

# 怀孕前后酒精摄入对雌鼠植入前胚胎DNA甲基化模式建立的影响

黄继昌<sup>1,3</sup> 王彩红<sup>1,3</sup> 刘勇<sup>1,2</sup> 吴凤瑞<sup>1,2</sup> 丁彪<sup>1,2</sup> 李文雍<sup>2</sup> 王荣<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>阜阳师范学院生命科学学院, 阜阳 236037; <sup>2</sup>胚胎发育与生殖调节安徽省重点实验室, 阜阳 236037;

<sup>3</sup>安徽大学生命科学学院, 合肥 230601)

**摘要** 女性怀孕前后饮酒会对胎儿的发育及神经系统造成不利影响, 称为“胎儿酒精综合征”(fetal alcohol spectrum disorders, FASD)。小鼠通常作为研究该病的动物模型。该实验采用体外培养技术及体内冲胚法研究雌鼠怀孕前后酒精摄入对各期植入前胚胎全基因组DNA甲基化模式建立的影响。小鼠植入前胚胎体外培养实验发现, 体外实验组I(怀孕前酒精处理组), 除8-cell外, 其他各期胚胎的DNA甲基化水平明显低于体外对照组; 体外实验组II(正常胚胎在含乙醇的培养基中培养), 各期植入前胚胎DNA甲基化水平均明显低于体外对照组。体内实验发现, 体内实验组I(怀孕前酒精处理组)与体内的实验组II(怀孕后酒精处理组), 各期植入前胚胎DNA甲基化水平明显低于体内对照组。体内、外实验结果表明: 受精前后酒精对各期植入前胚胎DNA甲基化模式的正确建立造成紊乱, 该结果可为进一步揭示FSAD发病机制提供一定的实验基础。

**关键词** 酒精; 胚胎发育; DNA甲基化; 灌胃; 小鼠

## Female Rats Ingested Alcohol before and after Pregnancy Impact DNA Methylation Patterns in Pre-implantation Embryo

Huang Jichang<sup>3</sup>, Wang Caihong<sup>3</sup>, Liu Yong<sup>1,2</sup>, Wu Fengrui<sup>1,2</sup>, Ding Biao<sup>1,2</sup>, Li Wenyong<sup>2</sup>, Wang Rong<sup>1,2\*</sup>

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

**Abstract** Women exposed to alcohol before and after pregnancy have been found to impede the fetal development and adversely affect its nervous system, known as fetal alcohol syndrome disorders. Mice often used as an animal model of the disease. As part of our investigation of mechanisms underlying alcohol adverse effects on DNA methylation patterns in pre-implantation embryos, embryos *in vitro* and *in vivo* from female mice intaked alcohol before and after pregnancy were studied. We found that treatment group I *in vitro* (long-term alcohol intake before pregnancy), except for 8-cell, the embryonic DNA methylation levels were significantly lower than the control group; Treatment group II *in vitro* (embryos cultured in a medium contained ethanol) was significantly lower than the control group in every period of time. Compare treatment group I and treatment group II *in vivo* found that

收稿日期: 2013-09-09 接受日期: 2013-11-12

国家自然科学基金(批准号: 31201789、31071310)、安徽大学学术创新研究项目(批准号: 01001770—10117700136)、安徽省高等学校自然科学研究重点项目(批准号: KJ2013A202)和阜阳师范学院省级科研机构委托专项(批准号: 2013PTFY02ZD、2013PTFY03ZD)资助的课题

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

Received: September 9, 2013 Accepted: November 12, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201789, 31071310), Anhui University Academic Innovation Research Project (Grant No.01001770—10117700136), the Key Project of Natural Science in Anhui Province (Grant No.KJ2013A202) and Special Scientific Research Institutions in Fuyang Teachers College (Grant No.2013PTFY02ZD, 2013PTFY03ZD)

\*Corresponding author. Tel: +86-558-2593601, E-mail: wangrbnu@aliyun.com

网络出版时间: 2013-11-25 10:12 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131125.1012.001.html>

DNA methylation in pre-implantation embryo was significantly lower than the control *in vivo*. Experimental results *in vivo* and *in vitro* indicated that females before and after pregnancy with alcohol intake might cause incorrect establishment of DNA methylation patterns in pre-implantation embryo, which provided certain foundation for revealing certain basic mechanisms of fetal alcohol syndrome.

**Key words** alcohol; embryo development; DNA methylation; gastric injection; mice

许多研究表明怀孕前后喝酒可对胎儿造成不利影响,但怀孕喝酒的妇女比例仍然很高(怀孕喝酒数/怀孕总数比为12%)。另外,非怀孕喝酒妇女的比例占53.7%<sup>[1]</sup>。许多临床病例以及胚胎学研究发现,女性孕期酒精暴露(prenatal alcohol exposure, PAE)能导致胎儿发育迟滞、行为及神经发育异常,称为“胎儿酒精综合征”(fetal alcohol spectrum disorders, FASD)<sup>[2-3]</sup>,孕期酗酒的女性所生的孩子FASD发病率为1%~50%。该病的患儿常伴有典型的面部畸形和神经系统发育异常的表现,成年后还会出现学习、认知及交际能力低下等行为能力缺陷<sup>[3-4]</sup>,给家庭和社会带来很大的问题和负担。近来研究发现,植入前胚胎表观遗传模式的正常建立对胎儿的正常发育至关重要,植入前胚胎表观遗传的错误建立会导致发育异常,可能会造成一生无法弥补的伤害<sup>[6]</sup>。

表观遗传修饰主要包括DNA甲基化、组蛋白修饰及染色体重塑等。DNA甲基化作为表观遗传修饰最重要的方式,其水平与基因转录水平密切相关。通常DNA甲基化水平越高,基因转录水平就会越低。它是在蛋氨酸腺苷转移酶的作用下将S-腺苷甲硫氨酸的甲基转移到胞嘧啶的C5位,形成5-甲基胞嘧啶(5mC),然而酒精可降低蛋氨酸合成酶与腺苷转移酶的活性,干扰蛋氨酸合成与代谢,从而影响甲基供体的正常提供及DNA甲基化水平<sup>[7-8]</sup>,并且长期的酒精摄入可引起哺乳动物各组织的DNA甲基化模式的改变<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期研究发现,植入前各期胚胎的表观遗传修饰对环境改变十分敏感,环境的改变能导致表观遗传的异常<sup>[5]</sup>,由此我们推测,作为环境重要因素之一的酒精可能会干扰植入前胚胎的DNA甲基化的正确建立。酒精是导致FASD发病的重要因素之一,FASD发病机制有关表观遗传方面的研究主要集中在神经发育<sup>[11-12]</sup>,而有关酒精造成植入前胚胎的表观遗传异常,目前尚未见报道。

本研究拟通过体内、外观察怀孕前后的酒精摄入对植入前胚胎DNA甲基化可能造成损害的差异,为深入研究孕期酒精暴露的危害,解释孕期酒精

暴露对子代的长时程影响提供重要的实验依据,同时为预防PAE对胎儿的伤害提供一种新的实验思路,也为预防酒精对胎儿的伤害提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

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

1.1.2 试剂及仪器 孕马血清激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂;生理盐水购自上海华源安徽锦辉制药有限公司;培养皿购自Corning公司;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;其他试剂来自Sigma公司。体视显微镜(SMZ1500, Nikon, Japan), CO<sub>2</sub>培养箱(2323-2, Thermo, USA),激光扫描共聚焦显微镜(TCS-SP5, Leica, Germany)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 小鼠动物建模具体方法可参阅文献[13],实验动物随机分组如下:为模拟体内实验,采取体外实验进一步研究酒精对胚胎表观遗传的影响。体外培养分组如下:体外对照组(雌鼠20只,生理盐水按体重比4~5 g/kg灌胃30 d<sup>[14-16]</sup>,合笼见栓后冲出受精卵于正常培养基中培养至各期胚胎);体外实验组I(雌鼠20只,用20%酒精按体重比4~5 g/kg灌胃30 d,合笼见栓后冲出受精卵于正常培养基中培养至各期胚胎);体外实验组II(用生理盐水按体重比4~5 g/kg灌胃30 d,合笼见栓后冲出受精卵于含乙醇培养基中培养至各期胚胎)。

体内实验分组如下:体内对照组(雌鼠20只,生理盐水按体重比4~5 g/kg灌胃30 d,合笼见栓后以等量的生理盐水处理,直至冲出所需的各期胚胎);体内实验组I(怀孕前酒精处理方法,雌鼠20只,用20%酒精按体重比4~5 g/kg灌胃30 d,合笼见栓后以等量

的生理盐水处理,直至冲出各期胚胎);体内实验组II(怀孕后酒精处理方法,雌鼠20只,用生理盐水按体重比4~5 g/kg灌胃30 d,合笼见栓的雌鼠继续以20%酒精按体重比4~5 g/kg灌胃,直至冲出所需的各期胚胎),期间自由采食,饮水。

**1.2.2 体内MII期卵子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, 14 h后直接扎破壶腹部获取卵子。用PBS充分清洗,各组卵子用0.5%链酶蛋白酶去除透明带,多聚甲醛固定30 min, 0.2% Triton X-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后用1:100稀释的抗5-甲基胞嘧啶抗体室温下孵育过夜,然后用1:100稀释的二抗室温孵育4 h, 10  $\mu$ g/mL PI(碘化丙啶)染色10 min, 制片观察。

**1.2.3 体外各时期胚胎的收集及免疫荧光** 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。合笼10 h后直接扎破壶腹部获得受精卵,取出受精卵放入无糖CZB培养液,于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。4-cell胚胎转移至有糖CZB培养液中进行培养。分别于受精后14, 30, 48, 60, 72, 88 h收集体外1-cell、2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚、囊胚,免疫荧光检测步骤与MII期卵子步骤相同。

**1.2.4 体内各时期胚胎的收集及免疫荧光** 合笼

后,分别于胚胎发育不同时期以及输卵管和子宫的不同部位,收集1-cell、2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚、囊胚各期胚胎。各期胚胎分别用4%多聚甲醛固定,免疫荧光步骤与MII期卵子步骤相同。

### 1.3 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枚卵子或胚胎。Image Pro-Plus转换荧光数据,相对荧光分析方法参照文献[17],荧光数据转换参阅文献[18]。采用SPSS 12.0单因素方差分析(one-way ANOVA), LSD做两两比较及*t*检验。

## 2 结果

### 2.1 间接免疫荧光法测MII期卵子的全基因组DNA甲基化

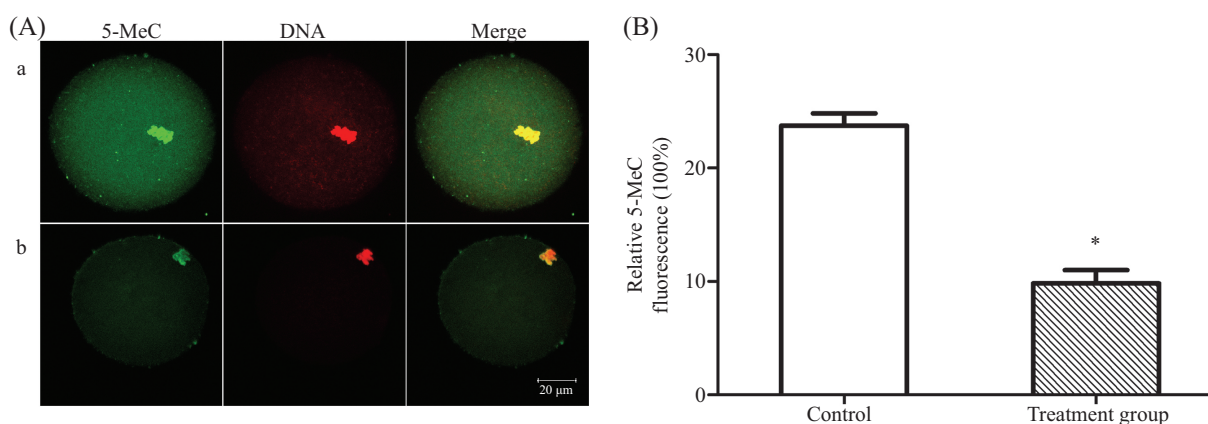
使用间接免疫荧光法检测对照组与酒精处理组卵子全基因组DNA甲基化水平(图1A),对不同区域的荧光强度进行分析(图1B)。结果显示,酒精处理组卵子的荧光值均明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 体外各时期胚胎的免疫荧光

采取体外胚胎培养法收集各时期胚胎,各组各时期胚胎的DNA的5-甲基胞嘧啶用针对该位点的特异性抗体进行间接免疫荧光检测全基因组DNA甲基化水平,间接免疫荧光法结果见图2。

### 2.3 体内各时期胚胎的免疫荧光

利用体内冲胚法获取各期胚胎,用间接免疫荧光

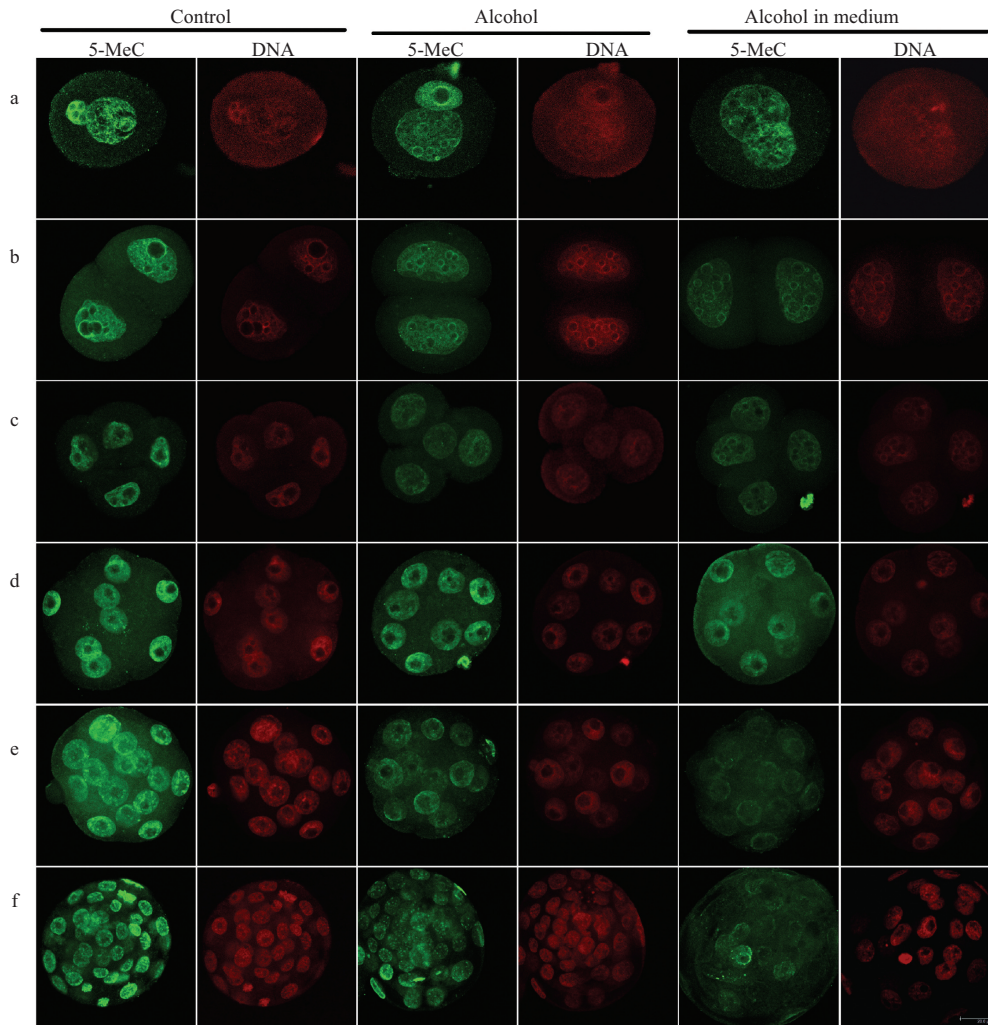


A: MII期的卵子免疫荧光图。字母a、b分别代表对照组、酒精处理组的MII期的卵子。DNA上的5-甲基胞嘧啶的特异性抗体免疫荧光,绿色(左边); DNA, 红色(右边); 标尺=20  $\mu$ m。B: 卵子全基因组DNA甲基化的半定量分析。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较。

A: MII stage oocytes immunofluorescence figure. The letter of a, b separately represent control and treatment group. Oocytes were immunostained with specific antibodies against resistance to 5-methyl cytosine antibody (5-MeC in DNA), in green (left); DNA, in red (middle); Merged (right). Scale bar=20  $\mu$ m. B: semi-quantitative analysis of DNA methylation of MII stage oocytes. \* $P < 0.05$  compared with control.

图1 MII卵子全基因组DNA甲基化及荧光数据转换

Fig.1 Global DNA methylation levels of MII oocytes in different group mice and data conversion of fluorescence



字母a~f分别代表1-cell、2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚、囊胚。胚胎的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  $\mu\text{m}$ 。

The letter of a, b, c, d, e and f refers to 1-cell, 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  $\mu\text{m}$ .

图2 体外各组不同发育时期胚胎的全基因组DNA免疫荧光

Fig.2 Immunofluorescence of global DNA methylation levels of embryos *in vitro* in different group mice

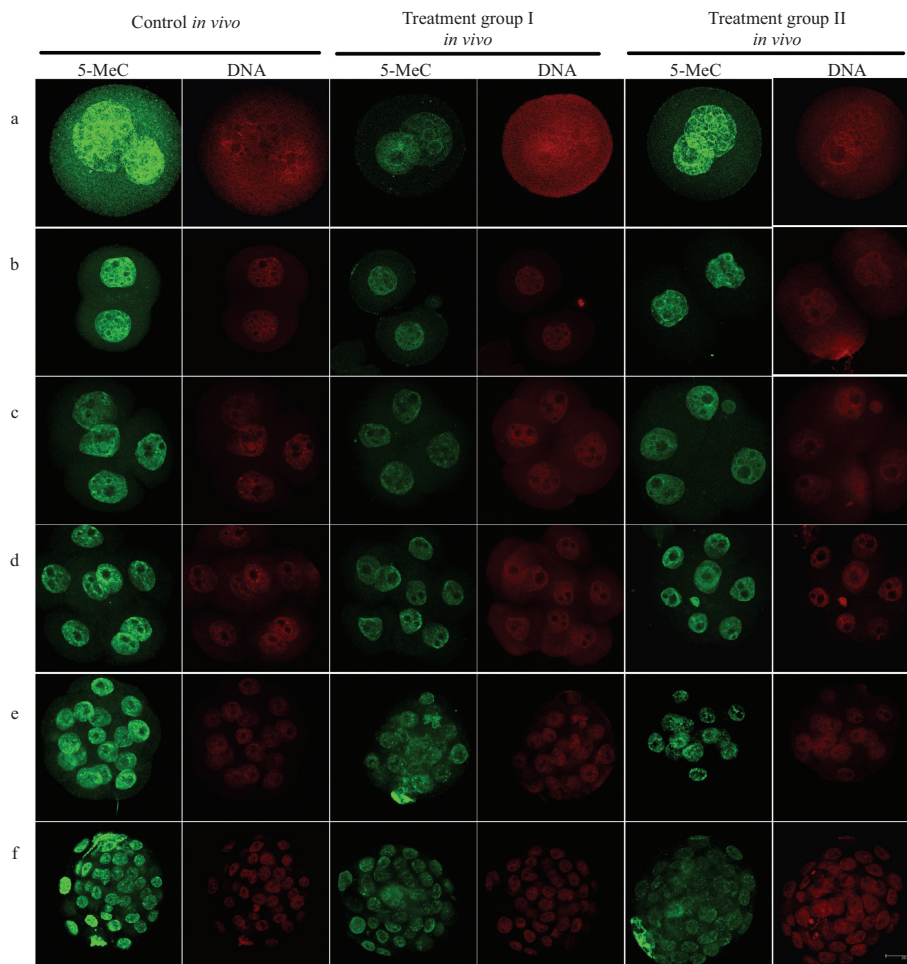
法检测各期胚胎的全基因组DNA甲基化水平(图3)。

#### 2.4 体内外胚胎的全基因组DNA甲基化的半定量分析

经Image Pro-Plus 6.0软件转换荧光强度, 体外培养对照组的小鼠植入前胚胎DNA甲基化水平从1-cell开始下降, 到4-cell时期达到最低, 随后甲基化水平持续上升, 囊胚期达到最高(图4)。图4显示, 体外实验组I(怀孕前酒精摄入)植入前胚胎的DNA甲基化水平, 除8-cell外, 明显低于对照组( $P<0.05$ ); 体外实验组II(培养基含乙醇), 植入前胚胎的DNA甲基化均低于对照组( $P<0.05$ )。体内对照组胚胎与体外对照组胚胎相比, DNA甲基化水平趋势基本

保持一致(图4和图5)。图5显示, 体内实验组I(怀孕前酒精摄入)和体外实验组II(怀孕后酒精摄入), 各时期植入前胚胎DNA甲基化水平明显低于体内对照组。

体内外实验结果(图6)显示: 与体外对照组相比, 体内对照组的1-cell、2-cell的甲基化水平高于体外对照组, 而其他时期植入前胚胎DNA甲基化水平并无明显差异; 与体外实验组I相比, 体内实验组I中8-cell的DNA甲基化水平低于体外实验组I, 其他时期植入前胚胎DNA甲基化水平并无明显差异; 与体外实验组II相比, 体内实验组II中各时期胚胎的DNA甲基化水平均高于体外实验组II。



字母a~f分别代表1-cell、2-cell、4-cell、8-cell、桑椹胚、囊胚。体内各时期胚胎的全基因组DNA甲基化, DNA上的5-甲基胞嘧啶的特异性抗体免疫荧光, 绿色(左边); 红色(右边)。标尺=20 μm。

The letter of a, b, c, d, e and f refers to 1-cell, 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3 体内各组不同发育时期胚胎的全基因组DNA免疫荧光

Fig.3 Immunofluorescence of global DNA methylation levels of embryos in vivo in different group mice

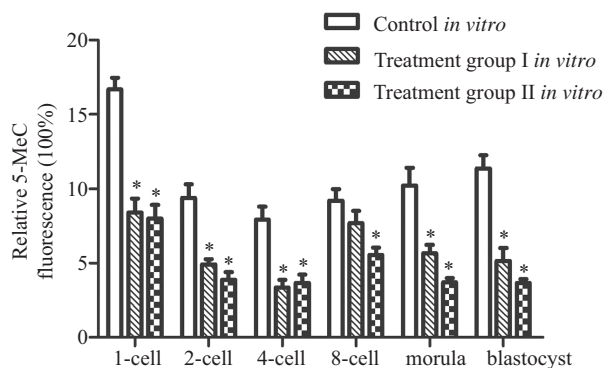
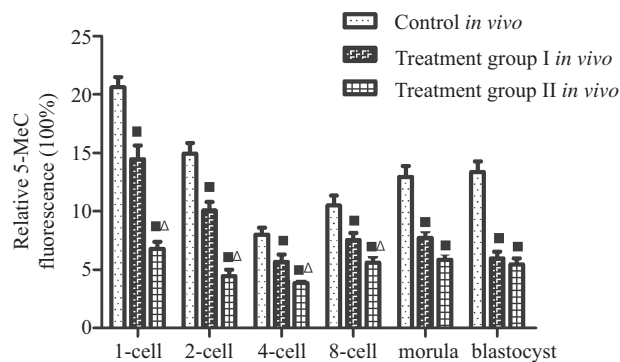


Image Pro-Plus 6.0软件量化来自体外对照组、体外实验组I、体外实验组II的各时期胚胎核DNA甲基化的强度。不同柱形图和正偏差代表平均值±标准误。\*P<0.05, 与体外对照组相比。

Total nuclear DNA methylation intensities from different 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 in vitro.

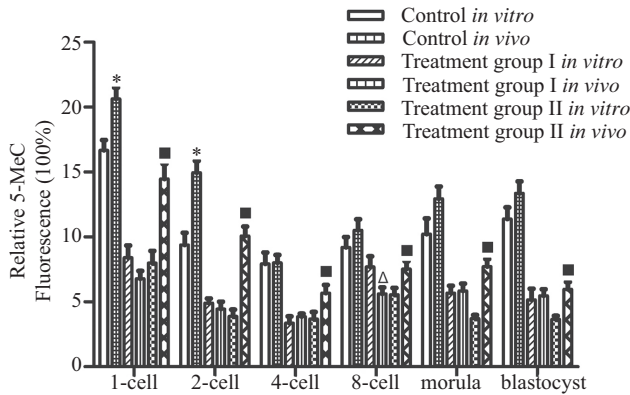
图4 体外不同发育时期胚胎的全基因组DNA甲基化的半定量分析  
Fig.4 Semi-quantification of genome-wide DNA methylation levels of pre-implantation embryos in vitro



不同柱形图和正偏差代表平均值±S.E.M.. ■P<0.05, 与体内对照组相比; △P<0.05, 与体内实验组I相比。

The columns and bars represent mean±S.E.M.. ■P<0.05 compared with control in vivo; △P<0.05 compared with treatment group I.

图5 体内不同发育时期胚胎的全基因组DNA甲基化的半定量分析  
Fig.5 Semi-quantification of genome-wide DNA methylation levels of pre-implantation embryos in vivo



不同柱形图和正偏差代表平均值±S.E.M.. \* $P < 0.05$ , 体内对照组与体内对照组相比;  $\Delta P < 0.05$ , 体外实验组I与体内实验组I相比;  $\blacksquare P < 0.05$ , 体外实验组II与体内实验组II相比。

The columns and bars represent mean±S.E.M.. \* $P < 0.05$  control *in vitro* compared with control *in vivo*;  $\Delta P < 0.05$  treatment group I *in vitro* compared with treatment group I *in vivo*;  $\blacksquare P < 0.05$ , treatment group II *in vitro* compared with treatment group II *in vivo*.

图6 体内、外不同发育时期胚胎的全基因DNA甲基化水平的比较

Fig.6 Comparison of genome-wide DNA methylation levels of pre-implantation embryos *in vitro* and *in vivo*

### 3 讨论

本研究发现, 酒精处理组小鼠MII期卵子的DNA甲基化水平明显低于正常组, 这说明酒精对卵子DNA甲基化模式的建立会造成一定影响, 产生这种结果的主要原因可能是乙醇进入体内后, 大约90%在肝脏内被氧化成高毒性及高活性的乙醛化合物, 而乙醇及乙醛的过多积累可能影响蛋氨酸合成与代谢, 进而影响5-腺苷甲硫氨酸提供甲基化供体<sup>[7-8]</sup>, 这可能是导致酒精处理组卵子的DNA甲基化水平降低的原因之一。

早期研究已发现, 卵的质量和 环境变化等多种因素会对哺乳动物植入前胚胎表观遗传的建立产生影响<sup>[5,19-20]</sup>, 而植入前胚胎表观遗传的正确建立对哺乳动物发育至关重要<sup>[19]</sup>。因此, 本研究试图探讨酒精对卵子及植入前胚胎的表观遗传模式建立的影响。采用体外胚胎培养法研究酒精对胚胎发育的毒性影响, 发现体外对照组、体外实验组I的受精卵在体外无乙醇的培养基中培养, 各期胚胎免疫荧光检测结果发现, 体外实验组I(怀孕前长期摄入酒精), 除8-cell外各期胚胎DNA甲基化明显低于体外对照组。结果说明, 尽管在条件相同的培养基(同环境)中发育, 怀孕前酒精摄入造成雌鼠内环境的改变, 在

怀孕前对卵子及受精卵造成的毒害, 干扰了植入前胚胎DNA甲基化模式的正确建立。而体外实验组II无酒精处理的受精卵(正常胚胎)在体外含乙醇的培养基中发育, 各期胚胎DNA甲基化明显低于体外对照组。这可能是由于体外培养基中乙醇阻碍甲基化供体正常的供给<sup>[7-8]</sup>, 从而使DNA甲基化水平明显降低。体外实验表明, 怀孕前酒精摄入可影响受精卵DNA甲基化水平及体外各期胚胎的DNA甲基化水平的正确建立。

体内实验进一步分析酒精对胚胎发育的毒性作用。体内实验表明, 体内对照组植入前胚胎1-cell保持高度DNA甲基化, 2-cell开始去甲基化, 4-cell期后重新甲基化, 囊胚达到最高, 与已有结果保持一致<sup>[21]</sup>, 体内实验组I与体内实验组II分别为怀孕前和怀孕后酒精摄入, 各期植入前胚胎DNA甲基化水平明显低于体内对照组。说明酒精可造成各期胚胎的DNA甲基化水平的降低, 可能是由于酒精干扰了甲硫氨酸合成酶与腺苷转移酶的活性阻碍了这一生物学过程<sup>[7-8]</sup>, 进而造成植入前各期胚胎DNA甲基化水平的异常。

为进一步分析环境变化对植入前胚胎表观遗传建立的影响, 我们分别比对了体内外对照组及实验组的免疫荧光数据。实验结果显示, 体外对照组与体内对照组的DNA甲基化比较, 1-cell、2-cell出现差异, 其他时期并无显著差异, 并且体外实验组I与体内实验组I相比, 除8-cell外, 其他时期无明显差异。一方面可能由于发育环境影响胚胎的表观遗传<sup>[5,13]</sup>, 另一方面也可能说明体外的正常培养基与体内发育环境差异不大。然而, 体外实验组II与体内实验组II相比, 体外各时期胚胎的DNA甲基化均明显低于体内实验组II, 这可能是由于在体内环境下通过将乙醇转化为其他产物, 减少一部分乙醇对胚胎的表观遗传修饰的影响所致, 相对而言体外胚胎所处发育环境缺乏此缓冲的因素, 以致造成DNA甲基化水平明显低于体内各期胚胎。

早期植入前胚胎表观遗传的正确建立对胚胎发育至关重要<sup>[5,20]</sup>, 酒精所致的植入前胚胎表观遗传异常可能是胚胎发育异常的机制之一。FASD不可治愈但能预防, 植入前胚胎DNA甲基化的异常, 可能导致胎儿发育的异常<sup>[19]</sup>, 严重可能致死<sup>[22]</sup>, 这可能是造成该患儿后期发育异常的原因之一。怀孕前或后酒精摄入均引起早期胚胎的表观遗传异常, 该实

验结果可为酒精胎儿综合征的发病机制及人类优生优育提供一定的实验参考数据, 对于酒精在机体内造成损害的具体机制有待进一步的分析研究。

### 参考文献 (References)

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Alcohol use among pregnant and nonpregnant women of childbearing age—United States, 1991–2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58(19): 529–32.
- Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA-J Am Med Assoc* 2003; 290(22): 2996–9.
- Mattson SN, Crocker N, Nguyen TT. Fetal alcohol spectrum disorders: Neuropsychological and behavioral features. *Neuropsychol Rev* 2011; 21(2): 81–101.
- Guerra C, Bazinet A, Riley EP. Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior. *Alcohol* 2009; 44(2): 108–14.
- 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.
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, *et al.* Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001; 27(2): 153–4.
- 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, Tommasino 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.
- Anthony B, Zhou FC, Ogawa T, Goodlett CR, Ruiz J. Alcohol exposure alters cell cycle and apoptotic events during early neurogenesis. *Alcohol Alcoholism* 2008; 43(3): 261–73.
- Mantha K, Kleiber ML, Singh SM. Neurodevelopmental timing of ethanol exposure may contribute to observed heterogeneity of behavioural deficits in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorder (FASD). *J Behav Brain Sci* 2013; 3: 85–99.
- 黄继昌, 王彩红, 刘勇, 吴凤瑞, 李文雍, 王荣. 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. *中国细胞生物学学报*(Huang Jichang, Wang Caihong, Liu Yong, Wu Fengrui, Li Wenyong, Wang Rong. Chronic alcohol ingestion influences sperm semen quality and global DNA methylation in pre-implantation embryos. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(8): 1103–9.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci* 2004; 82: 61–78.
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *Can Med Assoc J* 2006; 175(5): 495–9.