

内侧前额叶皮质 DNA 甲基化调控大鼠酒精相关行为

崔亨贞¹, 孙蜜烛², 王润芝², 李辰雨³, 黄予暄³, 黄秋菊³, 乔晓孟²

1. 郑州大学医学院基础医学专业, 郑州 450001

2. 郑州大学医学院法医学系, 郑州 450001

3. 郑州大学医学院医学检验系, 郑州 450001

摘要: 酒精滥用不仅导致组织器官损伤, 还易诱发神经精神疾病。研究表明, DNA 甲基化在酒精诱导基因表达和行为改变中发挥重要作用, 但具体的神经生物学机制尚未被阐明。为了探索 DNA 甲基化在酒精滥用中的作用机制, 本研究选取健康成年雄性 SD 大鼠(*Rattus norvegicus*) 32 只, 随机分为饮水对照组($n=16$)和慢性酒精暴露组($n=16$), 运用双瓶选择实验(two bottle choice test, TBCT)评估大鼠酒精偏爱率(alcohol preference), 通过旷场行为(open field test, OFT)评估活动状态并检测血酒精浓度。分离两组大鼠内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC), 提取总 DNA, 利用简化代表性重亚硫酸盐测序技术(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)构建 mPFC 甲基化谱, 对差异基因进行功能富集和通路分析, 筛选与酒精滥用密切相关的甲基化差异基因, 运用 qRT-PCR 技术检测差异基因的表达, 验证 DNA 甲基化对基因的表达调控; 利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)和甲基化 CpG 位点结合蛋白 2 (methyl CpG binding protein 2, MeCP2)的表达; 同时, 还检测了短期酒精暴露(7 d)对大鼠 mPFC 内 DNMTs 和 MeCP2 的影响($n=8$ /组)。结果表明, 慢性酒精暴露大鼠 mPFC 内基因启动子区甲基化水平显著升高。与酒精滥用密切相关的差异基因中, 慢性酒精暴露组 *Ntf3* 和 *Ppm1g* 启动子区甲基化水平升高, mRNA 表达降低; *Hap1* 和 *DUSP1* 启动子区甲基化水平降低, mRNA 表达升高。慢性酒精暴露使 DNMT3B 和 MeCP2 mRNA 和蛋白表达升高, 而短期内酒精暴露不影响它们的表达。本研究初步证实 DNA 甲基化与酒精滥用的发展相关, 可能受 DNMT3B 和 MeCP2 分子的调控, 并发现了与酒精滥用相关的靶基因 *Ntf3*、*Ppm1g*、*Hap1* 和 *DUSP1*, 为研究酒精滥用的神经生物学机制提供了新见解, 同时为酒精滥用治疗提供了可能的药理学靶点。

关键词: 酒精滥用; DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶; 内侧前额叶皮质

收稿日期: 2019-09-02; 修回日期: 2019-11-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81373247)和郑州大学大学生创新项目(编号: 2019cxxy054)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373247) and the Innovative Project for College Students of Zhengzhou University (No. 2019cxxy054)]

作者简介: 崔亨贞, 本科生, 专业方向: 基础医学。E-mail: chzzzu@163.com

通讯作者: 乔晓孟, 博士, 讲师, 研究方向: 酒精滥用的神经生物学机制。E-mail: xiaomeng416520@126.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-261

网络出版时间: 2019/12/25 17:11:05

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20191224.1714.002.html>

DNA methylation in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-related behavior in rats

Hengzhen Cui¹, Mizhu Sun², Runzhi Wang², Chenyu Li³, Yuxuan Huang³, Qiuju Huang³, Xiaomeng Qiao²

1. Basic Medicine, School of Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

2. Department of Forensic Medicine, School of Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

3. Department of Medical Laboratory, School of Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Alcohol abuse causes tissue and organ damage, and may participate neuropsychiatric diseases. Studies have shown that DNA methylation plays an important role in gene expression and behavioral changes induced by alcohol, however the causative neurobiological mechanisms have not been clarified. In this study, 32 healthy adult male SD rats were randomly divided into a drinking water control group ($n=16$) and a chronic alcohol exposure group ($n=16$). The alcohol preference and locomotor activity of rats were evaluated by two-bottle choice test (TBCT) and open-field test (OFT). DNA methylation in the medial prefrontal cortex (mPFC) tissue was detected by the reduced representative bisulfite sequencing (RRBS) technology. The methylation differential genes closely related to alcohol abuse were screened. qRT-PCR was used to verify the mRNA expression patterns of differential genes. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of DNA methyltransferases (DNMTs) and methyl CpG binding protein 2 (MeCP2). Furthermore, the effect of short-term alcohol exposure (7 days) on DNMTs and MeCP2 in the mPFC of rats was tested ($n=8$ /group). The results indicated that the methylation level of promoter region in the mPFC of rats exposed to chronic alcohol was significantly increased. In addition, the increased methylation levels in the promoter of *Ntf3* and *Ppm1G* were accompanied by down-regulated mRNA levels in the chronic alcohol exposure group. The decreased methylation levels in the promoter of *Hap1* and *DUSP1* were accompanied by up-regulated mRNA levels. Furthermore, chronic alcohol exposure increased the mRNA and protein levels of DNMT3B and MeCP2. However, short term alcohol exposure did not affect their expression. This present study provides evidence that DNA methylation is associated with the development of alcohol abuse, which may be regulated by DNMT3B and MeCP2. The target genes *Ntf3*, *Ppm1G*, *Hap1*, and *DUSP1* related to alcohol abuse were discovered as well, providing new insights into the neurobiological mechanism of alcohol abuse and the potential pharmacological targets for the treatment of alcohol abuse.

Keywords: alcohol abuse; DNA methylation; DNA methyltransferases; medial prefrontal cortex

酒精是世界公认的成瘾性精神活性物质, 长期过量饮酒会引起多种危害。在发达国家, 酒精引起的疾病负担(约 10%)仅次于烟草和高血压, 而在一些发展中国家, 酒精甚至是致病致残的首要危险因素。《2017 年全球酒精、烟草和非法药物使用状况报告》指出, 2015 年在成年人群中, 重度饮酒的患病率为 18.4%, 其中每 10 万人中就有 843.2 人患有酒精依赖^[1]。全世界因酒精滥用造成的死亡达 330

万例(占所有死亡人数的 5.9%), 并产生 5.1% 的疾病负担, 造成 2500 亿的经济损失^[2]。中国的酒文化源远流长, 带来的各种问题也显而易见。2015 年我国重度饮酒的患病率在 20%~25%^[1], 青少年酗酒率呈逐年上升趋势^[3]。酒精滥用对个人的身心健康有着极大威胁。摄入过量酒精可以诱发肝硬化, 增加肝癌的发生率, 并造成胃肠道功能紊乱及心血管疾病; 长期饮酒可诱发神经精神疾病, 包括胎儿酒精谱系

障碍和依赖,导致焦虑、抑郁甚至认知功能障碍^[4]。因此,对酒精滥用的病因机制进行研究具有十分重要的生物学及社会学意义。

酒精反复摄入会引起相关基因的表达变化^[5,6],即使停止饮酒后这种改变仍可持续,并且可以遗传。这种基因表达改变的内在机制可能由表观遗传介导^[7]。近年来,越来越多的研究聚焦酒精滥用相关基因表达改变的表观遗传机制,酒精可能使基因的甲基化或组蛋白乙酰化发生改变,从而增强或抑制转录,引起基因表达持久性改变。Zhu 等^[8]通过对 1465 个健康受试者外周血全基因组甲基化进行分析,发现饮酒量与基因组整体甲基化水平呈负相关。 Mg^{2+}/Mn^{2+} 依赖的蛋白质磷酸酶 1G (protein phosphatase- Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependent-1G, Ppm1G) 被发现与酒精使用障碍相关,在酒精使用障碍患者的外周血基因组中, *Ppm1G* 启动子区甲基化水平升高, mRNA 表达降低,而且其与 499 名酗酒青少年的冲动性行为增加显著相关^[9]。在对啮齿类动物的研究中发现,慢性酒精暴露改变了小鼠 (*Mus musculus*) 不同脑区 5-羟色胺受体 3a (serotonin receptor 3a, *Htr3a*) 启动子区的甲基化, Hip 中 *Htr3a* 启动子区甲基化水平升高,而背内侧纹状体(dorsomedial striatum, DMSTR) 和 dmPFC 内 *Htr3a* 启动子区甲基化水平降低^[10]。有研究表明,低甲基化药物(如甲基转移酶抑制剂)能减少慢性酒精暴露大鼠的饮酒量^[11,12]。由此可见, DNA 选择性地响应环境因素,进而改变转录机制,参与细胞生长发育、周期调节、信号转导等多种生命过程,导致大脑中生理和病理过程的改变。

本研究通过建立大鼠慢性酒精暴露模型,提取内侧前额叶皮质(medial prefrontal cortex, mPFC) DNA,运用简化代表性重亚硫酸盐测序(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)技术检测 mPFC 全基因组甲基化水平,筛选出与酒精滥用相关的甲基化差异基因;进而对差异基因进行 GO 功能富集和 KEGG 通路分析;运用实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)对甲基化差异基因进行扩大样本量验证;运用 Western blot 技术对调控 DNA 甲基化的关键酶及分子进行蛋白表达检测,探索 DNA 甲基化在酒精滥用发展过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 48 只,6~8 周龄,体重 180~220 g。实验动物均由郑州大学实验动物中心提供,在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)的动物标准环境饲养。饲养室环境安静,温度区间为 21~25℃,湿度区间为 40%~60%,保持 12 h 明暗周期(7:00 AM 灯亮,7:00 PM 灯暗),实验均在明周期进行。该项目经郑州大学实验动物管理与使用委员会批准,并严格遵守中华人民共和国科技部《关于善待实验动物的指导意见》。所有大鼠均未经过任何行为学训练,单只单笼饲养,自由摄食饮水,并于实验前一周时间提前适应新环境。

1.2 慢性酒精暴露

所有动物被随机分为两组:慢性酒精暴露组($n=16$)和饮水对照组($n=16$),其中每组各 12 只用于行为学检测及分子生物学实验,剩余 4 只用于 RRBS 测序。慢性酒精暴露模型建立之前,酒精暴露组大鼠首先接受连续 5 d 的双瓶选择实验(two bottle choice test, TBCT),以判断大鼠的基础酒精偏爱率(alcohol preference)。同一饲养笼左右两边各一瓶 6% (V/V)的酒精水溶液和自来水,供大鼠自由选择。为防止大鼠对位置的偏爱,需每天交换酒瓶和水瓶的位置。每天 17:00 PM 定时称量酒瓶和水瓶的重量,计算酒精溶液和水溶液的消耗体积,酒精偏爱率=酒精溶液消耗体积/液体总摄入体积 $\times 100\%$ 。双瓶选择实验结束后,开始建立慢性酒精暴露模型。实验组大鼠自由饮用 6% 的酒精水溶液,对照组大鼠自由饮水,每日 7:00 AM 更换新的酒和水,连续 35 d。35 d 内每日 5:00 PM 称量大鼠体重并记录饮酒量,第 7、14、21、28、35 d 分别进行旷场行为(open field test, OFT)和血酒精浓度检测。第 36 d 起重新进行一次双瓶选择实验,以判定模型是否建立成功。随后以颈椎脱臼法处死大鼠,分离 mPFC 核团,保存于 -80°C 冰箱中备用。对于短期酒精暴露模型($n=8$ /组),大鼠自由饮用 6% 的酒精水溶液连续 7 d,第 7 d 早上处死大鼠,分离 mPFC 核团,一半核团提取 mRNA,

一半提取蛋白质用于后续分析。

1.3 旷场行为

黑色正方形敞口实验箱(100 cm×100 cm×45 cm), 中心区域占箱底总面积的 60%, 上方 2 m 处悬挂 30 W 照明灯。在酒精暴露的第 7、14、21、28、35 d 早上 7:30, 将所有大鼠逐只转运至行为学实验室适应 30 min, 随后将大鼠放至箱子角落进行 15 min 的自由探索, 由摄像装置记录并分析 15 min 内的数据, 包括: (1)总活动距离(total distance): 大鼠在实验箱的总活动路程, 反应大鼠的水平动机; (2)中心区域停留时间比(percentage of time in the center): 反应大鼠的探索行为和焦虑样情绪。

1.4 血酒精浓度(blood alcohol level, BALs)检测

旷场实验结束后, 立即对酒精暴露组大鼠进行鼠尾静脉采血, 每只抽取尾静脉血约 0.2 mL。随后采用顶空-气相色谱法测定 BALs。实验前平衡温度 20 min, 从冰箱内取出血样 100 μ L 于 5 mL 顶空气瓶中, 加入 0.1 g/L 叔丁醇内标溶液 500 μ L, 用钳口器将空瓶用硅胶垫密封后放入自动顶空恒温炉中, 吹洗 2 min, 进行预热, 听到响声后代表预热完成, 开始进样, 进样口温度为 150 $^{\circ}$ C, 再听到一次响声时点击“START”按钮, 开始测定, 并进行样品记录。

1.5 简化代表性重亚硫酸盐测序

两组大鼠分别选取 3 只, 提取 mPFC 基因组 DNA。限制性内切酶 *Msp* I 将 DNA 切割为 40~220 bp 大小的片段, 在 DNA 分子两端引入接头序列及索引序列, 割胶后回收。按照标准流程使用 QIAquick Gel Extraction kit 进行纯化, 洗脱, 将 DNA 保存在-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。按照标准流程使用 EpiTect Bisulfite Kit 对纯化产物进行重亚硫酸氢盐处理, 洗脱 DNA。通过 PCR 扩增完成文库构建。PCR 扩增引物为:

F: 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3';

R: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'。

PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 15 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

将构建好的文库等摩尔浓度混合, 对文库进行

定量后, 利用 Illumina Nextseq 500 Desktop Sequencer 上机测序。得到原始测序数据后, 对其进行质量控制以获得高质量数据进行后续分析。将测序序列比对到基因组, 得到不同基因组环境的甲基化情况, 并基于二项分布检验和 1% FDR 约束对甲基化位点进行筛选。统计甲基化程度的分布情况, 比较样本之间甲基化程度的一致性。最后, 运用 GSeq 对差异甲基化区域最近邻基因进行功能注释, 用 KEGG pathway 对甲基化差异基因进行通路分析。

1.6 实时荧光定量 PCR

采用 MiniBEST Universal RNA Extraction 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)提取两组大鼠($n=12$ /组)一侧 mPFC 的 RNA, 并测定 RNA 浓度。随后以 RNA 为模板合成互补的 cDNA。以 cDNA 产物为模板, 进行荧光实时定量 PCR 反应。目的基因的引物序列见表 1。

1.7 Western blot 检测

提取两组大鼠一侧 mPFC 的蛋白质, 用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白定量。为避免电泳时由于蛋白浓度的差异造成的条带深浅不一, 根据测得的蛋白浓度(均高于 3 μ g/ μ L), 将所有样本的总蛋白浓度均调整为 3 μ g/ μ L, 用 RIPA 裂解液和 5 \times 的蛋白上样缓冲液稀释所提取的蛋白。随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜并孵育抗体。一抗分别为抗 DNMT1 兔多克隆抗体(美国 Epigentek 公司)、抗 DNMT3A 兔多克隆抗体(美国 Epigentek 公司)、抗 DNMT3B 兔多克隆抗体(美国 Epigentek 公司)、抗 MeCP2 小鼠单克隆抗体(英国 Abcam Technology 公司)。二抗抗体孵育完成并洗膜后进行化学发光检测。采用美国 Bio-rad 公司的 Image Lab 软件进行分析, 采集灰度值, 计算目的蛋白条带的平均光密度, 进行相对定量分析。用目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带的光密度比值来表示检测蛋白的相对表达水平。

1.8 数据处理与统计学分析

采用 SPSS 20.0 和 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计学分析, 以均值 \pm 标准误(mean \pm S.E.M.)表示

表 1 大鼠目的基因扩增引物序列信息

Table 1 Primer sequences for target genes in rats

基因名称	引物序列(5'→3')
<i>Ntf3</i>	F: GGCAACAGAGACGCACAAT R: TCCTCCGTGGTGATGTTCTA
<i>Pdp1</i>	F: CTCAATTACCTGGTGCTTCG R: GCATTGTGGTCATTAGAGAGC
<i>Ppm1G</i>	F: TCATTGCTGTGACGGCATC R: ATGACAATAACCGAAGCTCCC
<i>FLT1</i>	F: TAACGCAATCTTCTTAACGTC R: TTAATCCTCACAACGTC
<i>Nlg2</i>	F: CAGAAGAGACAGAGCAGGCATC R: GCAGAGACCACCACATTCATC
<i>Hap1</i>	F: CAAGGATGAATGTGGTGGTCTC R: CTGCTGCCGCTTAGAATGG
<i>NFκB-p100</i>	F: TCGACCTCCACCGATCTTT R: CTGTGTCTTTTGCTTCGGC
<i>RTKN2</i>	F: CCATAGGATGCTAATCTCCGTTT R: AAGATTACTGCGGTCAACCTT
<i>DUSP1</i>	F: CATTCCCGATGACATACACGTT R: CATTCCCGATGACATACACGTT
<i>DUSP8</i>	F: TCACTGGTCTGGCTGGCATTTT R: AGTTGAAGTTGGGCGAGATGG
<i>DNMT1</i>	F: GTTCCTTGTAGGCGAGTGTG R: TTGCGTAGTCCTGGCTGTAC
<i>DNMT3A</i>	F: GCA AAGTGAGGACCATTACC R: GCCAAACACCCTTTCCAT
<i>DNMT3B</i>	F: GTGCGTCGTTCAAGCAGTAG R: GTTCTCGGCTCTCCTCATCT
<i>MeCP2</i>	F: GCCTTCAGCCCACCATCTG R: CGGTCACGAATGATGGAACG
<i>GAPDH</i>	F: ATGGGGAAGGTGAAGGTCTG R: GGGGTCATTGATGGCAACAA

实验数据。对于模型建立期间两组大鼠的体重变化和每周一次的旷场行为测试结果,以时间为组内因素,饮酒或饮水为组间因素进行重复测量的双因素方差分析(Two-way ANOVA with repeated measurements, RM two-way ANOVA);两个因素有交互作用时,进行 Sidak's post hoc 多组之间的两两比较。对于 35 d 内慢性酒精暴露组大鼠的酒精摄入量(g/kg/d)、血酒精浓度和酒精偏爱率,进行重复测量的单因素

方差分析(One-way ANOVA with repeated measurements, RM one-way ANOVA);并进行 Sidak's post hoc 不同时间点的两两比较。对于两组大鼠 mPFC 内相关分子的 mRNA 和蛋白表达,以相对于饮水组的相对倍数表示,采用非配对 *t* 检验进行比较。以 $P<0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果与分析

2.1 大鼠体重、酒精摄入量、血酒精浓度及酒精偏爱率的变化

2.1.1 35 d 模型建立期间大鼠体重和酒精摄入量变化

为观测慢性酒精暴露对大鼠基础新陈代谢的影响,每日 5:00 PM 称量大鼠体重。重复测量的双因素方差分析结果表明,慢性酒精暴露模型建立 35 d 内,饮用 6%酒精水溶液对大鼠体重未产生显著性影响 [$F_{\text{Alcohol}(1,22)}=0.649$, $P=0.429$]。在整个实验期间,两组大鼠的体重表现出同步增长 [$F_{\text{Time}(5,110)}=932.300$, $P<0.0001$] (图 1A)。结果表明,饮用 6%酒精水溶液 35 d 对大鼠体重不产生影响,基本不影响大鼠的新陈代谢。

对于酒精摄入量,重复测量的单因素方差分析表明,整个实验过程中大鼠饮酒量保持稳定 [$F_{(5,66)}=2.268$, $P=0.121$],平均摄入量为 6.47 ± 1.08 g/kg/d (图 1B)。随着饮用时间增长,大鼠饮酒量并没有增加,始终保持稳定,说明大鼠没有产生酒精耐受。

2.1.2 慢性酒精暴露大鼠的血酒精浓度

在酒精暴露第 7、14、21、28、35 d,对酒精暴露组大鼠的尾静脉进行采血,检测大鼠 BALs,以了解酒精在大鼠体内的维持状况。整个实验过程中,酒精暴露组大鼠的 BALs 平均为 83.54 ± 1.24 mg/dL,重复测量的单因素方差分析表明,酒精暴露组大鼠 BALs 保持稳定 [$F_{(4,55)}=0.4265$, $P=0.936$] (图 1C)。结果表明,6% (V/V)酒精水溶液的慢性暴露可以让大鼠体内维持一定的 BALs,大鼠相关行为的异常是酒精作用的结果。

2.1.3 模型建立前后大鼠酒精偏爱率

慢性酒精暴露开始前和结束后, 对酒精暴露组大鼠进行 5 d 的双瓶选择实验。在模型建立之前, 重复测量的单因素方差分析表明, 酒精暴露组大鼠的酒精偏爱率保持较低的稳定水平 [$F_{(4,55)}=0.467$, $P=0.721$], 平均偏爱率为 $17.12\pm1.50\%$ 。而经过 35 d 的酒精暴露之后, 慢性酒精暴露组大鼠的酒精偏爱率明显升高, 重复测量的单因素方差分析显示, 时间因素影响了大鼠的酒精偏爱率 [$F_{(4,55)}=3.905$, $P<0.05$], 测试第 5 d, 慢性酒精暴露组大鼠的酒精偏爱率显著高于第 1 d ($P<0.05$)。5 d 内大鼠酒精偏爱率的最低值为 $43.10\pm5.54\%$, 远高于模型建立前大鼠的酒精偏爱率(图 1D)。

2.2 酒精对大鼠旷场行为的影响

为研究连续的酒精作用对大鼠自主活动量和焦虑样行为的影响, 在酒精暴露第 7、14、21、28 和 35 d 对两组大鼠进行旷场实验。结果发现, 大鼠偏

向于在旷场外围活动, 这与啮齿类动物的趋壁性习性相吻合(图 2A)。

重复测量的双因素方差分析显示, 在 35 d 的慢性酒精暴露过程中, 大鼠的水平活动量随时间有所变化 [$F_{\text{Time}(4,88)}=24.150$, $P<0.0001$], 酒精因素所起的作用不大 [$F_{\text{Alcohol}(1,22)}=2.868$, $P=0.113$]。因酒精和时间因素没有显著的交互作用, 本研究无法进行多重比较分析, 为了使结果更直观, 本研究展示了具体的总活动距离(mean±S.E.M.)。慢性酒精暴露组和饮水对照组相比, 在饮酒第 7 d 大鼠水平活动量有增加趋势(饮水组: 5457.75 ± 192.75 cm vs. 酒精暴露组: 7017.95 ± 213.73 cm), 表明短期酒精暴露有刺激运动的作用; 随后这种差异在第 14、21 d 逐渐消失, 饮水组和酒精暴露组总活动距离一致, 表明神经系统对酒精的适应性; 而在饮酒第 28 d 和第 35 d 大鼠水平活动量有减少趋势: 第 28 d, 饮水组: 5824.94 ± 144.86 cm vs. 酒精暴露组: 4494.54 ± 180.74 cm; 第 35 d, 饮水组: 5602.01 ± 222.11 cm vs. 酒精暴露组:

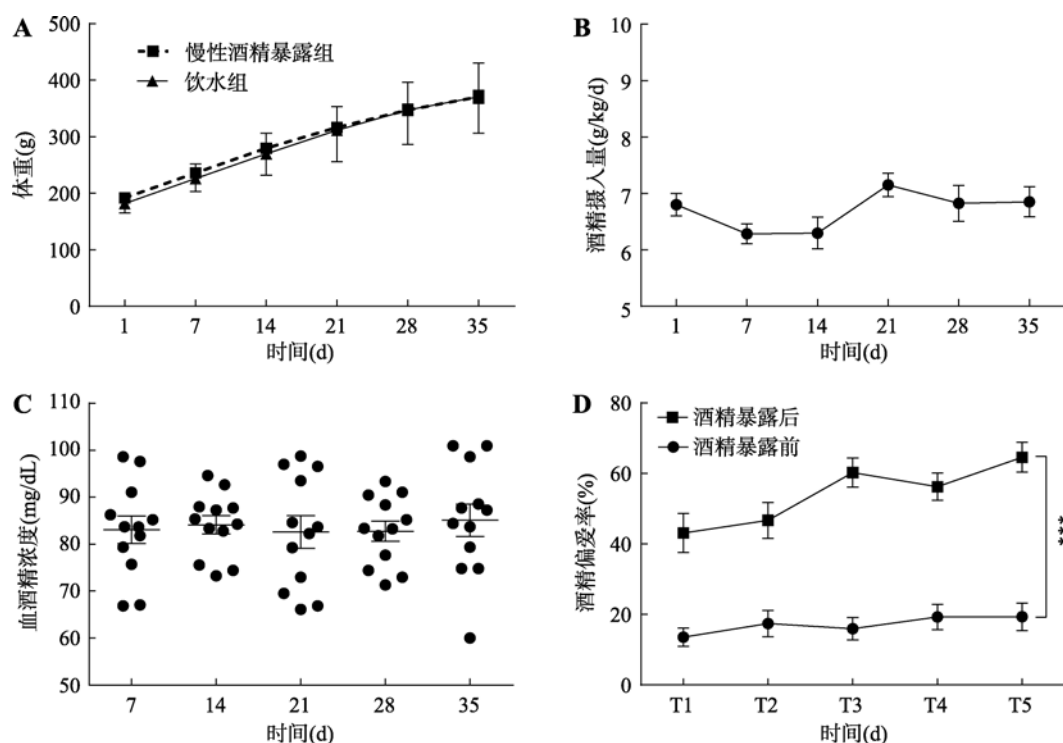


图 1 大鼠体重、饮酒量、血酒精浓度和酒精偏爱率的变化

Fig. 1 Changes of body weight, alcohol intake, BALs, and alcohol preference in rats

A: 慢性酒精暴露期间大鼠体重变化; B: 大鼠每天酒精摄入量; C: 血酒精浓度; D: 模型建立前后大鼠酒精偏爱率。与酒精暴露前相比, ***: $P<0.001$ 表示差异显著, $n=12$ /组。

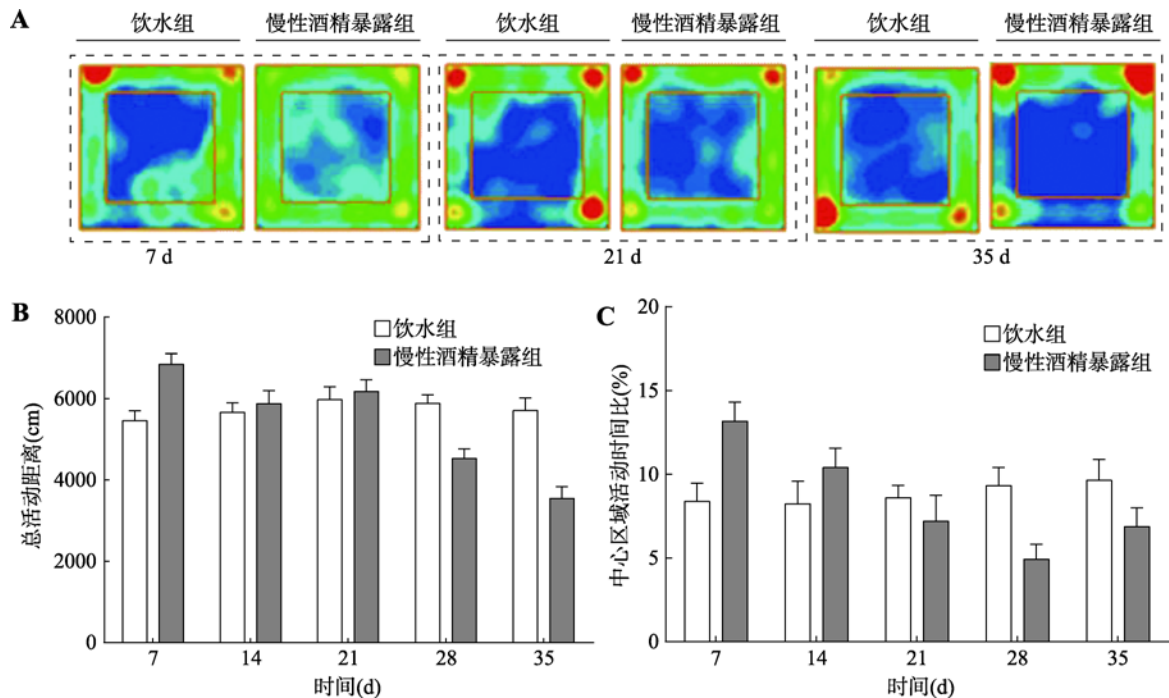


图 2 酒精暴露期间大鼠的旷场行为

Fig. 2 The open-field behavior in rats during alcohol exposure

A: 慢性酒精暴露第 7 d、21 d、35 d 大鼠旷场行为热图; B: 慢性酒精暴露第 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 大鼠总活动距离; C: 大鼠在中心区域停留时间比。

3635.22±208.12 cm (图 2B), 反映了慢性酒精暴露的抑制性作用。

同样, 本研究也检测了中心区域探索的时间百分比。重复测量的双因素方差分析显示, 时间因素显著影响了大鼠对中心区域的探索 [$F_{\text{Time}(4,88)}=4.607$, $P<0.05$], 而酒精因素所起的作用不大 [$F_{\text{Alcohol}(1,22)}=0.105$, $P=0.751$] (图 2C)。与总活动距离结果一致, 在饮酒第 7 d 和第 14 d 大鼠向中心区域探索的时间有增加趋势: 第 7 d, 饮水组: $8.38\pm1.10\%$ vs. 酒精暴露组: $13.18\pm1.13\%$; 第 14 d, 饮水组: $8.24\pm1.35\%$ vs. 酒精暴露组: $10.40\pm1.16\%$ 。随后这种差异在第 21 d 消失, 而在饮酒第 28 d 和 35 d 酒精暴露组大鼠向中心区域探索的时间有减少趋势: 第 28 d, 饮水组: $9.32\pm1.10\%$ vs. 酒精暴露组: $4.93\pm0.89\%$; 第 14 d, 饮水组: $9.64\pm1.25\%$ vs. 酒精暴露组: $6.87\pm1.13\%$ 。

2.3 慢性酒精暴露大鼠 mPFC 内 DNA 甲基化谱

双瓶选择实验之后, 分别选取饮水对照组和慢性酒精暴露组大鼠各 4 只, 立即将其处死, 分离

mPFC 核团, 提取 mPFC 总 DNA, 浓度和质量测定后分别选取每组 3 个样本进行 RRBS 测序。

从图 3A 可以看出, 两组样品中甲基化的胞嘧啶 CpG 类型的比例最高, 这是因为哺乳动物的胞嘧啶甲基化一般发生在 CpG 位点。其余类型的甲基化均较低, 对总甲基化水平贡献不大。对于不同胞嘧啶类型的甲基化水平, 尽管慢性酒精暴露组均略高于饮水对照组, 但总体上两组甲基化水平没有差异。为了更进一步分析 CpG 的甲基化变化, 本研究对两组样本的 CpG 进行了不同特征区域的注释(图 3B)。结果表明, 甲基化差异区域有 66% 存在于基因连接区, 23% 存在于内含子区, 9% 存在于外显子区, 2% 存在于启动子区。在所有甲基化存在差异的 CpG 位点, 仅有 2% 存在于启动子区的 CpG 岛, 4% 存在于 CpG 岛岸。

本研究进一步对甲基化水平差异最大的基因进行 GO 功能富集(Top 20)和 KEGG 通路分析(Top 30)。GO 结果显示, 差异基因多为突触相关基因、谷氨酸受体、跨膜转运体和离子通道, 这些基因与神经系统功能密切相关(图 3C)。通过对差异基因进行 KEGG

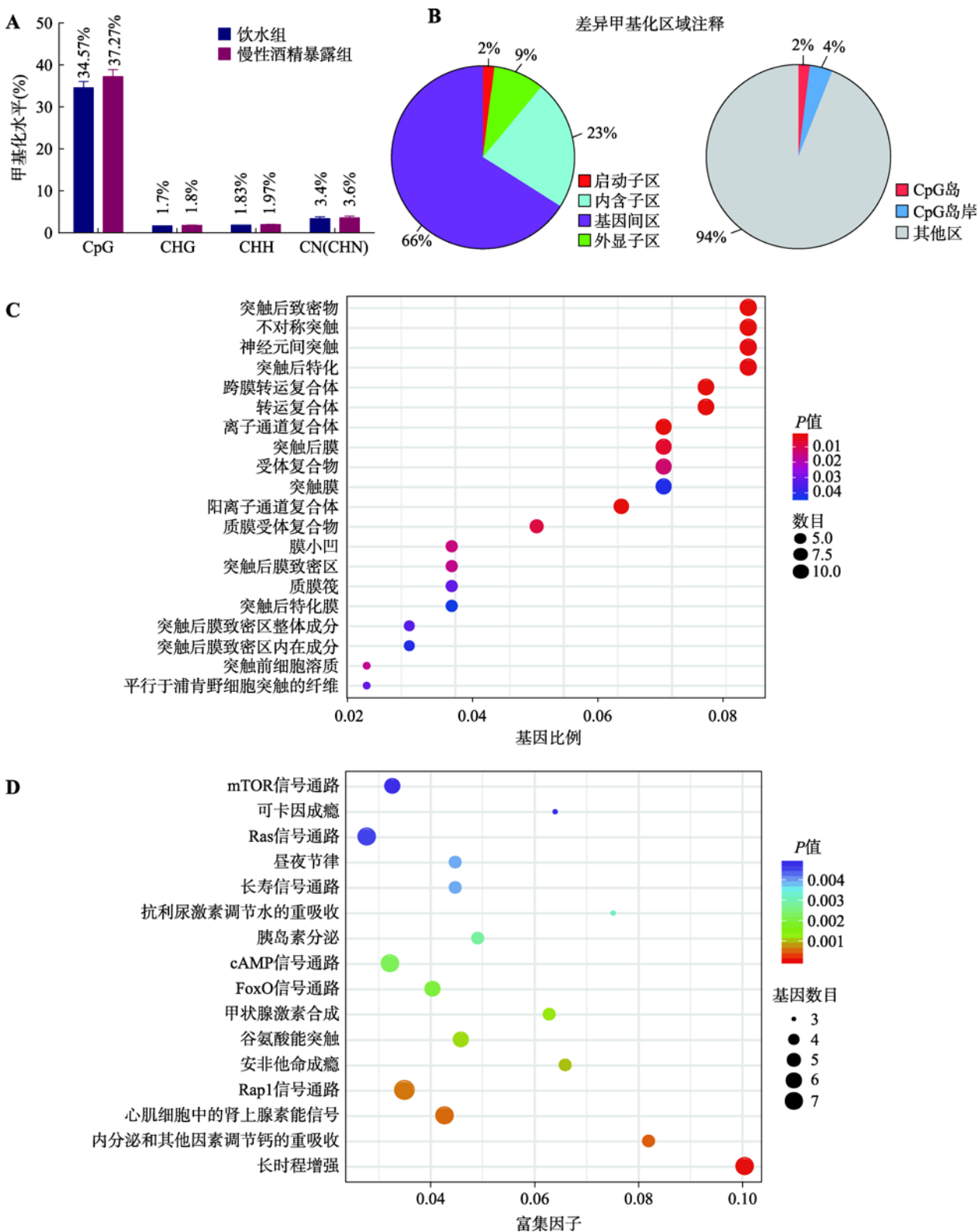


图 3 RRBS 测序结果
Fig. 3 Results of RRBS sequencing
A :两组样品中不同胞嘧啶类型的平均甲基化水平 ;B :差异甲基化区域在功能元件上的注释 ;C :甲基化基因的 GO 功能富集(Top 20) ;
D :甲基化差异基因的 KEGG 通路分析(Top 30)。不同胞嘧啶类型包括 CpG、CHG、CHH、CN ,H 代表除了 G 以外的 A、T、C 碱基。

通路分析,发现甲基化差异基因与 mTOR 信号通路、可卡因成瘾、Ras 信号通路、cAMP 信号通路、FoxO 信号通路、安非他命成瘾和 Rap1 信号通路等密切相关(图 3D)。

2.4 慢性酒精暴露大鼠 mPFC 内基因启动子区甲基化水平及酒精滥用相关基因的筛选

哺乳动物启动子区的 CpG 位点的甲基化水平与转录调节密切相关,因此本研究着重分析了启动子区 CpG 差异位点。为了更直观地表现出慢性酒精暴露组与饮水对照组大鼠 mPFC 内基因启动子区甲基化的差异,本研究对位于启动子区的 340 个差异位点进行了热图分析(图 4A)。热图中每一行为一个位点,每一列代表一个样本,左边 3 列为酒精暴露组,

右边 3 列为饮水组。最上边的树状结构表示不同样本间的聚类,本图中慢性酒精暴露组聚在一起,饮水对照组聚在一起,说明组内样本亲缘关系更近,样本聚类良好。左边的树状结构为差异位点的聚类关系。尽管两组样本 mPFC 内整体甲基化水平无显著差异,但在启动子区,慢性酒精暴露组的甲基化水平显著高于饮水对照组。其中与对照组相比,慢性酒精暴露组大鼠 mPFC 内存在 67 个低甲基化位点和 273 个高甲基化位点,这些位点涉及到 241 个已知基因。

通过滥用与成瘾数据库,并查阅相关文献,筛选出与药物依赖及酒精滥用密切相关的启动子区甲基化差异基因共 10 个。与饮水对照组大鼠相比,慢性酒精暴露组大鼠 mPFC 内基因启动子区甲基化升

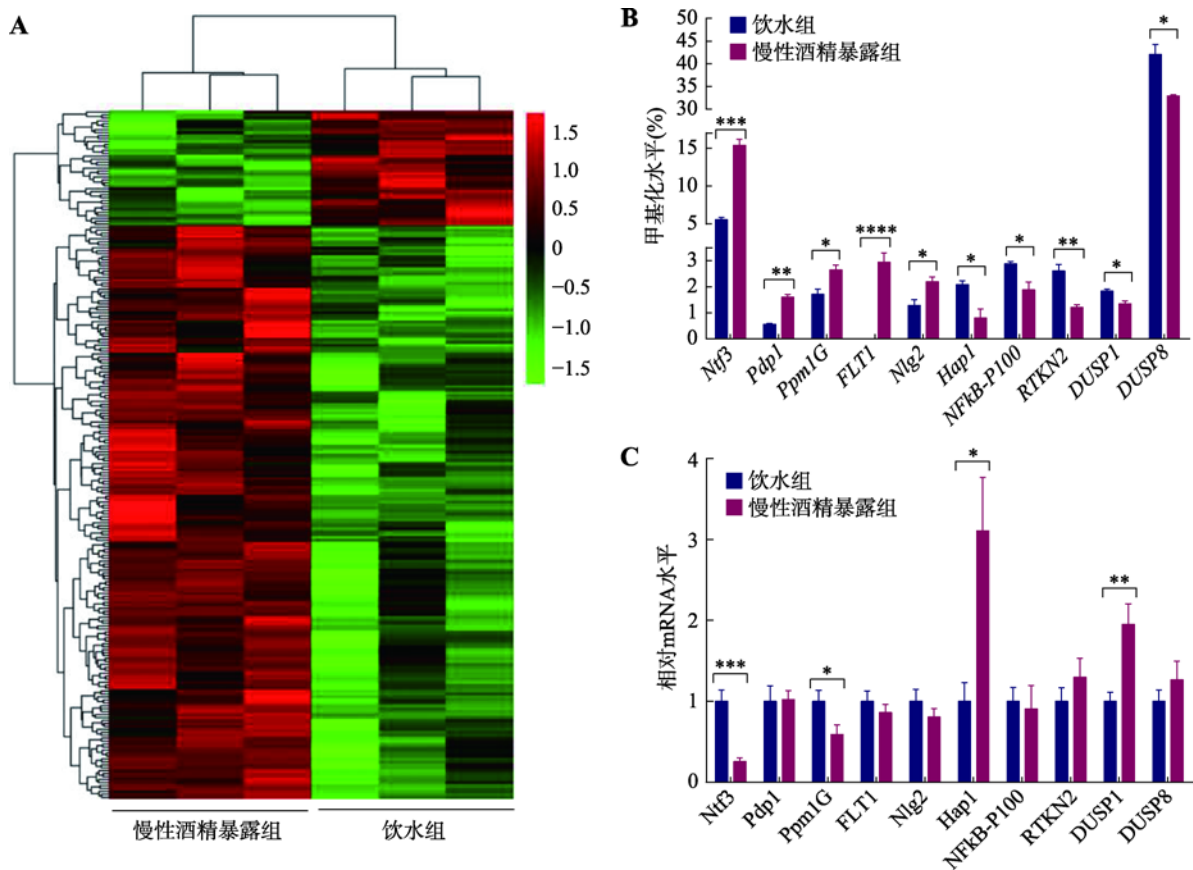


图 4 启动子区甲基化水平及甲基化差异基因转录验证

Fig. 4 The methylation levels of promoter region and transcription verification of methylation differential genes
A: 启动子区甲基化差异位点聚类图。红、黑、绿信号代表甲基化程度的高低,红色信号越强,代表甲基化程度越高,反之则代表甲基化程度越低。B:慢性酒精暴露组和饮水对照组 mPFC 内 10 个基因启动子区的甲基化程度。C:慢性酒精暴露组和饮水对照组 mPFC 内 10 个甲基化差异基因的 mRNA 表达水平。与饮水组相比, *: $P < 0.05$ 表示有差异, **: $P < 0.01$ 表示有明显差异, ***: $P < 0.001$ 表示差异显著, ****: $P < 0.0001$ 表示差异极显著。

高的基因包括神经营养因子 3 (neurotrophin factor-3, *Ntf3*) ($P<0.001$)、丙酮酸脱氢酶磷酸酶催化亚单元 1 (pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1, *Pdp1*) ($P<0.01$)、 Mg^{2+}/Mn^{2+} 依赖的蛋白质磷酸酶 1G (protein phosphatase- Mg^{2+}/Mn^{2+} -dependent-1G, *Ppm1G*) ($P<0.05$)、FMS 样酪氨酸激酶 1 (FMS-like tyrosine kinase 1, *FLT1*) ($P<0.0001$) 和神经连接蛋白 2 (neuroligin 2, *Nlg2*) ($P<0.05$) , 启动子区甲基化降低的基因包括亨廷顿相关蛋白 1 (huntingtin-associated protein 1, *Hap1*) ($P<0.05$)、核因子 κ B (nuclear factor kappa B p100, *NF κ B-p100*) ($P<0.05$)、RTKN 蛋白 2 (rhotekin 2, *RTKN2*) ($P<0.01$)、双特异性磷酸酶 1 (dual specificity phosphatase 1, *DUSP1*) ($P<0.05$) 和双特异性磷酸酶 8 (dual specificity phosphatase 8, *DUSP8*) ($P<0.05$) (图 4B)。

本研究进一步利用 qRT-PCR 对这 10 个甲基化差异基因进行转录水平的验证(图 4C)。结果表明, 慢性酒精暴露后, 大鼠 mPFC 内 *Ntf3*、*Ppm1G* 启动子区 CpG 位点甲基化水平升高, 抑制转录, 导致其 mRNA 水平降低; 而 *Hap1* 和 *DUSP1* 启动子区 CpG 位点甲基化水平降低, 解除或削弱了转录抑制作用, 导致其 mRNA 水平升高。

2.5 慢性酒精暴露大鼠 mPFC 内甲基化调控酶的表达

经过 35 d 的慢性酒精暴露和 5 d 的双瓶选择, 本研究检测了大鼠 mPFC 内 DNMTs 和 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达改变(图 5)。非配对 t 检验显示, 相较于饮水对照组, 酒精暴露组大鼠 mPFC 内的 DNMT1 (蛋白: $t=0.824$, $P=0.424$; mRNA: $t=0.885$, $P=0.391$) 和 DNMT3A (蛋白: $t=1.510$, $P=0.153$; mRNA: $t=0.064$, $P=0.950$) 表达无明显改变, 而 DNMT3B (蛋白: $t=9.800$, $P<0.0001$; mRNA: $t=5.364$, $P<0.0001$) 和 MeCP2 (蛋白: $t=13.94$, $P<0.0001$; mRNA: $t=4.652$, $P<0.001$) 表达显著升高。

2.6 短期酒精暴露对大鼠 mPFC 内甲基化调控酶的影响

为了明确短期内酒精暴露对甲基化调控酶的作用, 让大鼠自由饮酒 7 d 后, 本研究检测了 mPFC 内 DNMTs 和 MeCP2 的蛋白和 mRNA 表达改变(图 6)。

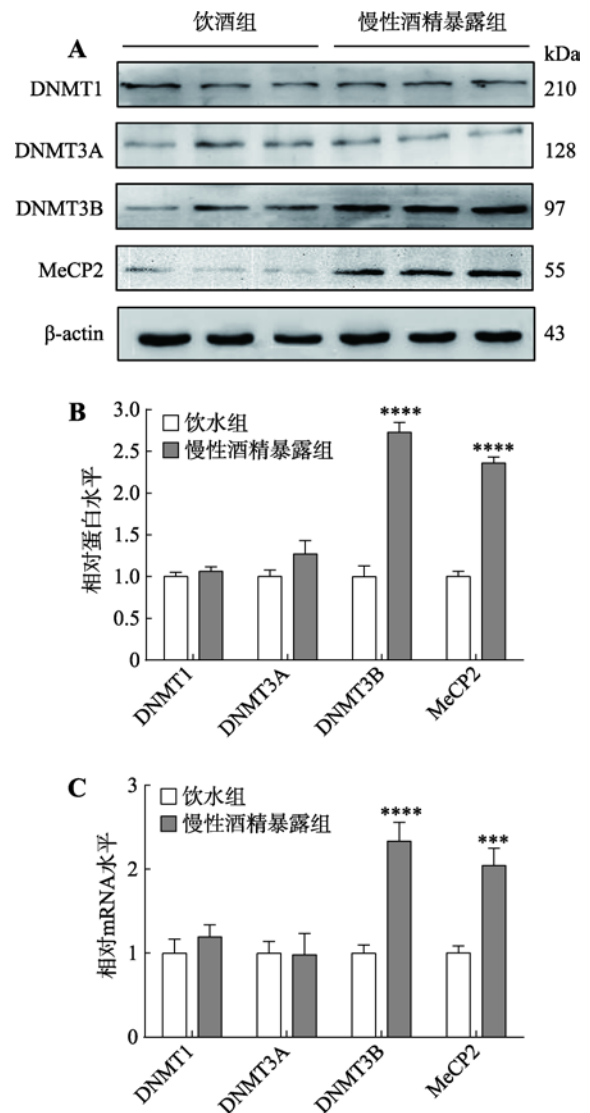


图 5 慢性酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 蛋白及 mRNA 表达改变

Fig. 5 Changes in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B and MeCP2 protein and mRNA expression in rats mPFC tissue after chronic alcohol exposure

A: 慢性酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 蛋白条带; B: 慢性酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 蛋白表达; C: 慢性酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 的 mRNA 表达。与饮水组比较, ***: $P<0.001$ 表示差异显著, ****: $P<0.0001$ 表示差异极显著。

非配对 t 检验显示, 短期酒精暴露不影响 DNMT1 (蛋白: $t=0.092$, $P=0.928$; mRNA: $t=0.440$, $P=0.670$)、DNMT3A (蛋白: $t=0.153$, $P=0.880$; mRNA: $t=0.209$, $P=0.739$)、DNMT3B (蛋白: $t=0.198$, $P=0.846$; mRNA:

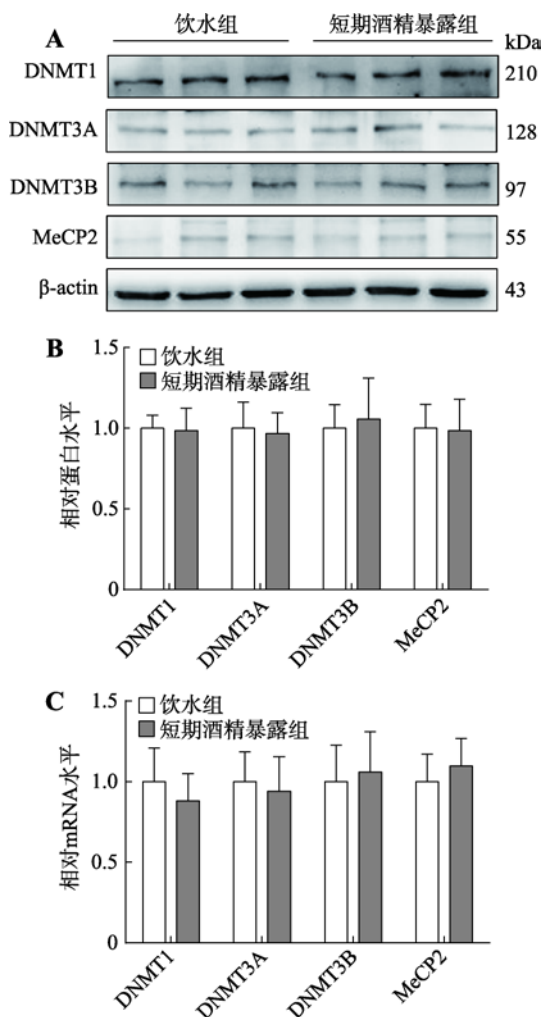


图 6 短期酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 蛋白和 mRNA 表达改变

Fig. 6 Changes of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, and MeCP2 protein and mRNA levels in the rats mPFC tissue after short-term alcohol exposure

A: 短期酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 蛋白条带; B: 短期酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 的蛋白表达; C: 短期酒精暴露后大鼠 mPFC 内 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B 和 MeCP2 的 mRNA 表达。

$t=0.182$, $P=0.859$) 和 MeCP2 (蛋白: $t=0.060$, $P=0.953$; mRNA: $t=0.394$, $P=0.653$) 的表达。

3 讨论

酒精滥用是一种由遗传因素和环境因素共同作

用的复杂疾病, 涉及奖赏、动机、学习记忆、情绪和执行功能等多种神经生物学过程, 尽管科研人员对其神经生物学机制进行了深入研究, 但尚未研发出有效的药物。前额叶皮质参与调控认知、情感、情绪、动机、决策等生物学进程, 其中 mPFC 与酒精滥用引起的神经适应性改变密切相关。DNA 甲基化在长时程记忆的形成以及药物成瘾中都具有重要作用, DNMTs 可通过催化 5'-CpG-3' 上的胞嘧啶发生甲基化来调节下游基因的表达, 从而产生持久的神经生物学改变并最终影响个体行为调控, 然而在 mPFC 内 DNMTs 的活性对于酒精相关行为的调控作用仍不清楚。

本研究建立大鼠慢性酒精暴露模型, 检测了大鼠的自主活动和焦虑样行为, 发现在饮酒第 7 d 酒精暴露组大鼠总活动距离和中心区域探索时间比饮水对照组高, 表明短期内低浓度饮酒, 可以增加大鼠的自主活动量, 并在一定程度上减轻焦虑样情绪。随着饮酒时间的增加, 在连续饮酒 21 d 后酒精暴露组与饮水对照组大鼠之间活动总距离和中心区探索时间差异逐渐缩小, 反映了长期饮酒后大鼠对酒精的适应性。而饮酒 28 d 后, 大鼠总活动距离和中心区探索时间又减少并低于饮水对照组, 表明慢性低浓度饮酒给大鼠带来了不适感, 减少了大鼠的自主活动量, 并加重了大鼠的焦虑样行为。与本研究结果一致的是, Boerngen-Lacerda 等^[13]发现 2 g/kg 的酒精对小鼠急性灌胃或灌胃 7 d, 均增加了小鼠对高架十字迷宫开臂的探索时间和旷场实验的自主活动距离。出生 4~9 d 的雄性大鼠幼崽暴露在 5.25 g/kg/d 的酒精环境下连续一个月, 活动性和探索行为均降低, 并且社交行为变少^[14]。大量的动物实验和临床资料表明, 焦虑与酒精滥用两者之间存在复杂的交互联系^[15,16]。酒精滥用和依赖作为慢性复发性疾病, 在发展过程中焦虑起了促进作用^[17]。短期内饮酒降低短时程焦虑, 而长期饮酒反而增加长时程焦虑。多数慢性饮酒或酒精戒断能够通过生理-心理-社会机制引起显著的焦虑症状。个体饮用一定浓度酒精后, 酒精的心理或药理作用可以缓解焦虑症状, 在此过程中, 酒精通过负强化作用促进焦虑个体提高饮酒量和饮酒频率^[18]。

尽管 DNA 甲基化异常可以增加很多疾病的患

病风险, 酒精滥用的甲基化研究尚处于早期阶段。目前的研究偏向于饮酒个体外周血的基因组甲基化或酒精诱导的某个基因甲基化的异常。有研究表明酒精滥用患者外周血 DNA 甲基化较健康对照组显著升高, 伴随 DNMT3A 和 DNMT3B mRNA 水平的降低^[19,20]。利用甲基化芯片对台湾地区酒依赖患者外周血全基因组 DNA 进行检测, 发现酒依赖组整体 DNA 甲基化程度较对照组明显升高^[21]。与血液基因组相比, 来自大脑基因组的甲基化差异更能说明酒精相关行为的中枢控制机制。本研究通过提取慢性酒精暴露大鼠 mPFC 基因组 DNA, 进行 RRBS 测序分析, 发现两组大鼠 mPFC 内整体基因组甲基化无显著差异, 但仍有 911 个高甲基化差异甲基化区域 (differentially methylated region, DMR) 和 560 个低甲基化 DMR, 进一步分析启动子发现, 慢性酒精暴露组大鼠 mPFC 启动子区甲基化水平显著高于饮水对照组。通过对差异基因的功能富集分析和通路分析, 本研究筛选出与酒精滥用密切相关的甲基化差异基因 *Ntf3*、*Ppm1G*、*Hap1* 和 *DUSP1*, 在 mRNA 水平验证了其表达。其中, *Ntf3* 在神经元分化、突触发育和可塑性起关键的调控作用^[22,23], 本实验室前期研究也证实 *Ntf3* 是酒精滥用的靶基因^[12]。Ruggeri^[9] 等对 18 对患有酒精使用障碍的单卵双胞胎外周血 DNA 进行了全基因组甲基化分析, 证明 *Ppm1G* 与酒精使用障碍和行为控制期间的大脑活动有关。此外, *Hap* 通过影响钙信号通路从而调控神经元兴奋性^[24,25]。同时, *DUSP1* 可以使丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPK) 苏氨酸/酪氨酸残基特异性去磷酸化, 从而调控细胞的生长、分化、增殖及凋亡^[26]。以上甲基化差异基因的筛选为酒精滥用的分子机制提供了可能靶点。

DNA 甲基化是由甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMTs) 调控的。DNMTs 大致分为两类: (1) 从头甲基化酶, 包括 DNMT3A 和 DNMT3B, 在未经甲基化的 DNA 上建立初始甲基化模式; (2) 维持甲基化酶 DNMT1, 在 DNA 复制过程中将甲基化模式从亲本 DNA 链上复制到子代链^[27,28]。DNMTs 的这些独特功能可以确保 DNA 甲基化模式在不同个体中以组织特异性方式维持和保存。此外, DNMTs、

甲基化 CpG 位点结合蛋白-2 (MeCP2)、HMTs、HDACs 可能通过复杂的交互作用影响 DNA 的甲基化水平, 调节相关基因的表达, 从而对酒精相关表型发挥作用^[29]。DNMT1 和 DNMT3A 基因双敲除小鼠 Hip 神经元体积减小, 学习和记忆能力受损^[30]。大鼠伏隔核 (nucleus accumbens, NAc) 中 DNMT3A 过表达能够增加相应神经元的树突棘密度, 同时减弱可卡因诱导的奖赏效应^[31]。MeCP2 基因敲除小鼠比野生型小鼠对酒精有更强的敏感性和戒断效应^[32]。本研究也发现, 慢性酒精暴露后, 大鼠 mPFC 内 DNMT3B 和 MeCP2 表达升高。由此看来, 动态的 DNA 甲基化调节对酒精相关表型的改变和维持至关重要, 而 DNMTs 和 MeCP2 作为 DNA 甲基化的调控者, 所起的重要作用不言而喻。然而, 大鼠饮酒 7 d, 其 mPFC 内 DNMTs 和 MeCP2 未发生显著改变。由于表观遗传修饰是环境因素长期刺激的结果, 并可以遗传给后代^[33], 猜测短期酒精作用不足以引起甲基化调控酶及 DNA 甲基化谱的改变。

本研究成功建立了大鼠慢性酒精暴露模型, 获得慢性酒精暴露大鼠 mPFC 内 DNA 甲基化谱, 并筛选出与酒精滥用相关的基因 *Ntf3*、*Ppm1G*、*Hap1* 和 *DUSP1*, 且明晰了调控 DNA 甲基化的关键酶, 为未来表观遗传学在酒精滥用中的机制研究提供了基础, 将来尚需从以下两个方面进行深入研究: (1) 所得甲基化谱样本量太小, 应该针对与酒精滥用相关的甲基化差异基因, 采用 BSP 挑克隆测序进行扩大样本量验证, 使筛选出的差异基因更可靠。(2) 本研究发现 DNMT3B 和 MeCP2 调控酒精诱导的 DNA 甲基化的改变, 接下来应运用甲基转移酶特异性干预剂验证它们在酒精滥用中的作用。

参考文献 (References):

- [1] Peacock A, Leung J, Larney S, Colledge S, Hickman M, Rehm J, Giovino GA, West R, Hall W, Griffiths P, Ali R, Gowing L, Marsden J, Ferrari AJ, Grebely J, Farrell M, Degenhardt L. Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*, 2018, 113(10): 1905–1926. [DOI]
- [2] WHO. Global status report on alcohol and health. *World Health Organization*, 2014. [DOI]

- [3] Lu SJ, Du SM, Hu XQ, Zou SR, Liu WJ, Ba L, Ma GS. Drinking patterns and the association between socio-demographic factors and adolescents' alcohol use in three metropolises in China. *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12(2): 2037–2053. [DOI]
- [4] Antonelli M, Ferrulli A, Sestito L, Vassallo GA, Tarli C, Mosoni C, Rando MM, Mirijello A, Gasbarrini A, Addolorato G. Alcohol addiction-the safety of available approved treatment options. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(2): 169–177. [DOI]
- [5] Yang X, Zhang H, Lai J. Alcohol dependence mediated by monoamine neurotransmitters in the central nervous system. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(1): 11–20.
杨晓华, 张华峰, 赖江华. 中枢单胺类神经递质在酒精依赖中的分子作用机制. *遗传*, 2014, 36(1): 11–20. [DOI]
- [6] He GF, Zhong SR, Jing Q. Genetic polymorphism for genes of alcohol dependence. *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30(4): 413–418.
贺良峰, 钟树荣, 景强. 酒精依赖相关基因的遗传多态性. *遗传*, 2008, 30(4): 413–418. [DOI]
- [7] Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, 2014, 76: 259–268. [DOI]
- [8] Zhu ZZ, Hou LF, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, Yang AS, Vokonas P, Lissowska J, Fustinoni S, Pesatori AC, Bonzini M, Apostoli P, Costa G, Bertazzi PA, Chow WH, Schwartz J, Baccarelli A. Predictors of global methylation levels in blood DNA of healthy subjects: a combined analysis. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(1): 126–139. [DOI]
- [9] Ruggeri B, Nymberg C, Vuoksima E, Lourdasamy A, Wong CP, Carvalho FM, Jia T, Cattrell A, Macare C, Banaschewski T, Barker GJ, Bokde AL, Bromberg U, Büchel C, Conrod PJ, Fauth-Bühler M, Flor H, Frouin V, Gallinat J, Garavan H, Gowland P, Heinz A, Ittermann B, Martinot JL, Nees F, Pausova Z, Paus T, Rietschel M, Robbins T, Smolka MN, Spanagel R, Bakalkin G, Mill J, Sommer WH, Rose RJ, Yan J, Aliev F, Dick D, Kaprio J, Desrivières S, Schumann G. Association of protein phosphatase PPM1G with alcohol use disorder and brain activity during behavioral control in a genome-wide methylation analysis. *Am J Psychiatry*, 2015, 172(6): 543–552. [DOI]
- [10] Barker JM, Zhang YQ, Wang F, Taylor JR, Zhang HP. Ethanol-induced Htr3a promoter methylation changes in mouse blood and brain. *Alcohol Clin Exp Res*, 2013, 37(s1): E101–E107. [DOI]
- [11] Barbier E, Tapocik JD, Juergens N, Pitcairn C, Borich A, Schank JR, Sun H, Schuebel K, Zhou Z, Yuan Q, Vendruscolo LF, Goldman D, Heilig M. DNA methylation in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-induced behavior and plasticity. *J Neurosci*, 2015, 35(15): 6153–6164. [DOI]
- [12] Qiao XM, Yin FY, Ji YY, Li YX, Yan P, Lai JH. 5-Aza-2'-deoxycytidine in the medial prefrontal cortex regulates alcohol-related behavior and Ntf3-TrkC expression in rats. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179469. [DOI]
- [13] Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacol Biochem Behav*, 2000, 67(2): 225–232. [DOI]
- [14] Boschen KE, Hamilton GF, Delorme JE, Klintsova AY. Activity and social behavior in a complex environment in rats neonatally exposed to alcohol. *Alcohol* 2014; 48: 533–541. [DOI]
- [15] Buckner JD, Terlecki MA. Social anxiety and alcohol-related impairment: The mediational impact of solitary drinking. *Addict Behav*, 2016, 58: 7–11. [DOI]
- [16] Colombo G, Lobina C, Lorrai I, Acciaro C, Maccioni P, Gessa GL. Binge drinking and anxiety at the end of the nocturnal period in alcohol-preferring sP rats. *Alcohol*, 2017, 63: 27–32. [DOI]
- [17] Thorberg FA, Young RM, Hasking P, Lyvers M, Connor JP, London ED, Huang YL, Feeney GFX. Alexithymia and alcohol dependence: The roles of negative mood and alcohol craving. *Subst Use Misuse*, 2019, 54(14): 1–7. [DOI]
- [18] Charlet K, Heinz A. Harm reduction-a systematic review on effects of alcohol reduction on physical and mental symptoms. *Addict Biol*, 2017, 22(5): 1119–1159. [DOI]
- [19] Bönsch D, Lenz B, Fiszer R, Frieling H, Kornhuber J, Bleich S. Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm (Vienna)*, 2006, 113(9): 1299–1304. [DOI]
- [20] Bönsch D, Lenz B, Reulbach U, Kornhuber J, Bleich S. Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *J Neural Transm (Vienna)*, 2004, 111(12): 1611–1616. [DOI]
- [21] Weng JT, Wu LS, Lee CS, Hsu PW, Cheng AT. Integrative epigenetic profiling analysis identifies DNA methylation changes associated with chronic alcohol consumption. *Comput Biol Med*, 2015, 64: 299–306. [DOI]
- [22] Usui N, Watanabe K, Ono K, Tomita K, Tamamaki N, Ikenaka K, Takebayashi H. Role of motoneuron-derived

- neurotrophin 3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation. *Development*, 2012, 139(6): 1125–1132. [DOI]
- [23] Han KA, Woo D, Kim S, Choi G, Jeon S, Won SY, Kim HM, Heo WD, Um JW, Ko J. Neurotrophin-3 regulates synapse development by modulating trkc- $\text{ptp}\sigma$ synaptic adhesion and intracellular signaling pathways. *J Neurosci*, 2016, 36(17): 4816–4831. [DOI]
- [24] Tang TS, Tu HP, Chan EYW, Maximov A, Wang ZN, Wellington CL, Hayden MR, Bezprozvanny I. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*, 2003, 39(2): 227–239. [DOI]
- [25] Czeredys M, Vigont VA, Boeva VA, Mikoshiba K, Kaznacheyeva EV, Kuznicki J. Huntingtin-associated protein 1a regulates store-operated calcium entry in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of huntington's disease. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 381. [DOI]
- [26] Kim SH, Yu HS, Park HG, Park S, Seo MS, Jeon WJ, Ahn YM, Ha K, Shin SY, Kim YS. Role of MKP-1 (DUSP1) in clozapine-induced effects on the ERK1/2 signaling pathway in the rat frontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, 2013, 230: 425–437. [DOI]
- [27] Turek-Plewa J, Jagodziński PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, 2005, 10(4): 631–647. [DOI]
- [28] Dajun D. DNA methylation and demethylation: current status and future perspective. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(5): 403–410.
邓大君. DNA 甲基化和去甲基化的研究现状及思考. *遗传*, 2014, 36(5): 403–410. [DOI]
- [29] Heyward FD, Sweatt JD. DNA methylation in memory formation: emerging insights. *Neuroscientist*, 2015, 21(5): 475–489. [DOI]
- [30] Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan GP. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*, 2010, 13(4): 423–430. [DOI]
- [31] LaPlant Q, Vialou V, Covington HE, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthall W, Hollis F, Wang H, Noonan MA, Ren Y, Eisch AJ, Bolaños CA, Kabbaj M, Xiao G, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan G, Morrison JH, Nestler EJ. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 2010, 13(9): 1137–1143. [DOI]
- [32] Repunte-Canonigo V, Chen J, Lefebvre C, Kawamura T, Kreifeldt M, Basson O, Roberts AJ, Sanna PP. MeCP2 regulates ethanol sensitivity and intake. *Addict Biol*, 2014, 19(5): 791–799. [DOI]
- [33] Zhang HP, Gelernter J. Review: DNA methylation and alcohol use disorders: Progress and challenges. *Am J Addict*, 2017, 26(5): 502–515. [DOI]

(责任编辑: 吴强)