

酒精对雄鼠精液质量及植入前胚胎全基因组DNA甲基化的影响

黄继昌¹ 王彩红¹ 刘勇^{2,3} 吴风瑞^{2,3} 李文雍³ 王荣^{2*}

(¹安徽大学生命科学学院, 合肥 230601; ²阜阳师范学院生命科学学院, 阜阳 236037;

³胚胎发育与生殖调节安徽省重点实验室, 阜阳 236037)

摘要 采用HE染色法、精子活力与形态学分析技术以及免疫荧光技术分别检测酒精对小鼠肝组织、精子的活力及形态、精子和植入前各时期胚胎的DNA甲基化的影响。HE染色结果表明, 与对照组(生理盐水处理45 d)相比, 实验组I(20%酒精灌胃30 d, 生理盐水处理15 d)及实验组II(20%酒精灌胃45 d)小鼠肝脏出现不同程度的损害; 精子活力与形态学分析发现, 与对照组相比, 实验组I和II精子活力明显降低, 但实验组I精子活力高于实验组II, 且对照组的精子正常形态精子率高于实验组I和II; 免疫荧光结果显示, 实验组精子DNA甲基化水平低于对照组, 并且实验组I高于实验组II; 植入前胚胎的2-细胞、4-细胞期, 对照组DNA甲基化水平明显高于实验组, 且实验组I高于实验组II, 8-细胞期以后, 对照组与实验组I无显著性差异, 而实验组II却在8-细胞和桑椹胚期低于对照组, 到囊胚期, 对照组与实验组均无明显差异。酒精对雄鼠精子的破坏作用可能是导致植入前胚胎表观遗传异常的直接原因, 且停止酒精摄入后可在一定程度上缓解其带来的一些不利影响。

关键词 酒精; 胚胎发育; 精液质量; DNA甲基化; 灌胃; 小鼠

Chronic Alcohol Ingestion Influences Sperm Semen Quality and Global DNA Methylation in Pre-implantation Embryos

Huang Jichang¹, Wang Caihong¹, Liu Yong^{2,3}, Wu Fengrui^{2,3}, Li Wenyong³, Wang Rong^{2*}

(¹School of Life Science, Anhui University, Hefei 230601, China; ²School of Life Science, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037, China; ³Key Laboratory of Embryo Development and Reproductive Regulation in Anhui, Fuyang 236037, China)

Abstract Hematoxylin-eosin staining, sperm motility and morphology analysis technology, immunofluorescence technique were used to investigate adverse effects of alcohol on hepatic tissue of mice, semen quality, genome-wide DNA methylation of sperm and pre-implantation embryos from different groups. HE staining results indicated that in this experiment, different degree of damage in liver were detected from treatment group I with a gastric injection with 4~5 g/kg modified alcohol solution for 30 d and treatment group II with injection for 45 d. The measurement of sperm motility results suggested that the main parameters were associated with a significantly reduction in treatment group I and II, meanwhile treatment group I was significantly greater than treatment

收稿日期: 2013-05-15 接受日期: 2013-07-15

国家自然科学基金(批准号: 31201789、31071310)、安徽大学研究生学术创新研究项目(批准号: 01001770--10117700136)、安徽高校省级自然科学研究重点项目(批准号: KJ2011A209)和安徽省自然科学基金面上项目(批准号: 1308085MC39)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0558-2593601, E-mail: wangrbnu@yahoo.com.cn

Received: May 15, 2013 Accepted: July 15, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201789, 31071310), Anhui University Graduate Academic Innovation Research Project (Grant No.01001770--10117700136), Anhui Provincial Key Projects of Science Research in Colleges and Universities (Grant No.KJ2011A209), and Anhui Province Natural Science Fund Projects (Grant No.1308085MC39)

*Corresponding author. Tel: +86-558-2593601; E-mail: wangrbnu@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2013-07-18 16:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130718.1606.003.html>

group II. There were significant decreases in the rate of normal sperms morphology in treatment groups. Mice in chronic alcohol ingestion had a significant decrease in semi-quantification of genome-wide DNA methylation levels, compared with the animal without treatment, and treatment group I was significantly greater than treatment group II. In 2-cell and 4-cell stage of preimplantation embryo, DNA methylation level in the control was significantly greater than the treatment groups, and treatment group I was significantly higher than treatment group II. After 8-cell stage, there was no significant difference between treatment group I and control, but treatment group II significantly lower than control from stages of 8-cell and morula. In the period of blastocyst, no obvious difference was found between each other. Taken together, our results suggested that alcohol on male mice sperm damage may be the direct reason of epigenetic abnormalities in mice pre-implantation embryo, and stopping alcohol intake could alleviate some of its negative effects.

Key words alcohol; embryo development; semen quality; DNA methylation; gastric injection; mice

近年来, 男性不育呈上升趋势。研究表明, 有害的环境因素可干扰生殖细胞的发生。在众多的因素中, 酒精是损害细胞和健康的重要因素之一^[1-3]。动物毒理实验为有害物与精液质量之间的关联提供了初步证据^[4]。酒精进入体内后, 约90%在肝脏氧化成乙醛, 乙醛是一种高毒性化合物, 不能及时充分代谢, 可干扰细胞多方面的功能。目前, 酒精对哺乳动物细胞及组织的影响, 已引起国内外学者的广泛关注^[3-6]。如, 酒精的毒性可使乙醛积聚, 乙醛抑制睾酮合成而影响睾酮的合成, 睾酮减少能抑制精子发生^[5,7]。精子活力参数与形态学参数临床两大指标常用于诊断精子正常与否, 以衡量环境因素的影响。而慢性酒精摄入还可导致明显的生殖系统改变^[6,8], 但是否影响精液质量还有待研究。

此外, 即使精子被检测的参数正常, 仍然可能造成不育^[9], 这就给科研工作者带来疑惑。随着表观遗传修饰研究的发展, 为我们深入研究酒精对精子的影响提供了新的思路, 表观遗传修饰主要有: DNA甲基化修饰、组蛋白修饰及RNA干扰等。其中, DNA甲基化修饰是表观遗传修饰中研究最为深入的一种机制, 它是通过DNA甲基转移酶催化, 以5-腺苷甲硫氨酸为甲基供体, 将胞嘧啶转化为5-甲基胞嘧啶的过程。研究表明, 酒精能够影响甲硫氨酸合成酶与腺苷转移酶的活性, 干扰蛋氨酸代谢, 从而影响甲基供体^[10-11]。越来越多的研究发现, 长期的酒精摄入, 会导致哺乳动物各组织的DNA甲基化模式发生改变^[12-15]。目前, 许多国内外研究表明, 男性不育与精子的DNA甲基化之间存在着密切的关系^[16], 如少精症人群的精子会出现甲基化异常, 且精子的质量越差, DNA甲基化差异越大。我们课题组最近研究发现, 环境因素等对植入前胚胎的正常表观遗传的建立至关重要^[17]; 还有研究显示, 双亲的DNA甲基化模式在哺乳动物发

育中具有重要作用^[18], 双亲的DNA甲基化发生异常, 则可能导致胎儿发育的异常^[16], 严重的可能致死^[19]。本实验拟通过表观遗传变化, 分析酒精对生殖系统及植入前各时期胚胎造成表观遗传的损害, 以进一步评估环境因素对精子的影响提供一种新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性昆明白小鼠(合肥安徽医科大学实验动物中心), 3~4周龄。饲养温度(23 ± 2) °C, 光照时间14 h(8:00~22:00), 自由采食, 饮水。适应一周后, 选取体重(30 ± 2) g的小鼠备用。

1.1.2 试剂及仪器 孕马血清激素和人绒毛膜促性腺激素购自宁波第二激素厂; 5-甲基胞嘧啶抗体购自Epigentek Group Inc公司; 羊抗鼠IgG-FITC购自博奥森生物科技有限公司; 培养皿购自Corning公司; 其他试剂均来自Sigma公司。

体视显微镜(SMZ1500, Nikon, 日本), WLJY-9000伟力彩色精子质量分析系统(WLJY-9000, Wei-Li, 中国), 石蜡切片机(RM2235, Leica, 德国), 激光扫描共聚焦显微镜(TCS-SP5, Leica, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 小鼠通常作为研究酗酒的动物模型^[20-21], 许多对小鼠酒精摄入后的生理和行为学的研究发现^[22-23], 20%酒精(体重比4~5 g/kg)处理30 d或以上, 小鼠对酒精的生理和行为类似人类长期酗酒的行为特征, 故本实验采用20%的酒精(体重比4~5 g/kg)连续灌胃30 d及45 d。

实验动物随机分组如下: 对照组: 雄鼠(10只), 生理盐水(体重比4~5 g/kg)灌胃45 d, 期间自由采食, 饮水; 实验组I: 雄鼠(10只), 20%酒精(体重比4~5 g/kg)

灌胃30 d后,再用生理盐水(体重比4~5 g/kg)灌胃15 d,自由采食,饮水;实验组II:雄鼠(10只),灌胃20%酒精(体重比4~5 g/kg)45 d后,期间自由采食,饮水。

1.2.2 肝脏石蜡切片制作与组织病理学检测 选取雄性小鼠肝脏的一小块组织,使用10%甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝脏病理组织的变化。

1.2.3 精子运动参数测定与精子形态观察 雄鼠脱臼处死后分离左侧附睾,立即放入含有1 mL 0.9% 37 °C生理盐水中。30 min后吸取10 μ L精子悬液,均匀涂布于计数板上,WLJY-9000型精子质量检测系统测定。右侧附睾放入3 mL 0.9%的生理盐水中,剪碎吸取10 μ L精子悬液涂布于载玻片上。干燥后,甲醇处理15 min,2%的伊红水溶液染色1 h,自来水冲洗,干燥后形态学检测。

1.2.4 精子的收集及间接免疫荧光测定精子的甲基化水平 用PBS(含有0.1% PVA)充分清洗精子,离心3 min(1 000 r/min),去上清,重复三次。4%多聚甲醛固定1 h,0.2% TritonX-100的PBS室温下通透30 min,2 mol/L HCl处理30 min,0.1 mol/L Tris/HCl溶液中和10 min,2% BSA的PBS封闭2 h后,1:100稀释的抗5-甲基胞嘧啶抗体(Epigentek Group Inc)室温下孵育过夜。1:100稀释的二抗室温孵育4 h,10 μ g/mL PI(碘化丙啶)染色10 min,制片观察。

1.2.5 体内各期植入前胚胎的获取及间接免疫荧光测定各时期胚胎的甲基化水平 选取状态良好的雌鼠腹腔注射10 IU PMSG,48 h后注射10 IU hCG。将注射hCG后的雌鼠按照1:1与各组雄鼠合笼。次日检查见栓情况,见栓即假定雌鼠受孕。假定合笼当晚12:00为受精时间,分别于受精后30,48,60,72,88 h收集2-细胞,4-细胞,8-细胞胚胎及桑椹胚、囊胚。各期体内植入前胚胎用PBS充分清洗,0.5%链蛋白酶去除透明带,多聚甲醛固定至最后抗体孵

育后PI染色制片观察,整个处理过程同精子的处理方法相同(胚胎无离心处理)。

1.3 数据统计分析

用激光共聚焦显微镜自带软件LAS AF Lite和Image Pro-Plus对不同区域的荧光强度进行分析。每组样品重复3次,每次至少20枚精子和胚胎。Image-Pro Plus转换荧光数据,相对荧光分析方法参照文献^[24],荧光数据转换可参阅文献^[25]。采用SPSS 12.0单因素方差分析(one-way ANOVA),LSD做两两比较。

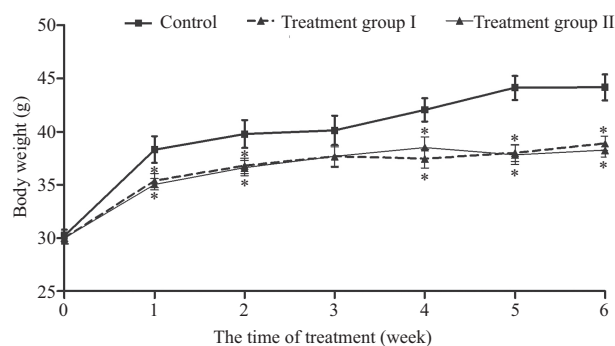
2 结果

2.1 酒精对小鼠体重的影响

长期酒精摄入对小鼠的体重影响(图1),除第三周外,其他各期实验组小鼠体重均低于对照组($P<0.05$)。在各个时期中,实验组I与实验组II之间差异不显著($P>0.05$)。

2.2 肝脏的组织病理学检测

对肝脏组织的石蜡切片进行HE染色后,在显微镜下观察(图2)。结果如下:对照组肝细胞核呈圆型,



各组小鼠体重每周进行一次称量,连续持续六周。* $P<0.05$,与对照组相比。

Different groups mice were measured in 1, 2, 3, 4, 5, 6 week respectively after the experiment. * $P<0.05$ compared with control.

图1 不同组雄性小鼠的各时期体重变化

Fig.1 Different body weight in different group of male mice



A: 对照组; B: 实验组I; C: 实验组II。箭头所指为病变部位。

A: control; B: treatment group I; C: treatment group II. Arrows are the lesion site.

图2 病理镜下肝组织观察(400 $\times$)

Fig.2 Pathological observation of liver tissue (400 $\times$)

表1 酒精对小鼠精子运动参数的影响(mean±S.D.)

Table 1 Effects of alcohol on sperm motility of mice (mean±S.D.)

精子运动参数 Sperm motility parameters	对照组 Control	实验组I Treatment group I	实验组 II Treatment group II
VCL(μm/s)	47.73±2.37	42.05±3.87*	36.28±6.37* ^Δ
VSL(μm/s)	21.53±1.06	19.94±1.28*	14.78±3.01* ^Δ
VAP(μm/s)	27.33±0.66	22.60±3.58*	19.22±4.27*
MAD(°)	84.37±2.44	78.58±2.76*	68.48±5.44* ^Δ
Density of spermatozoa(×10 ⁶ /mL)	5.17±0.74	4.04±0.77*	3.13±0.56* ^Δ
Motility rate of sperm(%)	89.12±4.31	78.39±3.50*	69.67±5.97* ^Δ
BCF(Hz)	3.99±0.23	3.88±0.17	4.17±0.37
STR(%)	75.24±1.43	72.70±3.16*	70.74±2.12*

VCL、VSL、VAP、MAD、BCF、STR是曲线速度、直线速度、平均路径速度、平均移动角度、鞭打频率、向前。* $P<0.05$, 与对照组比较; ^Δ $P<0.05$, 与实验组I比较。

VCL, VSL, VAP, MAD, BCF, and STR are curvilinear velocity, straight-line velocity, path velocity, mean angular deviation, beat cross frequency, and straightness. * $P<0.05$ compared with control; ^Δ $P<0.05$ compared with treatment group I.

染色质均匀, 细胞排列整齐, 无变性坏死, 未见炎性细胞浸润; 实验组I和II肝细胞高度水肿, 细胞间疏松、淡染, 并可见气球样变, 肝细胞小泡性脂肪变性, 偶见大泡性脂肪变性, 局部坏死, 部分区域炎症细胞浸润。

2.3 精子运动参数测定

实验组I与II, 曲线速度、直线速度、平均移动

角度、精子密度和精子的活动率五项指标均明显低于对照组($P<0.05$)。平均路径速度与顶体比两项指标, 实验组I、II均低于对照组($P<0.05$), 但两者之间差异不显著, 其余指标差异无统计学意义(表1)。

2.4 精子的形态学检测

形态学参数中正常形态精子率, 实验组I与II均

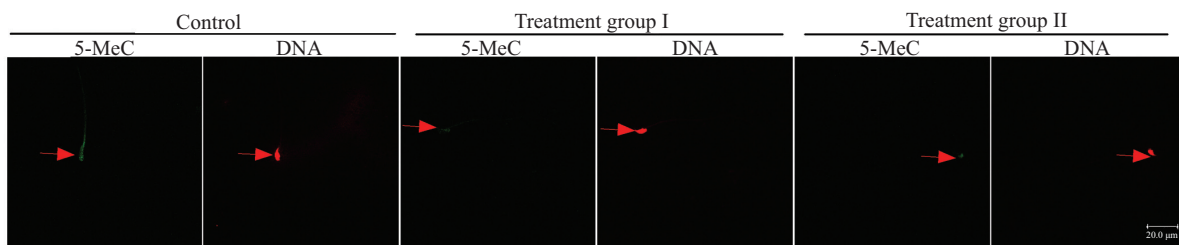
表2 不同组小鼠精子形态学的对比(mean±S.D.)

Table 2 Comparison of sperm morphology among different groups of mice (mean±S.D.)

形态学参数 Morphology parameters	对照组 Control	实验组I Treatment group I	实验组 II Treatment group II
Rate of normal sperms morphology(%)	34.54±3.15	28.79±3.43*	26.06±4.92*
Head length(μm)	7.35±0.22	7.28±0.36	6.99±0.32
Head width(μm)	2.23±0.19	2.19±0.21	2.04±0.13*
Head area(μm ²)	12.23±0.28	12.09±0.21	12.02±0.29
Head circumference(μm)	17.34±0.51	16.94±0.66	16.69±0.62*
Ratio of acrosome(%)	34.51±1.13	34.15±0.94	34.41±1.56

^Δ $P<0.05$, 与对照组比较。

* $P<0.05$ compared with control group.

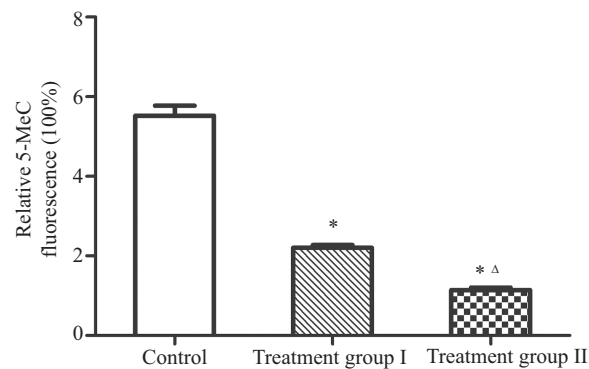


精子由针对DNA上的5-甲基胞嘧啶的特异性抗体免疫荧光, 绿色(左边); DNA, 红色(右边)。红色箭头所指为精子头部。标尺=20 μm。

Sperms were immunostained with specific antibodies against resistance to 5-methyl cytosine antibody (5-MeC in DNA), in green (left); DNA, in red (right). Red arrows are the head of sperms. Scale bar=20 μm.

图3 各组雄性小鼠精子全基因组DNA甲基化水平

Fig.3 Different global DNA methylation levels of sperms in male mice



实验组I、实验组II的精子核DNA甲基化的强度。不同柱形图和正偏差代表平均值±标准误差。* $P<0.05$, 与对照组相比; $\Delta P<0.05$, 与实验组I相比。Total nuclear DNA methylation intensities in sperms come from the control and alcohol groups. The columns and bars represent mean±S.E.M.. * $P<0.05$ compared with control; $\Delta P<0.05$ compared with treatment group I.

图4 各组精子全基因组甲基化的半定量分析

Fig.4 Semi-quantification of genome-wide DNA methylation levels of sperms

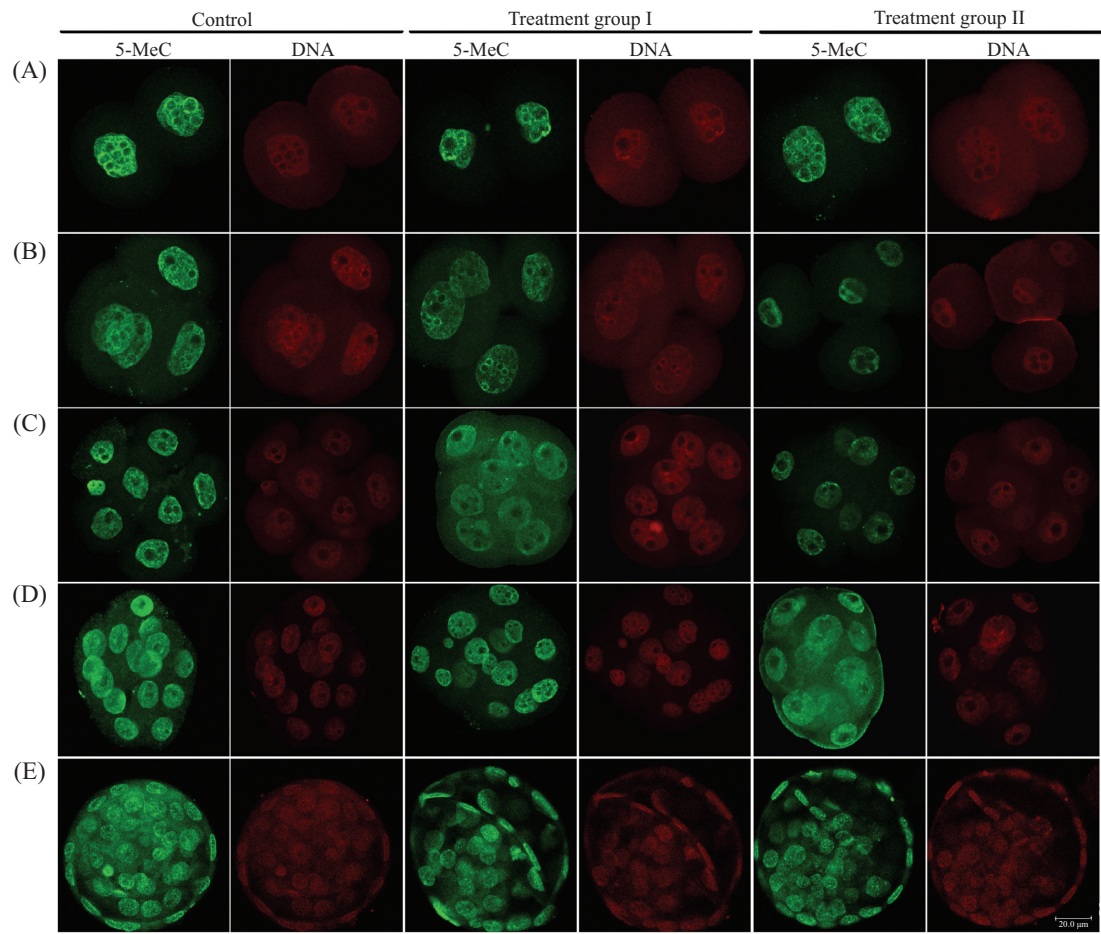
明显低于对照组($P<0.05$)。头部宽度与头部面积, 实验组II均小于对照组。其他指标三者之间差异不显著(表2)。

2.5 间接免疫荧光检测精子全基因组DNA甲基化

用间接免疫荧光法检测精子全基因组DNA甲基化水平(图3), 对不同区域的荧光强度进行分析(图4)。结果显示, 实验组I、II, 荧光值均明显低于对照组($P<0.05$), 且实验组I荧光值高于实验组II($P<0.05$)。

2.6 间接免疫荧光检测小鼠植入前各时期胚胎的全基因组DNA甲基化模式

我们将对照组体内囊胚的荧光强度设为1, 其他各组荧光强度均以体内囊胚荧光强度作为参照。检测结果显示, 各组小鼠体内受精植入前胚胎DNA甲基化水平从2-细胞期开始下降, 在4-细胞期达到最低, 随后DNA甲基化水平上升, 囊胚期达到最高



A~E分别代表2-细胞, 4-细胞, 8-细胞胚胎及桑椹胚、囊胚。DNA上的5-甲基胞嘧啶的特异性抗体免疫荧光, 绿色(左边); DNA, 红色(右边)。标尺=20 μm 。

A, B, C, D, E refers to 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst separately. Embryos were immunostained with specific antibodies against resistance to 5-methyl cytosine antibody (5-MeC in DNA), in green (left); DNA, in red (right). Scale bar=20 μm .

图5 各组不同发育时期胚胎的全基因组DNA免疫荧光

Fig.5 Global DNA methylation levels of embryos in different groups of mice

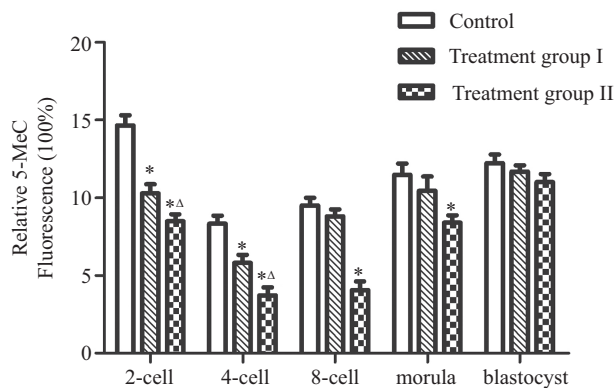


Image-Pro Plus 6.0软件量化来自对照组、实验组I、实验组II的各时期胚胎核DNA甲基化的强度。不同柱形图和正偏差代表平均值±标准误差。* $P<0.05$, 与对照组相比; ^ $P<0.05$, 与实验组I相比。

Total nuclear DNA methylation intensities in sperms from the control and alcohol groups quantified with the Image-Pro Plus 6.0 software. The columns and bars represent mean±S.E.M.. * $P<0.05$ compared with control; ^ $P<0.05$ compared with treatment group I.

图6 不同发育时期胚胎的全基因组DNA甲基化的半定量分析
Fig.6 Semi-quantification of genome-wide DNA methylation levels of preimplantation

(图5和图6)。图5、图6显示, 正常体内受精植入前胚胎2-细胞, 4-细胞期的DNA甲基化水平明显高于两实验组, 且实验组I高于实验组II($P<0.05$)。8-细胞期后, 正常组与实验组I无显著性差异($P>0.05$), 而实验组II却在8-细胞和桑椹胚期低于正常组($P<0.05$); 囊胚时期, 正常组与实验组均无明显差异。

3 讨论

对实验组的雄鼠各时期体重的变化的观察结果表明, 长期酒精摄入影响雄鼠的生长发育; 肝脏是重要的代谢器官, 肝脏组织的石蜡切片观察表明, 酒精对小鼠肝脏会造成一定程度的损害。这可能是由于酒精进入体内后, 约90%在肝脏被氧化成乙醛, 它是一种高毒性及高活性的化合物, 不能及时充分代谢, 可干扰肝细胞多方面的功能^[26]。

肝脏是乙醛的主要代谢场所, 酒精的毒性可使乙醛积聚, 乙醛通过抑制睾丸酶而影响睾酮的合成, 睾酮合成量减少能抑制精子发生^[7]。检测精液质量能进一步评估酒精对雄性小鼠生殖系统的不利影响。精子运动能力是精子结构与功能的综合体现, 运动能力的改变可作为衡量环境因素对雄性生殖功能影响的一项重要指标^[27]。实验组I与II, 曲线速度、直线速度、平均移动角度、精子密度和精子的活动率五项指标与正常组比较明显降低($P<0.05$), 同时实验

组I上述五项均高于实验组II, 说明酒精对小鼠精子的运动能力产生了一定的影响, 但停止灌酒后可减缓其所造成的伤害。精子的形态学为另一项衡量生殖毒性与环境有害因素所造成突变的一项重要指标。正常形态精子率是反映精子质量的指标, 连续30 d和45 d酒精活体灌胃对小鼠的精子具有致畸作用。以上实验表明酒精对小鼠的精液质量可造成不利的影响。

虽说精子运动参数与形态学特征是衡量精子质量的主要指标, 但即使是具有正常特征的精子, 若精子的DNA甲基化水平异常也会影响胚胎发育^[16]。越来越多的研究发现, 长期酒精的摄入可使各种组织的DNA甲基化模式发生改变^[12-15]。酒精雄性生殖细胞的影响的进一步研究表明, 长期酒精摄入能降低精子DNA甲基化水平, 且精子活力与正常形态率越低, 精子DNA甲基化水平越低, 暗示造成的伤害可能越大。产生这种结果可能与酒精影响甲硫氨酸合成酶与腺苷转移酶的活性, 从而干扰蛋氨酸代谢, 影响甲基供体^[10-11], 而DNA甲基化供体缺失可能与导致全基因组DNA甲基化水平的降低。

哺乳动物植入前胚胎的发育模式会受到多种因素的影响, 如精子质量、卵母细胞的质量以及环境影响^[9,17,28]。在正常体内胚胎中发现DNA甲基化若发生异常, 则可能导致胎儿发育的异常^[16], 严重可能致死^[9]。为了进一步研究长期酒精摄入对雄性精子DNA甲基化水平对早期胚胎发育的影响, 我们对植入前胚胎全基因组DNA甲基化进行免疫荧光检测。本实验结果表明, 对照组体内受精植入前胚胎从2-细胞期开始去甲基化, 4-细胞期后重新甲基化, 囊胚期达到最高, 与已有研究结果基本保持一致^[29], 酒精处理组植入前胚胎基因组甲基化程度与同期正常胚胎相比较, 2-细胞到4-细胞期, 实验组胚胎DNA甲基化水平明显要低; 8-细胞期和桑椹胚期, 实验组II低于正常组, 而实验组I较正常组并没表现出差异; 囊胚期实验组与正常组差异不明显。以上实验结果说明, 酒精会造成雄性精子DNA甲基化水平异常, 这可能是由酒精所致的DNA甲基化异常阻碍了这一生物学过程, 造成表观遗传模式异常, 进而造成植入前胚胎DNA甲基化异常, 并且由精子所致植入前胚胎表观遗传的异常主要发生在植入前的早期, 晚期如囊胚期可能是由于胚胎在雌性小鼠体内经历了DNA的去甲基化和再甲基化的过程, 酒精所致精子DNA甲基化的差异已逐步消除, 与此同时, 实验组

I与II的差异也进一步说明, 酒精摄入时间的长短所造成的损害不一。早期植入前胚胎表观遗传的正确建立对胚胎至关重要, 酒精所致的植入前胚胎的表观遗传的异常可能是胚胎发育异常的机制之一。对于酒精在机体内发挥其具体的机制还有待进一步的分析研究。

综上所述, 精液质量检测为我们衡量酒精对精子的损害提供初步证据, 酒精对精子正常表观遗传的破坏会造成早期植入前胚胎表观遗传模式的异常, 为研究不利环境所致不孕不育提供了一种鉴定手段及策略。至于酒精对生殖系统和生育能力所造成危害的具体机制还有待进一步系统的研究。

参考文献 (References)

- Ahmed-Landeryou MJ. Fetal central nervous system development and alcohol-the evidence so far. *Fetal Pediatr Pathol* 2012; 31(6): 349-59.
- Wang J, Zhang Y, Zhang H, Zhang K, Zhang Z, Li J. Toxic effects of fluoride on reproductive ability in male rats: Sperm motility, oxidative stress, cell cycle, and testicular apoptosis. *Fluoride* 2009; 42(3): 174-8.
- Laslett AM, Ferris J, Dietze P, Room R. Social demography of alcohol-related harm to children in Australia. *Addiction* 2012; 107(6): 1082-9.
- Muga R, Sanvisens A, Fuster D, Tor J, Martínez E, Pérez-Hoyos S, *et al.* Unhealthy alcohol use, HIV infection and risk of liver fibrosis in drug users with hepatitis C. *PLoS One* 2012; 7(10): e46810.
- 张高振, 吴红照, 方唯威, 张 郡, 申玲玲, 谭忠银, 等. 长期饮酒对小鼠生长发育及其睾丸功能的影响. *中国男科学杂志* (Zhang Gaozhen, Wu Hhongzhao, Fang Weiwei, Zhang Jun, Shen Lingling, Tan Zhongyin, *et al.* Effects of chronic ethanol intake on growth and testis functions in the mouse. *Natl J Androl*) 2008; 22(1): 3-6.
- Emanuele NV, LaPaglia N, Vogl W, Steiner J, Kirsteins L, Emanuele MA. Impact and reversibility of chronic ethanol feeding on the reproductive axis in the peripubertal male rat. *Endocrine* 1999; 11(3): 277-84.
- 何述莉. 酒精与生殖. *药理学进展* (He Shuli. Alcohol and reproduction. *Prog Pharm Sci*) 1988; 12(4): 232-3.
- Anderson RA, Willis BR, Oswald C. Spontaneous recovery from ethanol-induced male infertility. *Alcohol* 1985; 2(3): 479-84.
- Benchab M, Braun V, Ressenikof D, Lornage J, Durand P, Niveleau A, *et al.* Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005; 20(3): 768-73.
- Mason JB, Choi SW. Effects of alcohol on folate metabolism: Implications for carcinogenesis. *Alcohol* 2005; 35(3): 235-41.
- Schalinske KL, Nieman KM. Disruption of methyl group metabolism by ethanol. *Nutr Rev* 2005; 63(11): 387-91.
- Christensen BC, Kelsey KT, Zheng S, Houseman EA, Marsit CJ, Wrensch MR, *et al.* Breast cancer DNA methylation profiles are associated with tumor size and alcohol and folate intake. *PLoS Genet* 2010; 6(7): e1001043.
- Lambert MP, Paliwal A, Vaissière T, Chemin I, Zoulim F, Tomasino M, *et al.* Aberrant DNA methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with HBV and HCV infection and alcohol intake. *J Hepatol* 2011; 54(4): 705-15.
- Taqi MM, Bazov I, Watanabe H, Sheedy D, Harper C, Alkass K, *et al.* Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: Elevated methylation in the brain of human alcoholics. *Addict Biol* 2011; 16(3): 499-509.
- Zhou FC, Balaraman Y, Teng M, Liu Y, Singh RP, Nephew KP. Alcohol alters DNA methylation patterns and inhibits neural stem cell differentiation. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35(4): 735-46.
- Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2007; 2(12): e1289.
- Wu FR, Liu Y, Shang MB, Yang XX, Ding B, Gao JG, *et al.* Differences in H3K4 trimethylation *in vivo* and *in vitro* fertilization mouse preimplantation embryos. *Genet Mol Res* 2012; 11(2): 1099-108.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009; 460(7254): 473-8.
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *Can Med Assoc J* 2006; 175(5): 495-9.
- Hwa LS, Chu A, Levinson SA, Kayyali TM, DeBold JF, Miczek KA. Persistent escalation of alcohol drinking in C57BL/6J mice with intermittent access to 20% ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35(11): 1938-47.
- Griffin III WC, Lopez MF, Becker HC. Intensity and duration of chronic ethanol exposure is critical for subsequent escalation of voluntary ethanol drinking in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33(11): 1893-900.
- Dole VP, Gentry RT. Toward an analogue of alcoholism in mice: scale factors in the model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(11): 3543-6.
- Dole VP, Ho A, Gentry RT. Toward an analogue of alcoholism in mice: Criteria for recognition of pharmacologically motivated drinking. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(10): 3469-71.
- Kim JM, Ogura A, Nagata M, Aoki F. Analysis of the mechanism for chromatin remodeling in embryos reconstructed by somatic nuclear transfer. *Biol Reprod* 2002; 67(3): 760-6.
- Liu Y, Ding B, Yang XX, Shang MB, Lei XH, Wang R, *et al.* Dynamic transformation of DNA methylation and chromatin configuration in porcine oocyte during follicular growth. *J Anim Vet Adv* 2012; 11(10): 1739-44.
- 厉有名. 酒精性肝病的发病机制. *中华肝病杂志* (Li Youming. New insight on the pathogenesis of alcoholic liver diseases. *Chin J Hepat*) 2003; 11(11): 690-1.
- Herath CB, Jin W, Watanabe G, Arai K, Suzuki AK, Taya K. Adverse effects of environmental toxicants, octylphenol and bisphenol A, on male reproductive functions in pubertal rats. *Endocrine* 2004; 25(2): 163-72.
- Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, *et al.* The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004; 71(4): 1046-54.
- Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod sci* 2004; 82/83: 61-78.