

# 酒精刺激可能通过对突触功能相关基因表观修饰 降低秀丽隐杆线虫子代的学习能力

中国人民大学附属中学 李滢蔚 王凤仪 黄咏歆  
指导老师 戴亚 王香明

**摘要：**“酗酒”会降低人的学习能力，而这种影响是否可以影响后代尚不明确。为此，本研究采用秀丽隐杆线虫为模式生物研究酒精处理对子代学习能力的影响。用低浓度酒精处理亲代，通过机械刺激的方法对线虫进行非联合型学习训练，记录亲代及子代对刺激的适应能力。实验结果表明：酒精刺激削弱了亲代的学习能力，子代的学习能力也下降，但是这种学习能力被抑制的现象逐代减弱，直至子三代完全消失。另外，当酒精仅处理雄性线虫，而与其交配的雌雄同体线虫不受酒精刺激时，杂交后代学习能力仍然下降，表明酒精可能通过表观遗传机制而不是母体效应来影响子代学习能力。进一步利用神经发育突变体发现，神经突触在介导酒精对学习能力的影 响中发挥重要作用。本研究为深入研究酒精影响子代学习能力的表观遗传分子机理奠定了基础。

**关键词：**秀丽隐杆线虫 酒精 机械刺激 学习能力 表观遗传

**Abstract:** The excessive drinking reduces the human learning ability. Nevertheless, it is still not clear whether this kind of effect is able to be passed down to the progenies. In order to study the effect of parental ethanol stimulation on offspring learning ability, we treated the worms with low-concentration ethanol and conducted the non-cooperative learning test for both the parents and offspring. The results show that alcohol stimulation weakens the learning ability of the parents and their offspring. And as the generation grows, this phenomenon becomes less notable. In addition, when male nematodes were stimulated by ethanol, while the hermaphrodites were not, the learning ability of the hybrid progenies is decreased, indicating that ethanol may affect the learning ability of the offspring through epigenetic mechanism rather than maternal effect. By using mutants, we further study the role of synapses in controlling the influence of alcohol on the worms' learning abilities. Our research lays foundation for the study of the epigenetic molecular mechanisms of the effects that alcohol would reduce the learning ability of offspring.

**Key Words:** *Caenorhabditis elegans*; ethanol; mechanical stimulation; learning; epigenetics

## 1 引言

众所周知, 过度饮酒会降低人的记忆力以及认知能力<sup>[1]</sup>。然而父母酗酒是否会对子女的学习能力产生影响却没有确切证据。

关于学习的分子机制, 以往多采用大鼠、小鼠、果蝇等模式生物进行研究。近年来, 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 以其结构简单、神经功能复杂多样的优势, 引起了人们的极大兴趣, 也成为研究学习行为的理想模式生物。秀丽隐杆线虫的两性成虫仅有 959 个体细胞, 雄性成虫只有 1031 个体细胞, 其神经系统仅有 302 个神经细胞, 但其中却含有与高等动物神经系统类似的众多神经递质, 其神经系统的活动与高等动物具有高度相似性, 对机械感觉、化学物质、温度等外界刺激具有灵敏的感知及反应能力<sup>[2]</sup>。线虫的学习性行为是指线虫在经历某种刺激之后某种行为的改变。线虫学习行为包括非联合型学习和联合型学习。前者可对单个刺激, 如机械、温度或化学刺激做出有效反应, 并体现习惯化、非习惯化和敏感化反应; 后者可将两种刺激联系在一起, 从而通过其中一种刺激作为线索来寻找食物或躲避有害的环境<sup>[3]</sup>。

人类对于酒精的行为反应包括低剂量酒精使人运动不协调和抑制社会性活动以及高剂量使人兴奋抑制和语无伦次。酒精对于人类行为的改变在相似剂量下同样对无脊椎动物有影响, 说明确实可以将无脊椎动物作为研究酒精影响的实验对象<sup>[4][5]</sup>。在研究酒精的影响方面, 将秀丽隐杆线虫作为研究对象已经有了一定的实验基础。已有文献报道: 不同浓度的酒精刺激会对线虫的寿命、爬行轨迹、身体摆动频率、吞咽频率、产卵数、产卵速度、寿命、发育状况 (体长) <sup>[6][7][8]</sup> 等方面有抑制作用, 而且抑制程度随着酒精浓度的升高而增大。酒精处理影响线虫的联合性学习行为也有报道<sup>[9]</sup>。

越来越多的证据表明, 在不改变遗传物质 DNA 序列的情况下, 亲代可以在不良营养习惯和环境压力产生的某些获得性性状遗传给下

一代。这种传递通常是经过表观遗传的方式进行的。例如, 妊娠期营养不良导致孕育的子一代和子二代个体较小、且更易患糖尿病, 这是由亲代小鼠精子 DNA 甲基化水平发生了变化所导致的<sup>[10]</sup>。再比如, 父辈对某种气味的恐惧情绪的记忆也会影响子代, 其子代 (包括子三代) 对同样的气味非常敏感并表现出恐惧感, 这也是由亲代小鼠精子 DNA 甲基化水平发生了变化所导致的<sup>[11]</sup>。

我们通过对线虫受机械刺激产生非联合性学习行为的研究<sup>[12]</sup>, 发现亲代受到酒精刺激会影响子代的学习能力; 该影响是通过表观遗传的机理; 进一步的研究发现酒精影响线虫的学习能力与突触功能有关。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验试剂及配方

NGM 培养基: 0.003g/ml NaCl, 0.0025/ml 蛋白胨, 0.017g/ml 琼脂, 高压蒸汽灭菌。倒培养基时用微波炉将锥形瓶中的融化, 60°C 水浴保温, 在融化为液体的 NGM 培养基中加入 0.01% 1M MgSO<sub>4</sub> 溶液、0.01% 1M CaCl<sub>2</sub> 溶液、2.5% 1M pH=6 的磷酸钾溶液、0.05% 溶于 95% 酒精中的 10mg/ml 的胆固醇溶液。(MgSO<sub>4</sub> 溶液、CaCl<sub>2</sub> 溶液、磷酸钾均高压灭菌)

M9 : 5.8g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.0g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5g/L NaCl, 1.0g /L NH<sub>3</sub>Cl, 高压蒸汽灭菌。

裂解液: 20% 次氯酸钠, 10% 5M 的 NaOH, 70% 无菌水。

### 2.2 线虫株系

N2

MT6308: *eat-4(ky5)III*

RB630: *rpm-1(ok364)IV*

BZ142: *slo-1(eg142)*

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 饲养线虫

采用无菌操作, 在直径为 6cm 的培养皿中倒入灭菌的 NGM 培养基, 凝固后接种适量

OP50 菌液。室温培养 OP50 一天后, 将适量线虫转移至含 OP50 的 NGM 培养基内。NGM 培养基上的食物 OP50 始终保持充足。将线虫置于 20°C 生化培养箱中进行培养。

### 2.3.2 线虫产卵量检测

从培养皿中取 10 条 L4 时期的线虫, 放入新的接种 OP50 培养皿中, 等待约 24 个小时后, 统计培养皿中虫卵总数。

### 2.3.3 同步化线虫

观察线虫已进入产卵期, 此时将线虫收集、裂解以获得卵。具体方法为: 在直径 6 厘米的培养基上加 3 毫升 M9, 轻摇晃培养皿使线虫漂浮, 若有线虫粘在培养基上, 用玻璃吸管吸取 M9 进行冲洗。再用移液枪将含有线虫的 M9 转移入已灭菌的 1.5ml 塑料离心管中, 在盖子上标明虫子名称, 用离心机离心 20 秒, 使虫体沉淀到管底部。

用移液枪将上层清液吸出, 加入裂解液至 1.5ml, 颠倒混匀。当看到塑料管底部的虫体略微发黄, 在体视镜下检查可以看到卵, 再用离心机将其离心 20 秒, 使虫卵沉淀到管底部。此过程最多不超过 5min。

吸出上清中的裂解液, 加入 M9 洗几次, 将管底部的虫卵放到 NGM 培养基无 OP50 的部分, 即可获得同步化的线虫。

### 2.3.4 线虫的酒精处理

线虫的酒精处理参考了 Mitchell 等人的方法<sup>[8]</sup>, 根据本实验的目的和实验条件稍做了修改。将 350ul OP50 接种在 NGM 培养基的一侧。第二天将培养基敞口放置在超净工作台中, 用 100 的风档吹 1 小时。在无大肠杆菌的一侧加入乙醇溶液。倾斜培养皿并缓慢转动使酒精被培养基充分、快速吸收, 待吸收完全后即为酒精处理的培养皿。作为对照的培养基则加入等体积无菌水。处理后, 立即将裂解好的虫卵转移到该培养基上无大肠杆菌也没有接触到酒精的一侧, 迅速用封口膜将培养皿密封, 放入 20°C 恒温培养箱培养。

### 2.3.5 线虫对机械刺激的学习性行为检测

线虫的学习性行为检测参考了 Kitamura<sup>[12]</sup>的方法, 挑选无污染, 没有饥饿的健康 L4 线虫, 放入含有 OP50 的 NGM 培养基上。每个平板上放置一条线虫。让其在培养基上适应 20 分钟后开始测试。首先, 打开电脑软件, 点击“采集”, 调整好显微镜, 使虫子在屏幕中央, 点击“录像”。用眉毛轻触线虫头部, 间隔 15 秒, 再次用眉毛轻戳线虫头部, 等待期间不移动板子。不断重复直至线虫不再后退, 点击“停止”, 记录线虫后退次数。

酒精处理的亲代线虫经过机械刺激后, 分别转移到不含酒精的不同培养基上。当其后代长到 L4 时期时对其进行学习性行为检测。

## 2.4 统计分析

在每组实验中我们以基因型相同, 同时处理, 手法一致的至少 10 条线虫为一组进行统计。通过 excel 中 t-test 对数据进行分析 ( $n \geq 3$ )。

## 3 实验结果

### 3.1 不同浓度酒精刺激对线虫运动和产卵量的影响

研究表明酒精刺激会对线虫的产卵数量、产卵期时长、生长速度、运动速度、运动形态等方面造成影响, 并且这些影响与酒精浓度呈正相关<sup>[6][7][8]</sup>。由于本研究酒精刺激亲代对后代学习性行为的影响, 是根据线虫受机械刺激后的后退运动来检测的, 因此应该尽可能避免高浓度酒精影响线虫产卵数及线虫的运动。为此我们先进行了预实验, 寻找不影响线虫产卵、运动和生长的最高酒精浓度。

我们将线虫分为 6 组, 分别用不同的酒精浓度处理 (图 1)。我们发现加入酒精浓度为 1% 时, 酒精显著降低线虫产卵量, 而酒精浓度为 0.8% 时产卵量未被显著降低。我们同时观察了每组线虫的运动速度和爬行时的弯曲程度。在酒精浓度为 0.8% 时, 线虫的运动速度和弯曲程度与对照组基本上相同, 未受影响。

综合考虑以上实验结果, 我们在后续学习能力检测实验中选择使用的酒精浓度为 0.8%。

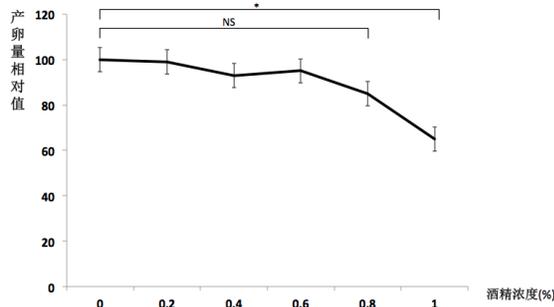


图 1. 不同浓度酒精处理后线虫产卵数量。用水或一系列不同浓度的酒精处理线虫, 至 L4 时期取出, 24 小时后统计产卵数。(\* P<0.05; NS, 无显著差异; n=3)。

### 3.2 酒精刺激使亲、子代线虫学习能力均下降

为了使酒精处理效果明显, 我们对亲代进行了最长时间的处理: 从裂解得到同步化的卵开始, 一直到线虫成长为 L4。同时, 因为不同时期、不同状态下的线虫学习能力可能不相同, 而 L4 时期线虫具有明显且独特的白月斑, 容易辨别, 因此在进行学习能力检验时, 我们对 L4 时期线虫进行检测, 可以避免由线虫年龄不同造成的影响。

我们对每一只挑出的 L4 线虫, 进行机械刺激的非联合性学习训练。机械刺激是由 Rankin 等<sup>[13]</sup>于 1990 年建立的研究线虫非联合型学习行为的常用方法, 是基于线虫对机械刺激产生后退反应来检测学习行为的方法。当刺激线虫前方位置时, 动物将产生后退反应。间断性给与刺激时, 随着刺激次数的增加, 线虫的后退反应就会减弱, 表现为移动距离缩短, 最后即使受到刺激也不后退, 即习惯化。

由于条件限制, 我们没有检测线虫受刺激后的后退距离, 而是检测了线虫习惯机械刺激得后退次数。从图 2 中可以看出, 对照组 (即加入无菌水) 的亲代线虫 (P) 习惯该触碰刺激的后退次数约为 10 次, 而酒精处理的亲代线虫习惯该触碰刺激的后退次数约为 20 次, 为对照组的 2 倍, 两者之间呈现出明显的差异

(P<0.01)。由此可以得出结论: 酒精刺激亲代线虫, 会抑制他们对机械刺激的学习能力。

我们接着检测了受酒精处理的线虫后代 F1、F2、和 F3 的学习情况 (图 2)。我们发现 F1 习惯该触碰刺激的后退次数约为 16 次, F2 约 13 次, F3 约 10 次。而在对照组中, F1、F2 和 F3 均只需要约 10 次。可以很容易发现, 虽然这些后代都在无酒精的正常环境中生活, 酒精处理线虫的后代 F1 和 F2 习惯触碰刺激后退的次数明显高于对照组 (图 2)。可见亲代酒精刺激会降低子代的学习能力, 但是该影响逐代减弱, 到 F3 代几乎消失。

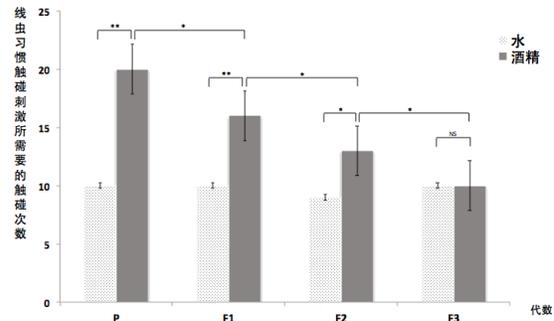


图 2. 酒精处理亲代线虫对亲代和子代学习能力的影响。用水或 0.8% 酒精处理亲代线虫, 检测亲代 (P)、子代 (F1-3) 习惯眉毛触碰头部的刺激所需要的触碰次数, 此时线虫不再后退 (\*\* P<0.01; \* P<0.05; NS, 无显著差异; n=3)。

### 3.3 酒精刺激雄性线虫降低了杂交后代的学习能力

在以上的实验中, 酒精对亲代的处理从孵化一直到 L4 时期。在 L4 时期, 子代的卵可能已经开始早期发育。为了排除酒精对子代学习能力的影响是母体效应的结果, 我们采取了仅对雄虫进行酒精处理, 然后检测其后代学习能力的方法。我们选用了荧光标记 PVD 神经元的雄性线虫 (P<sub>ser-2::GFP</sub>) 进行实验。我们发现未受酒精刺激的雄性线虫, 习惯该触碰机械刺激需要 9 次左右, 而受酒精刺激的雄性线虫则需要 17 次左右。说明这些受酒精处理的雄虫同样表现出学习能力的减弱 (图 3)。随后, 让这些雄虫与不带荧光的未受酒精处理的雌雄同体线虫杂交, 选取带荧光的 L4 后代, 检测其学习能力。

这些带荧光的线虫一定是受酒精处理的雄虫的后代, 而不是未受酒精处理的雌雄同体线虫的自交后代。如图3可见, 亲代仅雄性线虫受酒精刺激后, 子代习惯该机械刺激仍需要16次左右。说明其杂交子代线虫学习能力也明显下降。我们还检测了同时出生的雌雄同体线虫的自交后代(不带荧光)的学习能力, 发现其没有显著改变(未显示数据)。这些结果说明子代F1学习能力的下降并不是因为其早期发育阶段在母体内受酒精刺激引起的, 排除了母体效应。

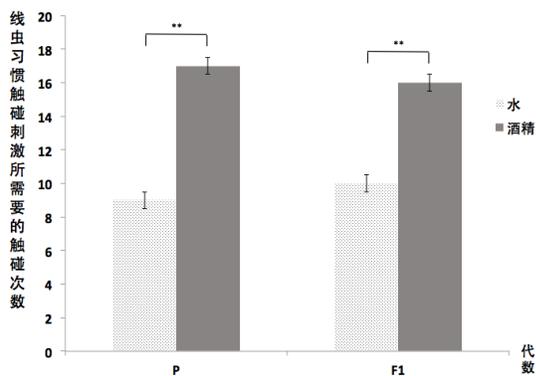


图 3. 酒精处理亲代雄性线虫对亲代和杂交子代学习能力的影响。用水或 0.8% 酒精分别处理被荧光标记的雄性线虫( $P_{ser-2}::GFP$ , P), 与未被荧光标记的雌雄同体线虫杂交后, 取其有荧光标记的后代(F1), 进行检测 (\*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$ )。

### 3.4 神经钾离子通道和神经递质释放可能介导了酒精的影响

亲代将不良环境压力下产生的某些获得性性状遗传给后代。这种传递通常是通过表观遗传的方式进行的<sup>[14][15][16][17]</sup>。表观遗传调控是极为精妙和复杂的, 包括 DNA 甲基化, 组蛋白甲基化、乙酰化和非编码 RNA 等形式。近年来, DNA 和染色体的神经表观遗传学修饰已经被认定为记忆形成的重要介质。并且这种表观遗传学修饰可以跨代遗传<sup>[18]</sup>。我们的实验结果显示酒精刺激降低了线虫对机械刺激的学习能力, 这种影响能跨代遗传, 直到子二代。仅有雄性线虫受酒精刺激, 其没有酒精处理的后代也显现学习能力下降。以上结果暗示酒精对线虫机械刺激学习能力的影响可能通过了表观遗传的方式。但是受实验条件的限制, 以及没有

得到与表观修饰相关基因的突变体, 我们没有检测究竟是哪种表观遗传机制在这里起作用。

我们提出了另外一个问题: 哪些基因参与了酒精对线虫机械学习的影响; 这些基因是否被表观修饰? 我们推测, 如果某基因参与了酒精对线虫机械学习的影响, 该基因的突变体会改变野生型或/和酒精处理的亲代或/和子代线虫对机械刺激的反应。

钙离子激活的钾离子通道 *SLO-1* 是酒精在线虫体内的一个靶蛋白<sup>[7]</sup>。酒精会激活 *SLO-1*, 从而抑制突触活性。在酒精抑制线虫运动和产卵方面, *slo-1* 突变体表现为对酒精不敏感<sup>[7]</sup>。为了研究这个重要的基因是否也参与了酒精对线虫机械学习的影响, 我们分析了 *slo-1* 的一个功能丧失突变体 *slo-1(egl42)* (图 4)。在未受酒精处理的情况下野生型只需要 10 次左右来习惯机械刺激, 而 *slo-1* 则需要 20 次左右, 说明 *slo-1* 降低了线虫的学习能力。同时我们还可以看出, *slo-1* 受酒精刺激后习惯该机械刺激与其没有受酒精处理的情况没有显著差异。这些结果说明 *slo-1* 参与了酒精对线虫机械学习的影响。

线虫 *eat-4* 基因编码了一个谷氨酸突触小泡转运体蛋白, 该蛋白在压力感受细胞 *ALM*, *AVM* 和 *PLM* 中表达<sup>[19]</sup>。*eat-4* 突变体表现出对轻微震动这样的机械刺激更快的学习能力。为了检测 *eat-4* 所介导的神经递质释放是否也在酒精影响线虫对触碰刺激学习的过程中起作用, 我们利用了 *eat-4* 的功能丧失突变体 *eat-4(ky5)* (图 4)。在没有酒精处理情况下 *eat-4* 习惯该刺激需要约 6 次, 比野生型略少一些, 说明 *eat-4* 学习能力增强。而 *eat-4* 在受酒精刺激后与受酒精刺激前相比无明显差异。说明 *eat-4* 所介导的神经递质释放也在酒精影响线虫对触碰刺激学习的过程中起作用。

*RPM-1* 在神经系统中广泛表达。以前的工作表明 *rpm-1* 突变体在运动神经元中的突触结构被破坏<sup>[20]</sup>。学习性行为依赖于完整的神经元环路功能, 因此我们也选取了 *rpm-1* 突变体, 检测其是否有对机械刺激学习能力的缺陷 (图 4)。我们可以从结果看出, *rmp-1* 在未受酒精

处理时, 习惯该机械刺激需要约 17 次左右, 明显高于野生型线虫, 学习能力降低。而 *rpm-1* 在受酒精刺激后与受酒精刺激前相比无明显差异。说明 *rpm-1* 参与构建的神经突触结构也在酒精影响线虫对触碰刺激学习的过程中起作用。

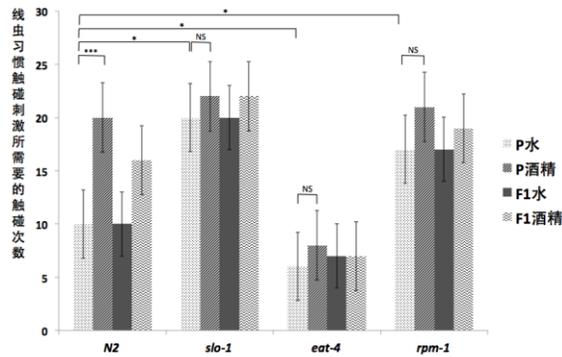


图 4. 酒精处理线虫的不同突变体对亲代和杂交子代学习能力的影 响。用水或 0.8%酒精分别处理亲代野生型或突变线虫, 检测亲代 (P)、子一代 (F1) 习惯眉毛触碰头部的刺激所需要的触碰次数, 此时线虫不再后退 (\*  $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )。

## 4 讨论

### 4.1 酒精刺激降低线虫亲代及子代的学习能力可能是通过表观遗传方式

我们的研究表明, 用 0.8%的酒精长期处理线虫会导致其习惯眉毛触碰头部这种机械刺激的能力降低, 即学习能力降低。这种影响具有特异性, 而不是高浓度酒精造成的普遍行为缺陷。因为在预实验中并没有发现 0.8%酒精处理的线虫在运动能力、产卵量方面与水处理的线虫有明显差异。线虫习惯眉毛触碰头部后不再后退被认为是一种学习行为, 而不仅仅是感受器官对刺激的普遍适应性或运动能力衰竭, 因为当用不同的刺激去处理线虫时, 它能迅速对此做出反应<sup>[24]</sup>。

在我们的研究中, 对亲代进行酒精处理, 其子代习惯触碰的非联合性学习行为也会降低。已有多个报道表明亲代在不良环境压力下产生的某些获得性性状会遗传给下一代。这些不良环境包括高脂饮食、嗅觉体验、高糖饮食和饥饿等等<sup>[14][15][16][17]</sup>。我们的研究表明酒精暴

露也是这种会将不良影响传给后代的环境压力之一。

获得性性状的代间传递通常是通过表观遗传的方式进行的<sup>[14][15][16][17]</sup>。我们推测酒精影响的代间传递也可能是表观遗传的结果, 理由如下: 在实验中, 我们尽量选取了较低的酒精浓度, 这个浓度对线虫的运动和产卵率都没有明显影响; 对亲代酒精处理的时间只到 L4, 此时受精卵还没有形成, 这些都尽量减少了酒精接触子代胚胎造成的直接影响。另外, 我们让 F 代在正常培养条件下生长, 未接触酒精, 然后检测 F2 代的学习能力。在这样排除了酒精直接伤害的情况下, F2 代也表现出学习能力的缺陷。最后, 为了彻底排除母亲的细胞质物质通过某种方式传给后代, 我们只用酒精处理了雄性线虫, 让它与没有接触酒精的雌雄同体线虫交配, 杂交后代也表现出学习能力降低。综上所述, 我们的结果支持酒精影响的跨代遗传是表观遗传的结果, 而不是母体细胞质物质的传递或酒精对胚胎的直接刺激。到目前为止所发现的跨代遗传效应均逐代递减, 一般延续到 F2 代, 到 F3 代几乎没有影响<sup>[16][21]</sup>。但是其中的机理还不清楚。我们的观察与这些研究一致, 酒精影响持续到 F2 代, 到 F3 代消失。

### 4.2 钾离子通道和突触功能可能介导了酒精对线虫学习能力的抑制

研究表明记忆的形成与突触连接和发育有关, 后者受表观遗传的调节, 比如 DNA 甲基化, 组蛋白甲基化、乙酰化和非编码 RNA 等形式<sup>[22]</sup>。我们推测, 如果有表观修饰基因介导了我们实验中酒精效应的跨代遗传, 其相应的突变体会抑制这个现象。但是受条件限制, 我们没有得到表观修饰相关基因的突变体, 因此无法检测究竟是哪种表观遗传机制在这里起作用。

为了研究介导酒精急性镇静作用的关键基因是否也参与了酒精对机械刺激学习的影响, 我们分析了 *slo-1* 突变体在酒精处理后的学习情况。钙离子激活的钾离子通道 SLO-1 是酒精在线虫体内的一个靶蛋白<sup>[7]</sup>。酒精会激活 SLO-1,

从而抑制突触活性。在酒精抑制线虫运动和产卵方面, *slo-1* 突变体表现为对酒精不敏感<sup>[7]</sup>。如果 *SLO-1* 也参与了酒精影响学习的信号通路, 那么当酒精刺激 *slo-1* 突变体时, 突变体可能并不表现学习能力的显著降低。然而出乎意料的是, 在我们的实验中, *slo-1* 突变体在没有酒精处理的情况下竟表现出与酒精处理相当的学习能力降低现象。这一结果与 Wang 等的研究结果一致, 他们在酒精对线虫联合性学习行为的实验中也发现 *slo-1* 突变体在未受酒精处理时表现出学习能力的缺陷<sup>[9]</sup>, 然而作者没有对此进行讨论和解释。可能该钾离子通道在酒精影响运动产卵行为及学习行为中有不同的作用机理。

由于记忆的形成与突触连接和发育有关, 而线虫的机械感受神经元与下游的中间神经元形成了谷氨酸能突触, 我们又分析了 *eat-4* 突变体。*eat-4* 突变体表现出对轻微震动这样的机械刺激更快的学习能力<sup>[18]</sup>。在我们的研究中, 没有酒精处理情况下, *eat-4* 也表现出对眉毛触碰头部这样的轻微刺激更快的学习能力, 与上述研究一致。而 *eat-4* 在受酒精刺激后与受酒精刺激前相比并无明显差异。我们的结果支持这样的假设: *eat-4* 所介导的神经递质释放也在酒精影响线虫对触碰刺激学习的过程中起作用。

学习行为依赖于完整的神经元环路功能, 因此我们也选取了参与突触构建的基因 *rpm-1* 的突变体<sup>[19]</sup>, 检测其是否有对机械刺激学习能力的缺陷。*rmp-1* 在未受酒精处理时, 学习能力降低; 受酒精刺激后与受酒精刺激前相比无明显差异。说明 *rpm-1* 参与构建的神经突触结构也在酒精影响线虫对触碰刺激学习的过程中也起作用。

酒精对后代的影响过程中, *slo-1*, *eat-4*, *rpm-1* 是不是被表观修饰的靶基因呢? 我们发现这三个突变体各自酒精处理或未处理的亲代学习能力均相当, 暗示 *slo-1*, *eat-4*, *rpm-1* 均可能是酒精处理引起表观修饰的靶基因, 并且三者可能在一个信号通路上, 否则酒精处理的突变体应该比未处理的个体学习能力更弱。

综上所述, 我们的研究发现酒精对亲代学习能力的抑制会遗传给子代, 这是以前没有过的报道。我们证明这种跨代遗传可能是通过表观修饰的方式。我们还进一步探究了酒精在体内的靶蛋白 *SLO-1* 及谷氨酸能突触小泡转运蛋白 *EAT-4*, 突触结构蛋白 *RPM-1* 在该途径中的作用。我们的研究为理解和阐明酒精刺激亲代对子代的影响提供了一个实验模型, 有助于深入开展对酒精影响表观遗传的分子机理研究。

今后的工作可以尝试直接检测基因的表观修饰, 进而深入研究其机制。

## 致谢

感谢中国科学院遗传所丁梅实验室提供的线虫株系 MT6308 和 RB630, 中国科学院生物物理研究所王晓晨和张宏实验室提供的 BZ142。

## 参考文献

- [1] Squeglia LM, Schweinsburg AD, Pulido C, Tapert SF (2011) Adolescent binge drinking linked to abnormal spatial working memory brain activation: differential gender effects. *Alcohol Clin Exp Res* 35(10),1831-1841.
- [2] 王薇, 吴政星(2015)秀丽线虫感觉功能研究进展. *生命科学*.27(9),1103-1113.
- [3] 赵娜, 任长虹, 刘虎岐, 张成岗(2009)秀丽隐杆线虫学习行为研究方法. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* 37(11),55-61.
- [4] Diamond, I., and Gordon, A.S. (1997) Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 77 (1): 1-20
- [5] Moore, M.S., DeZazzo, J., Luk, A.Y., Tully, T., Singh, C.M., and Heberlein, U

- (1998) Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell* 93(6):997-1007.
- [6] Davis JR, Li Y, Rankin CH (2008) Effects of developmental exposure to ethanol on *Caenorhabditis elegans*. *Alcohol Clin Exp Res* 32(5),853-67.
- [7] Davies AG, Pierce-Shimomura JT, Kim H, VanHoven MK, Thiele TR, Bonci A, Bargmann CI, McIntire SL. (2003) A central role of the BK potassium channel in behavioral responses to ethanol in *C. elegans*. *Cell* 115(6),655-666.
- [8] Mitchell P, Mould R, Dillon J, Glautier S, Andrianakis I, James C, Pugh A, Holden-Dye L, O'Connor V (2010) A differential role for neuropeptides in acute and chronic adaptive responses to alcohol: behavioural and genetic analysis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5(5),e10422.
- [9] Wang Y, Tang L, Feng X, Du W, Liu BF. (2011) Ethanol interferes with gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 71 (4): 341-7.
- [10] Radford, E. J., Ito, M., Shi, H., Corish, J.A., Yamazawa, K., Isganaitis, E. & Peters, A. H. (2014). In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science*, 345(6198):1255903.
- [11] Dias, B. G., & Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature Neuroscience*, 17(1), 89-96.
- [12] Kei-ichiro Kitamura, Shigetoyo Amano, Ryuji Hosono | Contribution of Neurons to Habituation to Mechanical Stimulation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol.* 46(1):29-40.
- [13] Rankin CH, Beck CD, Chiba CM. (1990) *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. *Behav Brain Res.* 37(1):89-92.
- [14] Brian G Dias & Kerry Ressler (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat. Neurosci.* 17(1):89-96
- [15] Arnaud Tauffenberger & J. Alex Parker (2014) Heritable Transmission of Stress Resistance by High Dietary Glucose in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 10,e1004346
- [16] Rechavi O, Houri-Ze'evi L, Anava S, Goh WSS, Kerk SY, Hannon GJ, Hobert O. (2014) Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell.* 158(2):277-287.
- [17] Ng S.F. et al. (2010) Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467(7318):963-6
- [18] 王卓, 覃瑞, 戴甲培, 余光辉 (2015) 神经系统表观遗传进展. *Qianren Biology*, 2(1): 1-9
- [19] Lee RY, Sawin ER, Chalfie M, Horvitz HR, Avery L. (1999) EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *caenorhabditis elegans*. *J Neurosci.* 19(1):159-67.
- [20] Zhen M, Huang X, Bamber B, Jin Y. (2000) Regulation of presynaptic terminal organization by *C. elegans* RPM-1, a putative guanine nucleotide exchanger

- with a RING-H2 finger domain. *Neuron*.  
26(2):331-43.
- [21] Kishimoto S, Uno M, Okabe E, Nono M,  
Nishida E (2017) Environmental  
stresses induce transgenerationally  
inheritable survival advantages via  
germline-to-soma communication in  
*Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun*.  
8:14031.
- [22] Yan Y, Zhu Y, Liu L, Jiao  
RJ(2016) Transgeneration epigenetic  
inheritance of learning and memory: can  
it tell us the truth? *Prog Biochem  
Biophys* 43(4),337-347.