LPS）可降低 OGD/R 诱导后 PC12 细胞中 miR-429 的表达，同时激活 PI3K/AKT/Nrf2 信号通路，并抑制氧化应激和炎症。研究还发现 miR-429 可负向调节 PI3K，抑制 miR-429 可通过激活 PI3K/AKT/Nrf2 信号通路，抑制氧化应激和炎症反应。因此，低剂量 LPS 通过下调 miR-429，激活 PI3K/AKT/Nrf2 通路介导[62]。

3　总结与展望

本文综述了在 CIR 损伤中 miR 对 Nrf2 信号通路功能的调控作用。氧化应激是 CIR 的主要病理机制之一，而 Nrf2 是细胞中抗氧化和氧化还原信号的主调节因子，Nrf2 相关信号通路的激活能够减轻 CIR 损伤。因此，调控 Nrf2 的表达是治疗 CIR 的一个重要途径。多种 miR 参与调控 Nrf2 的表达，并影响 CIR 的预后（见表 1）。明确这些 miR 与 Nrf2 的相互作用关系，可以为 IS 的防治提供新的治疗策略，为新药研发提供新的靶点。从转化视角看，miR 虽可通过多靶点协同调控病理网络，但将其高效递送至脑组织仍是难点，未来需结合脂质纳米颗粒与仿生载体等策略以突破瓶颈；Nrf2 则借助局部递送、间接调控或阶段性干预，在发挥抗氧化保护的同时降低脱靶风险。上述两种策略可能是突破脑部 miR 疗法转化瓶颈的关键路径，二者的有机结合将为推动 miR 疗法向临床转化奠定坚实基础。

表1 在CIR损伤中调控Nrf2通路的miR

Table 1 miR regulating the Nrf2 pathway in CIR injury

微小 RNA miR	靶基因及推定下游基因 Target gene putative downstream gene	对 Nrf2 的作用 Effect on Nrf2	参考文献 References
miR-9-3p	GSK-3β	↓Nrf2	[31]
miR-21-3p	CAMKK2	↓Nrf2	[46]
miR-29	Keap1	↑Nrf2	[37]
miR-34b	Keap1	↑Nrf2	[38]
miR-93	Nrf2	↓Nrf2	[19]
miR-98-5p	Nrf2	↑Nrf2	[21]
miR-126	SIRT1	↑Nrf2	[49]
miR-128-3p	Nrf2	↓Nrf2	[22]
miR-134	CREB	↓Nrf2	[53]
miR-135a/b	GSK3β	↑Nrf2	[32,33]
miR-139-5p	Keap1	↑Nrf2	[39]
miR-140-5p	Nrf2	↓Nrf2	[23]
miR-141	Keap1	↑Nrf2	[40]
miR-142-5p	Nrf2	↓Nrf2	[24]
miR-144	Nrf2	↓Nrf2	[25]
miR-144-3p	Brg1	↓Nrf2	[35]
miR-148b-3p	Sestrin2	↓Nrf2	[55]
miR-152-3p	PSD-93	↑Nrf2	[57]
miR-153	Nrf2	↓Nrf2	[26]
miR-155	Nrf2	↓Nrf2	[27]
miR-199a-5p	Brg1	↓Nrf2	[34]
miR-302b-3p	Nrf2	↓Nrf2	[28]
miR-370	SIRT6	↓Nrf2	[60]
miR-429	PI3K	↓Nrf2	[62]
miR-450b-5p	Keap1	↑Nrf2	[41]
miR-602	Keap1	↑Nrf2	[42]

参考文献

[1] 王陇德， 彭斌， 张鸿祺， 等. 《中国脑卒中防治报告 2020》概要 [J]. 中国脑血管病杂志， 2022， 19（2）： 136-144.
Wang L D, Peng B, Zhang H Q, et al. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2020 [J]. Chin J Cerebrovascular Dis, 2022, 19(2): 136-144.

[2] Feigin V L, Brainin M, Norrving B, et al. World stroke organization: global stroke fact sheet 2025 [J]. Int J Stroke, 2025, 20(2): 132-144.

[3] Teng P, Wang Y Y, Ding C Y, et al. Dynamics and heterogeneity of the neurovascular unit in ischemic stroke [J]. Trends Pharmacol Sci, 2026, 47(4): 423-438.

[4] Herpich F, Rincon F. Management of acute ischemic stroke [J]. Crit Care Med, 2020, 48(11): 1654-1663.

[5] Bahire K L, Maḷuhins R, Bello F, et al. Long-term region-specific mitochondrial functionality changes in both cerebral hemispheres after fMCAo model of ischemic stroke [J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(4): 416.

[6] Zhang D D. Thirty years of NRF2: advances and therapeutic challenges [J]. Nat Rev Drug Discov, 2025, 24(6): 421-444.

[7] Zhang Z, Zhang J, Shi R, et al. Esculetin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury and protects neurons through Nrf2 activation in rats [J]. Braz J Med Biol Res, 2024, 57: e13914.

[8] Zhou X, You G, Zhang L, et al. Modified Shenqi compound alleviated constipation and inflammation in diabetic mice by regulating the miR-

23a-3p/Nrf2 axis [J]. J Mol Histol, 2026, 57(2): 80.
[9] Morgenstern C, Lastres-Becker I, Demirdöğen B C, et al. Biomarkers of NRF2 signalling: Current status and future challenges [J]. Redox Biol, 2024, 72: 103134.
[10] Luchkova A, Mata A, Cadenas S. Nrf2 as a regulator of energy metabolism and mitochondrial function [J]. FEBS Lett, 2024: 1873-3468.14993.
[11] Bae T, Hallis S P, Kwak M K. Hypoxia, oxidative stress, and the interplay of HIFs and NRF2 signaling in cancer [J]. Exp Mol Med, 2024, 56(3): 501-514.
[12] Li G, Xiao H, Zuo C, et al. N-butylphthalide (NBP) and ligustrazine (TMP) triazole hybrids target the KEAP1-NRF2 pathway to inhibit ferroptosis and exert brain neuroprotectivity [J]. Redox Biol, 2025, 86: 103835.
[13] Yang Y, He B, Zhang X, et al. Geraniin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neuronal apoptosis *via* regulation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 2152746.
[14] Wang R, Wei Y, Deng W, et al. Pratensein mitigates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in OGD/R-injured HT22 cells by activating Nrf2-anti-oxidant signaling [J]. Neurotox Res, 2022, 40(2): 384-394.
[15] Wang Z, Feng W, Li X, et al. Targeting the Nrf2/HO-1 aixs: a therapeutic strategy against regulated cell death in Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2026, 116: 103035.
[16] Wang X X, Li M, Xu X W, et al. BNIP3-mediated mitophagy attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by inhibiting ferroptosis through P62-KEAP1-NRF2 pathway activation to maintain iron and redox homeostasis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2025, 46(1): 33-51.
[17] Forte M, Schirone L, Ameri P, et al. The role of mitochondrial dynamics in cardiovascular diseases [J]. British J Pharmacology, 2021, 178(10): 2060-2076.
[18] Ambros V. microRNA-mediated gene regulation and the resilience of multicellular animals [J]. Postepy Biochem, 2024, 70(1): 62-70.
[19] Wang P, Liang X, Lu Y, et al. microRNA-93 downregulation ameliorates cerebral ischemic injury through the Nrf2/HO-1 defense pathway [J]. Neurochem Res, 2016, 41(10): 2627-2635.
[20] Padmavathi G, Ramkumar K M. microRNA mediated regulation of the major redox homeostasis switch, Nrf2, and its impact on oxidative stress-induced ischemic/reperfusion injury [J]. Arch Biochem Biophys, 2021, 698: 108725.
[21] Sun X, Li X, Ma S, et al. microRNA-98-5p ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced neuronal injury by inhibiting Bach1 and promoting Nrf2/ARE signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 507(1/2/3/4): 114-121.
[22] Li R, Li X, Wu H, et al. Theaflavin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by abolishing miRNA-128-3p-mediated Nrf2 inhibition and reducing oxidative stress [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(6): 4893-4904.
[23] Qin Z, Xu Y. Dexmedetomidine alleviates brain ischemia/reperfusion injury by regulating metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1/MicroRNA-140-5p/nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 axis [J]. PPL, 2024, 31(2): 116-127.
[24] Wang N, Zhang L, Lu Y, et al. Down-regulation of microRNA-142-5p attenuates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced neuron injury through up-regulating Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1187-1195.
[25] Chu S F, Zhang Z, Zhou X, et al. Ginsenoside Rg1 protects against ischemic/reperfusion-induced neuronal injury through miR-144/Nrf2/ARE pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 13-25.
[26] Ji Q, Gao J, Zheng Y, et al. Inhibition of microRNA-153 protects neurons against ischemia/reperfusion injury in an oxygen-glucose deprivation and reoxygenation cellular model by regulating Nrf2/HO-1 signaling [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(7): e21905.
[27] Zhai Y, Liu B, Wu L, et al. Pachymic acid prevents neuronal cell damage induced by hypoxia/reoxygenation *via* miR-155/NRF2/HO-1 axis [J]. Acta Neurobiol Exp, 2022, 82(2): 197-206.
[28] Zhang Z, Wang N, Zhang Y, et al. Downregulation of microRNA-302b-3p relieves oxygen-glucose deprivation/re-oxygenation induced injury in murine hippocampal neurons through up-regulating Nrf2 signaling by targeting fibroblast growth factor 15/19 [J]. Chem Biol Interact, 2019, 309: 108705.
[29] Pang T, Wang Y J, Gao Y X, et al. A novel GSK-3β inhibitor YQ138 prevents neuronal injury induced by glutamate and brain ischemia through activation of the Nrf2 signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6): 741-752.
[30] Fang Y, Zhao Y, He S, et al. Overexpression of FGF19 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced injury of cardiomyocytes by regulating GSK-3β/Nrf2/ARE signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(4): 2355-2362.
[31] Zhou Y, Yang L, Bo C, et al. microRNA-9-3p aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting fibroblast growth factor 19 (FGF19) to inactivate GSK-3β/Nrf2/ARE signaling [J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2021, 17: 1989-2002.
[32] Duan Q, Sun W, Yuan H, et al. microRNA-135b-5p prevents oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced neuronal injury through regulation of the GSK-3β/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Arch Med Sci, 2018, 14(4): 735-744.
[33] Liu X, Li M, Hou M, et al. microRNA-135a alleviates oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury in neurons through regulation of GSK-3β/Nrf2 signaling [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(7): e22159.
[34] Li F, Liang J, Tong H, et al. Inhibition of microRNA-199a-5p ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in HT22 neurons by targeting Brg1 to activate Nrf2/HO-1 signalling [J]. Clin Exp Pharma Physio, 2020, 47(6): 1020-1029.
[35] Li Y, Zhao Y, Cheng M, et al. Suppression of microRNA-144-3p attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal injury by promoting Brg1/Nrf2/ARE signaling [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2018, 32(4): e22044.
[36] Uruno A, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 system and neurodegenerative diseases [J]. Antioxid Redox Signal, 2023: 38(13-15): 974-988.
[37] Wei R, Zhang R, Li H, et al. miR-29 targets *PUMA* to suppress oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced cell death in hippocampal neurons [J]. Curr Neurovasc Res, 2018, 15(1): 47-54.
[38] Huang R, Ma J, Niu B, et al. miR-34b protects against focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rat by targeting Keap1 [J]. J Stroke Cerebrovascular Dis, 2019, 28(1): 1-9.
[39] Yao Y, Hu S, Zhang C, et al. Ginsenoside Rd attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by exerting an anti-pyroptotic effect *via* the miR-139-5p/FoxO1/Keap1/Nrf2 axis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 105: 108582.
[40] Zhou B, Liu H Y, Zhu B L, et al. microRNA-141 protects PC12 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury *via* regulating Keap1-Nrf2 signaling pathway [J]. J Bioenerg Biomembr, 2019, 51(4): 291-300.
[41] Liu J, Chen J, Zhang J, et al. Mechanism of resveratrol improving ischemia–reperfusion injury by regulating microglial function through microRNA-450b-5p/KEAP1/Nrf2 pathway [J]. Mol Biotechnol, 2023, 65(9): 1498-1507.
[42] Ma C, Yang L, Gao Q, et al. miR-602 activates NRF2 antioxidant pathways to protect HBMECs from OGD/R-induced oxidative stress *via* targeting KEAP1 and HRD1 [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 6967573.
[43] McAloon L M, Muller A G, Nay K, et al. CaMKK2: bridging the gap between Ca^{2+} signaling and energy-sensing [J]. Essays Biochem, 2024,

68(3): 309-320.
[44] Sun L, Xu L, Duan T, et al. CAV1 exacerbates renal tubular epithelial cell senescence by suppressing CaMKK2/AMPK-mediated autophagy [J]. Aging Cell, 2025, 24(5): e14501.
[45] Miao Z, Sun Y, Feng Z, et al. CAMKK2-AMPK axis endows dietary calcium and phosphorus levels with regulatory effects on lipid metabolism in weaned piglets [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2024, 15(1): 105.
[46] Liu N, Fan Y, Li Y, et al. OL-FS13 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting miR-21-3p expression [J]. Curr Neuropharmacol, 2023, 21(12): 2550-2562.
[47] Dinislam K, Khoso M A, Kataev V A, et al. SIRT1: The first key to unlocking the mystery of cardiovascular diseases [J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1668718.
[48] Shah S A, Khan M, Jo M H, et al. Melatonin stimulates the SIRT1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(1): 33-44.
[49] Li J, Yang C, Wang Y. miR-126 overexpression attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response *via* the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Med Rep, 2021, 23(2): 165.
[50] Zhang H, Liu Y, Liu J, et al. cAMP-PKA/EPAC signaling and cancer: the interplay in tumor microenvironment [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1): 5.
[51] Firuzi O, Moosavi F, Hosseini R, et al. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols [J]. DDDT, 2015: 23.
[52] Li N, Li B, Brun T, et al. NADPH oxidase NOX2 defines a new antagonistic role for reactive oxygen species and cAMP/PKA in the regulation of insulin secretion [J]. Diabetes, 2012, 61(11): 2842-2850.
[53] Wang C, Wan H, Wang Q, et al. Safflor yellow B attenuates ischemic brain injury *via* downregulation of long noncoding AK046177 and inhibition of microRNA-134 expression in rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4586839.
[54] Yang Y, Yang P, Zheng Z, et al. Sestrin2 ameliorates LPS-induced cardiomyocyte injury by inhibiting ferroptosis *via* the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Eur J Med Res, 2025, 31(1): 3.
[55] Du Y, Ma X, Ma L, et al. Inhibition of microRNA-148b-3p alleviates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in HT22 hippocampal neuron *via* reinforcing Sestrin2/Nrf2 signalling [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(4): 561-570.
[56] Zhang M, Li Q, Chen L, et al. PSD-93 deletion inhibits Fyn-mediated phosphorylation of NR2B and protects against focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2014, 68: 104-111.
[57] Zhang A, Qian Y, Qian J. microRNA-152-3p protects neurons from oxygen-glucose-deprivation/reoxygenation-induced injury through upregulation of Nrf2/ARE antioxidant signaling by targeting PSD-93 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 517(1): 69-76.
[58] Lu Y, Yang J, Wu Q, et al. The role and molecular pathways of SIRT6 in senescence and age-related diseases [J]. Adv Biol, 2025, 9(4): 2400469.
[59] Zhang W, Wei R, Zhang L, et al. Sirtuin 6 protects the brain from cerebral ischemia/reperfusion injury through NRF2 activation [J]. Neuroscience, 2017, 366: 95-104.
[60] Ruan Z F, Xie M, Gui S J, et al. miR-370 accelerated cerebral ischemia reperfusion injury *via* targeting SIRT6 and regulating Nrf2/ARE signal pathway [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2020, 36(9): 741-749.
[61] Li M, Jiang Y, Xue Y, et al. Eupalinolide B prevents cerebral ischemia-reperfusion injury *via* the PI3K/Akt/GSK3β(Ser9) signaling pathway [J]. Bioorg Chem, 2026, 173: 109635.
[62] Li W, Tang T, Yao S, et al. Low-dose lipopolysaccharide alleviates spinal cord injury-induced neuronal inflammation by inhibiting microRNA-429-mediated suppression of PI3K/AKT/Nrf2 signaling [J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(1): 294-307.