

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.14.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210218.1200.006.html\(2021-02-18\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210218.1200.006.html(2021-02-18))

持续乙醇摄入通过抑制 NRF2 通路促进 HMGB1 及其下游炎症因子表达^{*}

李昕瞳¹, 孙光涛¹, 王 梦¹, 戚询中¹, 黄作义¹, 黄昕艳², 朱晓峰^{3△}

(1. 佳木斯大学附属第一医院神经内科, 黑龙江佳木斯 154002; 2. 佳木斯大学附属第二医院神经内科, 黑龙江佳木斯 154002; 3. 牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江牡丹江 157000)

[摘要] **目的** 分析核因子 E2 相关因子 2(NRF2)在持续乙醇摄入调节小鼠前额叶高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)通路及炎症反应中的作用。**方法** 腹腔注射乙醇构建持续乙醇摄入小鼠模型;并用乙醇干预原代神经元构建乙醇干预细胞模型;NRF2 通路特异激动剂特丁基对苯二酚(tBHQ)对模型进行干预,选用实时荧光定量聚合酶链反应检测前额叶及神经元目的基因 mRNA 水平;选用 Western blot 检测蛋白表达变化。**结果** 与对照组相比,乙醇干预组小鼠前额叶炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)($P=0.015$)、白细胞介素(IL)-1 β ($P=0.017$)及 HMGB1 通路相关基因 HMGB1($P=0.004$)、TLR3($P=0.030$)、TLR4($P=0.004$) mRNA 相对表达水平升高;NRF2($P=0.014, 0.014$)及 HO-1($P=0.030, 0.012$)转录及蛋白表达水平均降低;与单纯乙醇摄入小鼠相比较,tBHQ 干预后能够降低 IL-1 β ($P=0.003$)、HMGB1($P=0.000$)、TLR4($P=0.015$) mRNA 水平及 HMGB1($P=0.043$)蛋白表达水平;在神经元实验中,与单纯乙醇干预组相比,tBHQ 干预后神经元 HMGB1($P=0.001, 0.004$)转录及蛋白水平明显下降。**结论** 持续乙醇摄入通过抑制小鼠前额叶 NRF2 表达,进而激活 HMGB1/TLR4 通路,促进其下游 IL-1 β 表达。

[关键词] 乙醇;前额叶;NRF2;HMGB1;炎症反应

[中图分类号] R749.6+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)14-2352-05

Continuous alcohol intake promotes expression of HMGB1 and its downstream inflammatory factors by inhibiting NRF2 pathway^{*}

LI Xintong¹, SUN Guangtao¹, WANG Meng¹, QI Xunzhong¹,
HUANG Zuoyi¹, HUANG Xinyan², ZHU Xiaofeng^{3△}

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China; 2. Second Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China; 3. Medical Research Center of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang 157000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the role of NRF2 in the regulation of HMGB1 pathway and inflammatory response in the prefrontal lobe of mice by continuous alcohol intake. **Methods** The intraperitoneal injection of ethanol was used to establish the continuous alcohol intake model of mice; the primary neurons were intervened by ethanol to construct the ethanol interventional cellular model; the NRF2 pathway specific agonist conducted the intervention on the model. The mRNA level of target genes in the prefrontal lobe and neuron was detected by using the real time qRT-PCR. The change of protein expression was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the relative expression levels of TNF α ($P=0.015$), IL-1 β ($P=0.017$) and HMGB1 pathway related gene HMGB1($P=0.004$), TLR3($P=0.030$) and TLR4($P=0.004$) mRNA in the mice prefrontal lobe of the ethanol intervention group were increased; the transcription and protein expression of NRF2($P=0.014, 0.014$) and HO-1($P=0.030, 0.012$) were decreased; compared with the simple ethanol intake mice, the tBHQ intervention could reduce the mRNA levels of IL-1 β ($P=0.003$), HMGB1($P=0.000$) and TLR4($P=0.015$), and protein levels of HMGB1($P=0.043$); in the neuron experiment, compared with the simple ethanol intervention group, the neuron HMGB1($P=0.001, 0.004$) transcription and protein levels after tBHQ intervention were significantly decreased. **Conclusion** Continuous

^{*} 基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1314404);国家自然科学基金面上项目(81871041);黑龙江省教育厅基本科研业务费人才培养项目(2019-KYYWF-1357)。 作者简介:李昕瞳(1990—),硕士,主要从事酒精依赖分子机制的研究。 △ 通信作者, E-mail:493133660@qq.com。

ethanol intake can activate the HMGB1/TLR4 pathway, and promote its downstream IL-1 β expression by inhibiting the NRF2 expression in the prefrontal lobe of mice.

[Key words] ethanol; prefrontal lobe; NRF2; HMGB1; inflammatory response

持续乙醇摄入会导致脑容量降低, 皮层神经元丢失, 其中以前额叶最明显^[1]; 同时还会导致多种神经病理病变, 如认知功能损伤、痴呆等^[2]。在这一过程中, 炎性反应发挥重要作用; 在分子水平, 持续乙醇摄入能够增加脑皮质神经元促炎因子高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 表达, 并通过 HMGB1/TLR4 (Toll-like receptor 4) 途径, 促进炎性因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 的表达^[2-3]; 但目前持续乙醇摄入活化 HMGB1 通路及其下游炎性反应的分子机制尚不清楚。

在持续乙醇摄入诱导的炎性反应中, 抗氧化通路发挥重要作用, 同时, 调节抗氧化通路活性, 能够缓解乙醇摄入所至的脑损伤^[2]。课题组前期研究证实, 核因子 E2 相关因子 2 (NRF2) 广泛参与抗氧化应激反应及脑保护过程^[4]; 研究已证实, NRF2 通路参与 HMGB1 通路及炎性因子的表达调控过程^[5-7]; 但目前, 尚缺乏 NRF2 在乙醇摄入相关疾病中的研究。

在脑功能调节过程中, 前额叶通过其丰富的皮层间及皮层下联络结构^[8], 参与思维、情绪、行为等多种高级脑机能的调控过程。同时, 前额叶与抑郁障碍、精神分裂等多种神经精神疾病密切相关。酗酒人群前额叶脑容量降低最为严重, 是乙醇敏感至伤脑区之一^[1]。因此, 本课题在既往研究的基础上, 构建持续乙醇摄入小鼠模型, 观察持续乙醇摄入对模型小鼠前额叶炎性反应、HMGB1 通路及 NRF2 通路的影响; 并进一步干预模型小鼠 NRF2 的表达, 分析 NRF2 通路在持续乙醇摄入小鼠前额叶 HMGB1 通路及炎性反应活化中的作用; 为持续乙醇摄入导致脑损伤机制的阐述提供实验依据, 并为 NRF2 通路相关药物在乙醇摄入相关疾病中的应用提供理论支持。

1 资料与方法

1.1 实验试剂

TRIzol 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix 与扩增试剂盒 SYBR Premix Ex Taq II 购自日本 TaKaRa 公司; 神经细胞培养所用 Neurobasal、B27、双抗 (P/S)、L-Glutamine 均购自美国 Gibco 公司。NRF2 通路特异激动剂特丁基对苯二酚 (tBHQ) 购自美国 Selleck 公司; HMGB1、NRF2、HO-1、 β -actin 抗体购自英国 Abcam 公司; 蛋白裂解液 RIPA、苯基磺酰氟 (PMSF)、蛋白酶抑制剂均购自碧云天公司, 其余试剂购自上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 持续乙醇摄入动物模型制备

所用 8 周昆明雄性小鼠均来源于佳木斯大学实验动物中心; 针对实验动物的所有操作均符合 NIH: 80-23 标准, 并经佳木斯大学伦理委员会批准。乙醇

干预模型采用腹腔注射法建模: 乙醇用无菌 PBS 稀释 (20% v/v), 以 2.0 g/kg 对小鼠进行腹腔注射, 每天 1 次, 持续 7 d; 对照组以无菌 PBS 代替进行注射。

1.2.2 模型干预及分组

为了明确 NRF2 通路在乙醇摄入活化 HMGB1 通路及炎性反应中的作用, 本实验在证实持续乙醇摄入能够抑制模型小鼠前额叶 NRF2 通路基因表达的前提下, 选用 tBHQ 干预模型小鼠, 并检测其对模型小鼠前额叶 HMGB1 通路及炎性反应的影响; 动物实验分为 3 组: 对照组, 乙醇干预组, tBHQ 组 (乙醇 + tBHQ 组); tBHQ 组在乙醇腹腔注射后, 立即给予腹腔注射 NRF2 激动剂 tBHQ, 剂量为 16.7 mg/kg^[9]。并选择与乙醇摄入密切相关的炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 及其上游 HMGB1 通路相关基因 HMGB1、TLR2、TLR3、TLR4 进行检测, 观察小鼠前额叶炎性基因 mRNA 表达变化。

1.2.3 原代神经元培养、鉴定及干预

为了进一步验证持续乙醇摄入通过抑制 NRF2 通路, 进而激活 HMGB1 通路并促进其下游炎性反应这一结果, 本实验在体内实验结果基础上, 选用无血清培养法, 应用新生 1~4 d 内昆明乳鼠皮层进行原代神经元培养, 培养至第 7 天进行实验干预^[10]; 神经元完全培养液: Neurobasal、B27、双抗 (P/S)、L-Glutamine^[11]。细胞实验分为 3 组: 对照组 (PBS 组), 乙醇干预组, tBHQ 组 (乙醇 + tBHQ 组); 于培养第 7 天, 除对照组外, 各组均加入乙醇进行干预 (75 mmol/L)^[12]; tBHQ 组加入 tBHQ (40 ng/mL); 干预 24 h 后进行检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测

选用 TRIzol 法提取前额叶及神经元总 RNA, 选用逆转录试剂盒逆转录样本 mRNA; 选用嵌合荧光法扩增试剂盒, 以两步法扩增 cDNA; 检测结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分进行统计分析。本实验所用引物均由上海生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。样本 mRNA 逆转录反应条件: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 降温后取出保存。样本 cDNA 扩增标准程序: 预变性, 95 °C 30 s; 扩增, 95 °C 5 s; 60 °C 30 s, 循环 40 次; 融解, 95 °C 5 s, 60 °C 60 s, 1 个循环; 降温, 50 °C 30 s。引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 检测

应用裂解液 (RIPA + PMSF + 蛋白酶抑制剂) 及研磨介质破碎组织, 4 °C 12 000 r/min 离心 5 min 后吸取上清液; 应用 BCA 法检测样本蛋白浓度; 而后经电泳、转膜、封闭、一抗孵育 (HMGB1 1 : 8 000、HO-1 1 : 1 500、NRF2 1 : 500、 β -actin 1 : 5000)、洗膜、二抗孵育、洗膜、显影, 并获取灰度值进行各蛋白表达水平的统计分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS21.0 软件进行统计处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式显示,两组比较选用 Student's *t* 检验;多组比较选用 one-way ANOVA,多组组内比较选用 LSD post-hoc 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列		
基因名称	方向	寡核苷酸序列(5'-3')
TLR2	正向	TGCTTTCCTGCTGAAGATTT
	反向	TGTACCGCAACAGCTTCAGG
TLR3	正向	TTGTCTTCTGCACGAACCTG
	反向	GGCAACGCAAGGATTTTATT
TLR4	正向	ACCTGGCTGGTTTACACGTC
	反向	GTGCCAGAGACATTGCAGAA
HMGB1	正向	CCATTGGTGATGTTGCAAAG
	反向	CTTTTTCGCTGCATCAGGTT
NRF2	正向	TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT
	反向	GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC
HO-1	正向	AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA
	反向	GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA
TNF- α	正向	GACGTGGAAGTGCAGAAGAG
	反向	TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG
IL-1 β	正向	GCAACTGTTCTGAACTCAACT
	反向	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
β -actin	正向	GTATGACTCCACTCACGGCAAA
	反向	GGTCTCGCTCCTGGAAGATG

2 结 果

2.1 持续乙醇摄入对模型小鼠前额叶炎性反应及 HMGB1 通路的影响

与对照组相比,乙醇干预组小鼠前额叶炎性因子 TNF- α ($P=0.015$)、IL-1 β ($P=0.017$) mRNA 相对表达水平升高(图 1);其上游 HMGB1 通路相关基因 HMGB1 ($P=0.004$)、TLR3 ($P=0.030$)、TLR4 ($P=0.004$) mRNA 表达升高,但 TLR2 ($P=0.071$) 表达无明显变化,见图 1。

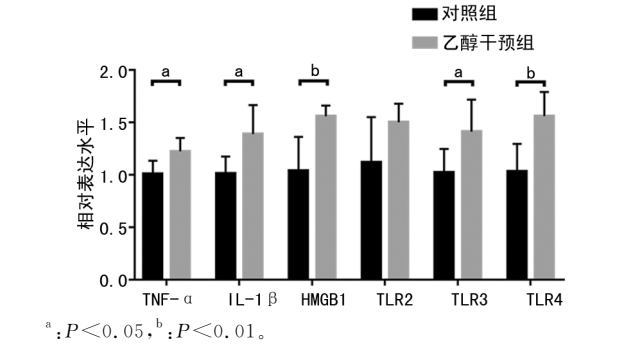


图 1 持续乙醇摄入对模型小鼠前额叶炎性反应及 HMGB1 通路的影响

2.2 持续乙醇摄入对模型小鼠前额叶 NRF2 通路的影响

为了分析持续乙醇摄入促进炎性反应的分子机制,本实验进一步分析了与炎性反应相关的 NRF2 通路基因在模型小鼠前额叶表达的变化,结果显示:与对照组相比,乙醇干预组小鼠前额叶 NRF2 ($P=0.014$) 及其下游血红素氧合酶(HO-1) mRNA 及蛋白相对表达水平均降低($P=0.030, 0.012$),见图 2。

2.3 激活 NRF2 通路对持续乙醇摄入模型小鼠前额

叶炎性反应及 HMGB1 通路的影响

在对炎性反应基因表达检测中发现:与乙醇干预组小鼠比较,tBHQ 组小鼠前额叶 TNF- α mRNA ($P=0.305$)的表达并无影响;但 tBHQ 组 IL-1 β mRNA 较乙醇干预组($P=0.003$)的相对表达水平降低,同时,tBHQ 组与对照组比较差异无统计学意义($P=0.540$)。在对 HMGB1 通路的检测中发现,与乙醇干预组小鼠比较,tBHQ 组小鼠前额叶 TLR3 mRNA 的表达并无影响($P=0.679$),但 tBHQ 组 HMGB1 ($P=0.000$)、TLR4 ($P=0.015$) mRNA 的相对表达水平及 HMGB1 ($P=0.043$)蛋白相对表达水平均降低;同时,tBHQ 组以上 HMGB1 通路相关基因和蛋白与对照组比较差异均无统计学意义($P=0.642$),见图 3。

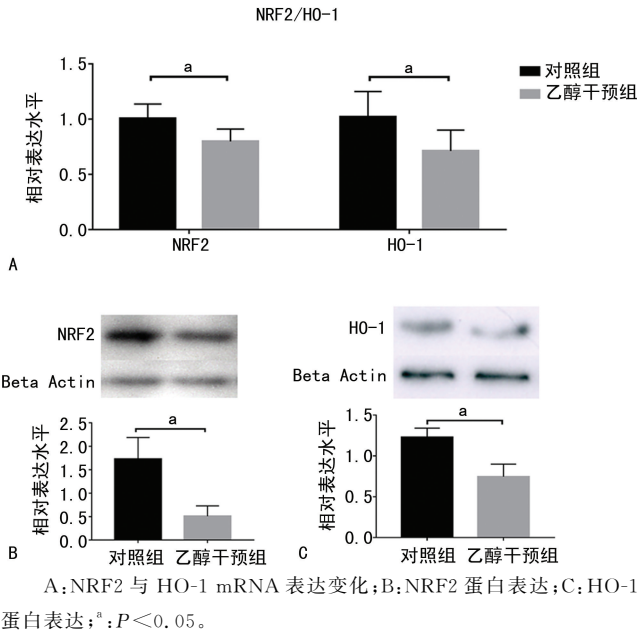


图 2 持续乙醇摄入对模型小鼠前额叶 NRF2 通路的影响

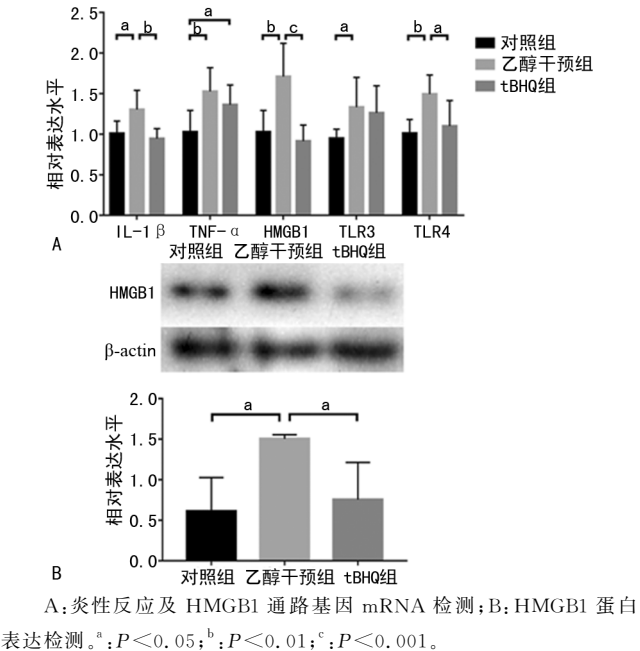


图 3 NRF2 通路激活对持续乙醇摄入模型小鼠前额叶炎性反应及 HMGB1 通路的影响

2.4 激活 NRF2 通路对乙醇干预后神经元 HMGB1 表达的影响

在体内实验结果基础上,构建了乙醇干预神经元细胞模型,应用 MAP2 标记神经元轴突,对原代培养神经元进行鉴定(图 4C、D、E);并检测 NRF2 通路激动剂对乙醇干预神经元 HMGB1 mRNA 及蛋白相对表达水平的影响;结果显示,与对照组相比,乙醇干预

后神经元 HMGB1 mRNA($P=0.000$,图 4A)及蛋白相对表达水平($P=0.006$,图 4B)明显升高;与乙醇干预组相比,tBHQ 组神经元 HMGB1 mRNA($P=0.001$,图 4A)及蛋白相对表达水平($P=0.004$,图 4B)明显下降,tBHQ 组与对照组比较差异无统计学意义(图 4A、B)。

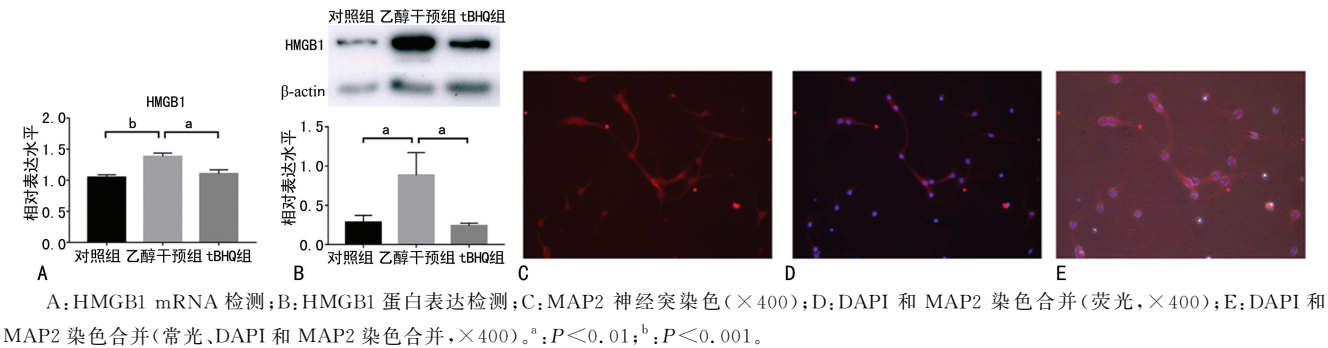


图 4 NRF2 通路激活对乙醇干预后神经元 HMGB1 表达的影响

3 讨论

炎症反应在乙醇摄入相关疾病中发挥重要作用。既往研究显示,持续乙醇摄入能够促进模型小鼠脑小胶质细胞活化,增加炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 MCP-1 的表达^[13];在本实验中也发现,持续乙醇摄入能够增加模型小鼠前额叶炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 相对表达水平,这一结果与既往研究结果相一致,进一步证实,持续乙醇摄入能够促进脑组织炎症反应发生。后续研究发现,酒精性脑损伤炎症因子的表达受 HMGB1 通路调控。HMGB1 是一种主要由神经元分泌的内源性细胞因子;通过与炎症细胞 TLRs 受体结合,参与炎症基因表达的调控^[14-15];研究显示,HMGB1 及其受体 TLR2、TLR3 和 TLR4 在酗酒人群及持续乙醇摄入大鼠模型内嗅皮层表达升高^[16];同时,乙醇诱导 HMGB1 表达升高能够促进炎症因子如 IL-1 β 表达^[3,16];在本实验中也发现,持续乙醇摄入能够增加模型小鼠前额叶 HMGB1 及其受体 TLR3 和 TLR4 的表达,这一结果进一步说明,持续乙醇摄入能够促进 HMGB1 表达,进而调节炎症反应活性。

既往研究显示,持续乙醇摄入能够增加脑内氮氧化物 (NOX) 表达,促进活性氧 (ROS) 的生成,进而促进氧化应激反应^[2];这一结果说明,氧化及抗氧化通路在酒精性脑损伤过程中发挥重要作用。NRF2 通路是内源性抗氧化应答通路之一,通过与抗氧化元件 ARE 结合调节抗氧化酶分泌,发挥抗氧化应激作用^[17]。进一步研究指出,促进 NRF2 表达能够抑制小鼠小胶质细胞炎症因子如 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达^[5];在脑出血模型中,激活 NRF2 通路能够抑制 IL-1 β 的表达^[6];这一结果说明,NRF2 通路参与炎症因子表达的调节过程。同时,在炎症疾病中,激活 NRF2/HO-1 通路能够抑制 HMGB1 的表达^[7];这一结果说明,NRF2 通路能够通过抑制 HMGB1 通路调

节炎症因子的表达。但目前,尚缺乏 NRF2 在乙醇摄入相关疾病中的研究。

在本实验中发现,持续乙醇摄入小鼠前额叶 NRF2 和 HO-1 mRNA 及蛋白相对表达水平均降低,提示持续乙醇摄入能够抑制小鼠前额叶 NRF2 通路活性,同时,这一结果与 HMGB1 通路及炎症因子在模型前额叶表达升高相吻合。这一结果说明,NRF2 通路可能参与了持续乙醇摄入活化 HMGB1 通路及炎症反应的过程。为了进一步说明 NRF2 通路在这一过程中的作用,课题选用 NRF2 通路激动剂干预乙醇摄入动物及细胞模型,结果显示,NRF2 通路激动剂能够完全逆转持续乙醇摄入引起的前额叶 HMGB1 mRNA 及蛋白相对表达水平升高以及神经元 HMGB1 mRNA 及蛋白相对表达水平升高,体内体外结果相一致。这一结果说明,NRF2 通路激动剂能够抑制模型小鼠前额叶 HMGB1 的表达;同时也说明持续乙醇摄入能够通过抑制 NRF2 通路进而激活 HMGB1 通路。

在对 HMGB1 受体表达的分析发现,NRF2 通路激动剂能够完全逆转持续乙醇摄入引起的前额叶 TLR4 转录水平升高,但对 TLR3 的表达并无显著影响;这一结果提示,激活 NRF2 通路能够抑制 HMGB1/TLR4 途径而非 HMGB1/TLR3 途径;同时,在对炎症因子表达分析也发现,NRF2 通路激动剂能够完全逆转持续乙醇摄入引起的前额叶 IL-1 β 转录水平升高,但 TNF- α 的表达并不受影响。既往研究显示,在乙醇摄入炎症反应过程中,TNF- α 的表达与 NLRP3/ASC 炎症体表达密切相关^[18];结合本实验结果提示,在持续乙醇摄入模型中,TNF- α 表达升高并非经由 NRF2/HMGB1 途径,而可能经由炎症旁支途径如调节 NLRP3/ASC 炎症体表达实现的。同时,以上结果也说明,持续乙醇摄入能够通过抑制 NRF2 通路进而激活 HMGB1/TLR4 通路,促进其下游 IL-1 β

表达,进而促进炎症反应的发生。

本实验证实持续乙醇摄入能够通过 NRF2 通路调节 HMGB1 表达,但对于 NRF2 调节 HMGB1 表达的机制尚不清楚;既往研究证实,组蛋白去乙酰化酶(HDAC)参与乙醇对神经元 HMGB1 表达的调控过程,但 HDAC 在 NRF2 通路调节 HMGB1 表达过程中的作用尚不明确,仍需进一步分析^[3]。

综上所述,持续乙醇摄入能够抑制小鼠前额叶 NRF2 通路活性;并通过抑制 NRF2 通路进而激活 HMGB1/TLR4 通路,促进其下游 IL-1 β 表达。相关研究可为乙醇摄入相关疾病机制的阐述提供理论基础。

参考文献

- [1] CREWS F T, VETRENO R P. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2014, 118: 315-357.
- [2] QIN L, CREWS F T. NADPH oxidase and reactive Oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9: 5.
- [3] JY Z, CREWS F T. Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e87915.
- [4] 孙光涛, 戚询中, 邹春颖, 等. 基于 Nrf2-ARE 信号通路探析己酮可可碱对癫痫大鼠脑内氧化应激的影响[J]. *医学研究生学报*, 2020, 33(2): 144-148.
- [5] LEE D S, KWON K H, CHEONG S H. Taurine chloramine suppresses LPS-Induced neuroinflammatory responses through Nrf2-Mediated Heme oxygenase-1 expression in mouse BV2 microglial cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 975(Pt 1): 131-143.
- [6] SUKUMARI-RAMESH S, ALLEYNE C J. Post-Injury administration of tert-butylhydroquinone attenuates acute neurological injury after intracerebral hemorrhage in mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 58(4): 525-531.
- [7] YANG S, LEE W, LEE B S, et al. Aloin reduces HMGB1-Mediated septic responses and improves survival in septic mice by activation of the SIRT1 and PI3K/Nrf2/HO-1 signaling axis[J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(3): 613-633.
- [8] SAKURAI Y, SUGIMOTO S. Effects of lesions of prefrontal cortex and dorsomedial thalamus on delayed go/no-go alternation in rats[J]. *Behav Brain Res*, 1985, 17(3): 213-219.
- [9] LU X Y, WANG H D, XU J G, et al. Pretreatment with tert-butylhydroquinone attenuates cerebral oxidative stress in mice after traumatic brain injury[J]. *J Surg Res*, 2014, 188(1): 206-212.
- [10] QI X, WANG G, ZHONG X, et al. Sema3A - mediated modulation of NR1D1 expression May be involved in the regulation of axonal guidance signaling by the microbiota[J]. *Life Sci*, 2019, 223: 54-61.
- [11] BEAUDOIN G M 3RD, LEE S H, SINGH D, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(9): 1741-1754.
- [12] WILHELM C J, HASHIMOTO J G, ROBERTS M L, et al. Plasminogen activator system homeostasis and its dysregulation by ethanol in astrocyte cultures and the developing brain[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 138: 193-209.
- [13] QIN L, HE J, HANES R N, et al. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment[J]. *J Neuroinflammation*, 2008, 5: 10.
- [14] LI G, LIANG X, LOTZE M T. HMGB1: the central cytokine for all lymphoid cells [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 68.
- [15] YANG H, ANTOINE D J, ANDERSSON U, et al. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 93(6): 865-873.
- [16] CREWS F T, QIN L, SHEEDY D, et al. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(7): 602-612.
- [17] SANGHVI V R, LEIBOLD J, MINA M, et al. The oncogenic action of NRF2 depends on deglycation by fructosamine-3-Kinase [J]. *Cell*, 2019, 178(4): 807-819, e21.
- [18] LIPPAI D, BALA S, PETRASEK J, et al. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation[J]. *J Leukoc Biol*, 2013, 94(1): 171-182.