

Malondialdehyde Level by Ethanol Exposure in Mouse According to the ALDH2 Enzyme Activity

Chung-Jong Lee, Yong-Dae Kim[†], Sung-Hoon Kim, Sang-Yong Eom,
Yan Wei Zhang and Heon Kim

Department of Preventive Medicine and Medical Research Institute, College of Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Excessive alcohol consumption is associated with increased risks of many diseases including cancer. Individuals who regularly consume excessive quantities of alcohol have a greater risk of developing head and neck cancers such as esophageal, pharyngeal and oral cavity cancers if they are deficient in ALDH2 expression compared to normal populations. We evaluated lipid peroxidation in *Aldh2* ^{+/+} and *Aldh2* ^{-/-} mice after they had been subjected to acute ethanol exposure. Malondialdehyde (MDA) level in liver tissue was evaluated as a biomarker of oxidative lipid peroxidation. Although the ethanol treatment did not increase the hepatic MDA level both in *Aldh2* ^{+/+} mice and in *Aldh2* ^{-/-} mice, the MDA level was significant higher in the *Aldh2* ^{-/-} mice than in the *Aldh2* ^{+/+} group. The MDA level was also significantly correlated with olive tail moment in blood and the level of 8-OHdG in liver tissue. This is a strong evidence to support our hypothesis that oxidative stress is more intense in *Aldh2* ^{-/-} mice than in *Aldh2* ^{+/+} mice. Our results suggest that ALDH2-deficient individuals may be more susceptible than wild-type ALDH2 individuals to ethanol-mediated liver disease, including cancer.

Key Words: Aldehyde dehydrogenase 2, Malondialdehyde, Oxidative stress, Knockout mice

서 론

과다한 음주는 암을 비롯한 다양한 질환의 위험을 증가시킨다 (Blum, 2001; Dey and Cederbaum, 2006). 체내에 유입된 에탄올은 알코올 탈수소효소 (alcohol dehydrogenase; ADH)에 의해 아세트알데히드로 대사된 후 다시 알데히드탈수소효소 2 (aldehyde dehydrogenase 2; ALDH2)에 의해 아세트산으로 대사되어 배출된다 (Agarwal and Goedde, 1992). 에탄올의 대사과정 중에는 다량의 free radical이 생성되어 체내에서 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있고 (Bondy, 1992; Nordmann et al., 1992; Ishii et al., 1997), 알코올의 급성 투여가 활성산소의 생성을 증가시킨다는 보고도 있다 (Reinke et al., 1991; Bondy and Orozco, 1994).

한국인을 포함한 아시아 인종의 약 50%는 ALDH2 gene의 점돌연변이로 인해 ALDH2 활성이 저하된 유전자형을 지니고 있다 (Kee et al., 2003; Oyama et al., 2005). ALDH2 활성이 저하된 사람은 과도한 양의 알코올을 섭취할 경우, ALDH2 활성이 높은 사람에 비해 식도암이나 구강암 등의 발생율이 유의하게 높은 것으로 알려져 있다 (Yokoyama et al., 2002). 아직까지 그 정확한 이유는 밝혀지지 않았으나 유력한 가설 중 하나는 ALDH2 효소의 활성에 따라 체내에서의 에탄올 대사과정이 변화되고 이로 인해 산화적 스트레스의 발생 정도가 서로 다를 가능성이 있다. 본 연구진은 선행연구를 통하여 에탄올 투여에 의한 산화적 유전자 손상 정도가 ALDH2 효소의 활성이 결핍된 경우에 더욱 심각하다는 연구 결과를 보고한 바 있다 (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007). 그러나 산화적 스트레스로 인한 유전자 손상지표로 가장 많이 이용되는 8-OHdG는 측정을 위한 전처리 과정에서 자연적인 산화반응에 의해서 인위적으로도 생성될 가능성이 있다는 단점이 있어서 에탄올 대사에 의해 발생하는 산화적 스트레스를 보다 정확하게 평가하기 위해서는 산화적 유전자 손상 이외에 지질과산화에 미치는 영향도 함께 고

*논문 접수: 2008년 2월 15일
수정재접수: 2008년 3월 15일

[†]교신저자: 김용대, (우) 361-763 충북 청주시 흥덕구 개신동 12번지,
충북대학교 의과대학 예방의학교실
Tel: +82-43-261-2845, Fax: +82-43-274-2965
e-mail: ydkim@chungbuk.ac.kr

려되는 것이 타당하다.

따라서, 본 연구에서는 ALDH2 knockout 마우스를 이용하여 에탄올을 경구 투여한 후 간조직 내 malondialdehyde (MDA) 농도를 측정하여 산화적 과산화지질 생성과 ALDH2 효소활성과의 관련성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

Aldh2 ^{-/-} 마우스 (Kitagawa et al., 2000)를 일본의 Kawamoto 교수로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 12 주령의 수컷 *Aldh2* ^{+/+} 및 *Aldh2* ^{-/-} (C57BL/6J strains)를 plastic mouse cages에서 12시간 (07:00~19:00)은 밝게, 나머지 12시간 (19:00~07:00)은 어두운 상태로 유지시켰으며 배양실의 온도는 23~25°C를 유지하였다. 동물실험과 관련된 모든 조작은 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health'의 규정에 따라 시행하였다.

2. *Aldh2* genotyping 및 ethanol 투여

마우스 꼬리부분에서 genomic DNA를 추출하여 PCR-amplification 방법으로 *Aldh2* genotype을 결정하였다 (Isse et al., 2002). 각 군에 7마리씩의 마우스를 배정하여 알코올 투여군에는 40% ethanol (2 g/kg/day)을 7일간 매일 1회 경구 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다.

3. 간조직에서의 malondialdehyde(MDA) 농도 측정

MDA 농도는 Ohkawa 등 (1979)의 방법을 다소 수정하여 사용하였다. 마우스로부터 분리한 간조직 0.1 g 정도를 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 1 ml에 넣고 초음파로 분쇄하고 3000×g 4°C에서 15분간 원심분리한 다음 상층액 50 µl를 취하여 0.05% BHT 50 µl, 0.1 N HNO₃ 150 µl, 42 mM TBA 150 µl를 넣고 30초간 잘 섞어주었다. 100°C에서 1시간 동안 방치한 후 5분간 ice에 방치하였다. n-Butanol 300 µl를 넣고 30초간 잘 섞어준 후 12,000×g에서 5분간 원심분리하고 상층액 250 µl를 고압액체크로마토그래피 (HPLC) 방법으로 분석하였다. HPLC는 Model SP930D 펌프 (Young Lin, Anyang, Korea)와 Model SIL-10ADvp 자동시료주입기 (Shimadzu, Kyoto, Japan), 그리고 Model SPD-10Avp 자외선 검출기 (Shimadzu, Autochro-3000 Data

system (Young Lin) 등으로 구성된 것을 사용하였다. 컬럼은 Tosoh사 (Tokyo, Japan)의 TSK gel ODS-80, 4.4×15 mm 역상 컬럼을 이용하였다. 이동상 용액으로는 50 mM potassium monobasic phosphate:acetonitrile : methanol (65:15:20, pH 6.8) 용액을 사용하였으며, 분당 1 ml의 속도로 흘러주었다. 자외선 검출기 파장은 532 nm를 사용하였다.

4. 통계분석

통계분석은 윈도우용 SPSS (Version 12.0)를 사용하였다. 양 군 간의 MDA 농도의 평균은 Mann Whitney U test를 이용하여 분석하였다. MDA 농도와 olive tail moment 및 8-OHdG 농도와의 관련성을 평가하기 위하여 상관분석을 시행하였다. P-값이 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

IARC 자료에 따르면 사람에서 아세트알데히드의 발암성은 충분히 가능성이 있다 (IARC, 1999). 일본인에서 음주에 의한 암발생은 ALDH2 유전자다형성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Yokoyama et al., 1998; Yokoyama et al., 2001; Yokoyama et al., 2002). 즉, *Aldh2**2 (비활성형) 유전자형을 가진 사람은 *Aldh2**1 (활성형)을 가진 사람에 비해 식도암의 위험도가 7~12배 가량 높은 것으로 보고되었다. Yokoyama 등 (Yokoyama et al., 2002)은 적어도 하나의 *Aldh2**2 유전자를 가진 사람은 혈중 아세트알데히드 농도가 상대적으로 높으며, 이것이 알코올과 관련된 식도암에서 중요한 원인으로 작용할 가능성이 매우 크다고 보고한 바 있다.

알코올에 의한 간독성은 활성산소의 생성이 매우 중요한 원인으로 알려져 있다. Zhang 등 (2004)은 최근 배양세포 (myocyte)에 아세트알데히드를 노출시키면 활성산소의 생성이 증가된다고 보고하였으며 Isse 등 (2005)의 연구에서도 *Aldh2* knockout 마우스는 wildtype 마우스에 비해 혈중 알데히드 농도가 유의하게 높다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 ALDH2 활성이 에탄올에 의한 산화적 스트레스 발생에 큰 영향을 줄 가능성을 시사해준다. 본 연구진은 이러한 가설을 입증하기 위해서 에탄올을 투여한 마우스에서 산화적 유전자 손상지표인 8-OHdG의 농도 및 CYP2E1 효소의 발현 정도를 측정하여 ALDH2 효소의 활성에 따른 차이를 평가한 바 있다 (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007). 그 결과, 요중 8-OHdG

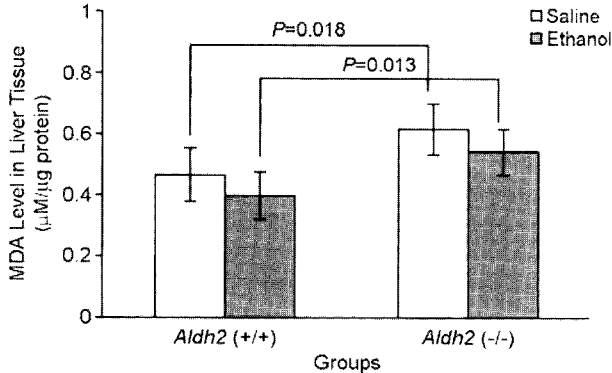


Fig. 1. Malondialdehyde level in liver tissue of mice treated with saline or 2 g/kg/day of ethanol for 7 days. Seven different livers for each treatment group were individually analyzed by HPLC method. Statistical analysis was performed by Mann Whitney U test.

의 농도 및 간조직의 CYP2E1 발현은 *Aldh2* $-/-$ 마우스가 *Aldh2* $+/+$ 마우스에 비해 유의하게 높은 것을 확인하였다. CYP2E1은 체내 에탄올 대사에 관여하는 MEOS (microsomal ethanol oxidizing system)의 대표적인 효소로 활성산소의 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Lieber, 1999). 따라서 ALDH2 효소의 결핍은 이에 대한 보상작용으로 MEOS의 발현을 상대적으로 증가시키며, 이로 인해 활성산소의 발생이 더욱 증가되었을 가능성이 높다. 그러나 한 종류의 산화적 스트레스 지표를 평가하여 이러한 가능성을 입증했다고 보기는 어렵다. 유전자 손상지표인 8-OHdG가 가장 많이 사용되는 산화적 스트레스 지표이기는 하지만, 측정을 위한 전처리 과정에서 인위적인 생성 가능성이 있다는 단점이 있어서 보다 객관적이고 정확한 산화적 스트레스를 평가하기 위해서는 8-OHdG 이외의 다른 지표를 이용한 평가가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

MDA는 지질과산화에 대한 지표로서 8-OHdG와 더불어 대표적인 산화적 스트레스 지표로 이용된다 (Esterbauer et al., 1991). 포화지방산에서 생성되는 과산화지질은 매우 불안정하여 복잡한 형태의 다른 화합물로 대사되는데, 여기에는 MDA 등의 카보닐화합물이 포함되며, 이와 같은 과산화지질의 증가는 다양한 종류의 만성질환 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (De Maria et al., 1996; Browne and Beal, 2006). 본 연구에서는 7일간의 에탄올 투여 후 간조직 내의 MDA 농도를 측정함으로써 ALDH2 효소의 활성이 에탄올에 의한 산화적 스트레스 발생에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 그 결과, 예상과는 다르게 *Aldh2* $+/+$ 마우스의 경우, 간조직에서의

Table 1. Analysis of variance (2-way ANOVA) of the effects of the *Aldh2* genotype and ethanol exposure on the MDA level in liver tissue

| Variables | MDA level in liver tissue |
|-----------------------|---------------------------|
| <i>Aldh2</i> genotype | F=18.070 P<0.001 |
| Ethanol exposure | F=2.619 N.S |

MDA 농도는 에탄올 투여 전 0.48 ± 0.08 에서 투여 후 0.40 ± 0.08 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein으로 통계적인 차이를 보이지 않았으며, *Aldh2* $-/-$ 의 경우에도 투여 전 0.61 ± 0.09 에서 투여 후 0.54 ± 0.07 $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ protein으로 에탄올 투여에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 1). 이러한 결과는 에탄올의 투여가 MDA의 생성을 증가시킨다는 기존의 연구 결과들과는 다른 것이지만 아세트알데히드에 노출시킨 마우스의 경우, 요중 8-OHdG의 농도는 유의한 증가를 보였으나 혈중 MDA의 농도에는 변화가 없었던 Ogawa 등 (2006)의 연구 결과와 일치하는 것이었다. 또한 Tokunaga 등 (2003)의 연구에서도 톨루엔에 노출시킨 마우스의 폐, 간 및 신장 조직에서 8-OHdG의 농도는 유의하게 증가한 반면, 이들 기관에서의 MDA 농도는 유의한 변화가 없다고 보고한 바 있다. 대표적인 산화적 스트레스의 두 지표로 알려진 8-OHdG와 MDA의 결과 왜 다른지에 대해서는 명확하지 않다. 두 지표가 갖는 민감도의 차이 때문일 가능성이 있으나 이에 대한 추가 연구가 진행되어야 할 것으로 본다.

한편, 본 연구에서의 흥미로운 결과는 *Aldh2* $-/-$ 마우스의 간조직 내 MDA 농도는 *Aldh2* $+/+$ 마우스에 비해 통계적으로 유의하게 높았다는 것이다. 이는 에탄올을 투여하지 않은 생리식염수 투여군 (0.48 vs 0.61 , $P=0.018$)의 경우와 에탄올 투여군 (0.40 vs 0.54 , $P=0.013$) 모두에서 나타났다 (Fig. 1). 뿐만 아니라, 2-way ANOVA를 이용하여 에탄올과 ALDH2 효소의 활성 중 각각의 영향을 배제한 상태에서 MDA 농도에 미치는 영향을 분석해 본 결과 ALDH2 효소의 활성이 유의하게 MDA 농도에 영향을 미치는 것으로 나타났다 ($P<0.001$, Table 1).

이 결과는 본 연구진이 기존에 보고한 몇 편의 논문 결과 (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007)와 일치하는 결과이다. 기존의 연구에 의하면 *Aldh2* $-/-$ 마우스는 *Aldh2* $+/+$ 마우스에 비해 간조직의 8-OHdG 및 CYP2E1 발현 정도 그리고 유전자 손상지표인 olive tail moment 수치 등이 유의하게 높은 것으로 나타났다. 더구나 이러한 양상은

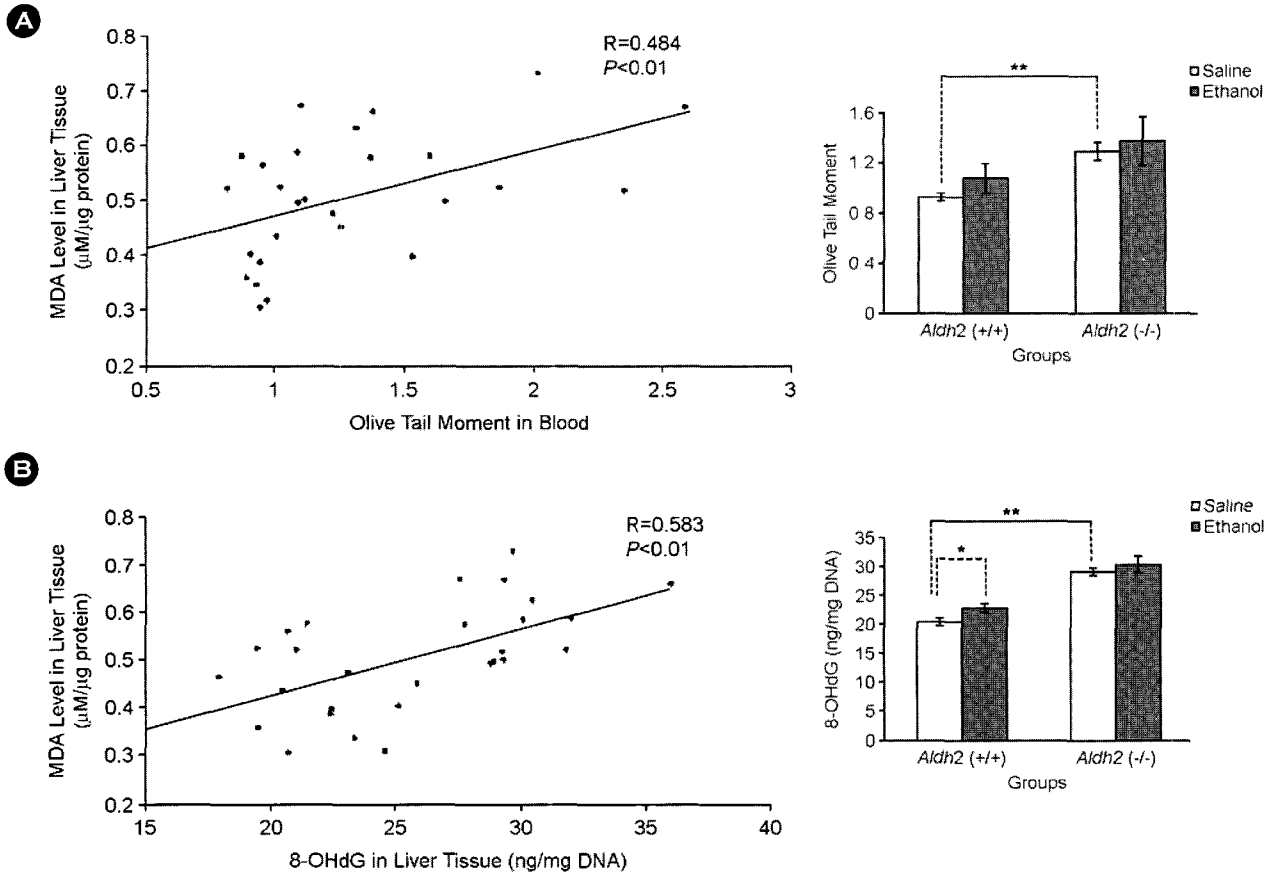


Fig. 2. The relationships between the olive tail moment in blood and malondialdehyde level in liver tissue of mice treated with saline or 2 g/kg/day of ethanol for 7 days (A) and the level of 8-OHdG in liver tissue and malondialdehyde level (B). R indicates correlation coefficient. Statistical analysis was performed by Pearson correlation test. Histograms show levels of olive tail moments in blood and 8-OHdG in liver tissue (Kim et al., 2007).

에탄올을 투여하지 않은 군에서도 관찰되어 본 연구 결과와 정확히 일치하였다. 아직 이에 대한 정확한 원인은 알 수 없으나 가능성 있는 가설 중 하나는 포유동물의 체내에서는 에탄올 섭취가 없더라도 음식물 등을 통해서 적지 않은 양의 에탄올 대사가 자체적으로 이루어진다는 것이다 (McManus et al., 1960). 또한, CYP2E1 효소는 에탄올 이외의 다른 많은 물질에 의해서도 그 발현이 유도될 수 있는 것으로 알려져 있다 (Gonzalez, 2005). 결국, ALDH2 활성이 결핍된 마우스는 체내의 에탄올 대사과정 중 발생하는 아세트알데히드를 대사시키기 위해 CYP2E1 등의 MEOS 발현이 증가되고, 이는 활성산소의 생성을 촉진시켜 산화적 스트레스의 증가가 유도되는 것으로 판단된다.

한편, Matsumoto 등 (2007)은 ALDH2가 결핍된 마우스에 에탄올을 일회 경구 투여한 후 간조직의 MDA 농도를 측정 한 연구에서 *Aldh2* $-/-$ 마우스의 경우는 *Aldh2* $+/+$ 마우스에 비해서 에탄올 투여 후의 MDA 농도가 상

대적으로 낮은 것으로 보고하여 본 연구와는 다소 상반된 결과를 나타내었다. 그러나 Matsumoto 등 (2007)의 연구가 본 연구와는 달리 에탄올을 1회 투여하고 12시간 이후에 단 한번만 MDA를 측정했다는 점을 감안한다면, 두 연구의 결과를 직접 비교하는 것은 무리가 있다. 왜냐하면, 에탄올을 일회 투여한 후에 시간에 따라 나타나는 체내의 생화학적 변화 양상은 반복 투여에 의한 변화 양상과는 상당한 차이가 있을 것이기 때문이다. Matsumoto 등 (2007)의 연구에서 에탄올 투여 전의 MDA 농도는 *Aldh2* $-/-$ 마우스가 *Aldh2* $+/+$ 마우스보다 다소 높은 경향을 보여 본 연구의 결과와 유사하였으나 통계적으로 유의성을 보이지는 않았다. 이러한 차이는 연구자간의 실험적인 편차에 의한 것일 수도 있고, MDA의 측정 방법이 본 연구에서는 HPLC의 방법을 사용한 반면, Matsumoto 등 (2007)의 연구에서는 ELISA의 방법을 이용하였기 때문에 이로 인한 차이일 가능성도 생각해 볼 수 있다. 그러나 이에 대한 보다 정확한 원인은 추가

적인 연구를 통해서 규명해야 할 것이다.

기존에 보고한 이들 지표들과 (Kim et al., 2007) 간조직에서의 MDA 농도와와의 관련성을 알아보기 위하여 상관분석을 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과, 혈중 olive tail moment와 간조직의 8-OHdG 농도는 간조직의 MDA 농도와 각각 상관계수 0.484와 0.583의 통계적으로 유의한 관련성을 보였다. 이것은 본 연구에서 평가한 산화적 스트레스 지표들이 측정과정에서의 오류에 의한 것이 아닌 실제의 생성 정도를 반영하고 있음을 의미한다.

본 연구의 결과 ALDH2 효소활성의 결핍은 간조직에서의 MDA 생성을 유의하게 증가시키는 것으로 확인되었으며, 이는 ALDH2 효소활성의 저하가 에탄올에 의한 산화적 스트레스에 더욱 취약하다는 가설을 뒷받침 해주는 중요한 증거가 될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음 (This work was supported by Chungbuk National University Grant in 2006).

REFERENCES

- Agarwal DP, Goedde HW. Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetics* 1992. 2: 48-62.
- Blum HE. Hepatocellular carcinoma: susceptibility markers. *IARC Sci Publ.* 2001. 154: 241-244.
- Bondy SC, Orozco J. Effects of ethanol treatment upon sources of reactive oxygen species in brain and liver. *Alcohol* 1994. 29: 375-383.
- Bondy SC. Ethanol toxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 1992. 63: 231-241.
- Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2006. 8: 2061-2073.
- De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med.* 1996. 21: 291-295.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006. 43: 63S-74S.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991. 11: 81-128.
- Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res.* 2005. 569: 101-110.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* 1999. Vol. 71, Part Two. IARC, Lyon.
- Ishii H, Kurose I, Kato S. Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997. 12: 272S-282S.
- Isse T, Matsuno K, Oyama T, Kitagawa K, Kawamoto T. Aldehyde dehydrogenase 2 gene targeting mouse lacking enzyme activity shows high acetaldehyde level in blood, brain, and liver after ethanol gavages. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005. 29: 1959-1964.
- Isse T, Oyama T, Kitagawa K, Matsuno K, Matsumoto A, Yoshida A. Diminished alcohol preference in transgenic mice lacking aldehyde dehydrogenase activity. *Pharmacogenetics* 2002. 12: 621-626.
- Kee JY, Kim MO, You IY, Chai JY, Hong ES, An SC. Effects of genetic polymorphisms of ethanol-metabolizing enzymes on alcohol drinking behaviors. *Taehan Kan Hakhoe Chi.* 2003. 9: 89-97.
- Kim YD, Oyama T, Isse T, Kim H, Kawamoto T. Expression levels of hepatic cytochrome P450 enzymes in Aldh2-deficient mice following ethanol exposure: a pilot study. *Arch Toxicol.* 2005. 79: 192-195.
- Kim YD, Eom SY, Ogawa M, Oyama T, Isse T, Kang JW, Zhang YW, Kawamoto T, Kim H. Ethanol-induced oxidative DNA damage and CYP2E1 expression in liver tissue of Aldh2 knockout mice. *J Occup Health.* 2007. 49: 363-369.
- Kitagawa K, Kawamoto T, Kunugita N, Tsukiyama T, Okamoto K, Yoshida A. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse. *FEBS Lett.* 2000. 476: 306-311.
- Lieber CS. Microsomal ethanoloxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998) a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999. 23: 991-1007.
- Matsumoto A, Ichiba M, Horita M, Yamashita Z, Takahashi T, Isse T, Oyama T, Kawamoto T, Tomokuni K. Lack of aldehyde dehydrogenase ameliorates oxidative stress induced by single-dose ethanol administration in mouse liver. *Alcohol.* 2007. 41: 57-59.
- McManus R, Contag AO, Olson RE. Characterization of endogenous ethanol in the mammal. *Science* 1960. 131: 102-103.
- Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic*

- Biol Med. 1992. 12: 219-240.
- Ogawa M, Isse T, Oyama T, Kunugita N, Yamaguchi T, Kinaga T, Narai R, Matsumoto A, Kim YD, Kim H, Uchiyama I, Kawamoto T. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and plasma malondialdehyde (MDA) levels in Aldh2 knockout mice under acetaldehyde exposure. *Ind Health* 2006. 44: 179-183.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979. 95: 351-358.
- Oyama T, Isse T, Kagawa N, Kinaga T, Kim YD, Morita M. Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the ALDH2 gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. *Front Biosci.* 2005. 10: 951-960.
- Reinke LA, Kotake Y, McCay PB, Janzen EG. Spin-trapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: in vivo detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN. *Free Radic Biol Med.* 1991. 11: 31-39.
- Tokunaga I, Gotohda T, Ishigami A, Kitamura O, Kubo S. Toluene inhalation induced 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation as the peroxidative degeneration in rat organs. *Leg Med (Tokyo).* 2003. 5: 34-41.
- Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, Hasegawa Y, Higuchi S, Maruyama K, Shirakura K, Ishii H. Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 1998. 19: 1383-1387.
- Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Yokoyama T, Matsushita S, Higuchi S, Maruyama K, Ishii H. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* 2001. 22: 433-439.
- Yokoyama A, Watanabe H, Fukuda H, Haneda T, Kato H, Yokoyama T. Multiple cancers associated with esophageal and oropharyngolaryngeal squamous cell carcinoma and the aldehyde dehydrogenase-2 genotype in male Japanese drinkers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002. 11: 895-900.
- Zhang XS, Li Y, Brown RA, Ren J. Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly en route to oxidative stress. *Alcohol* 2004. 32: 175-186.
-