

文章编号: 1004-7271(2008)01-0034-06

## 探针药物动力学研究氟苯尼考和乙醇 对鲫 CYP2E1 活性的影响

陈大健, 冯秀娟, 江善祥

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:**用以氯唑沙宗为底物探针的药动学方法研究了氟苯尼考和乙醇对鲫细胞色素 P450 2E1 活性的影响, 为临床合理用药提供参考及鱼类 CYP2E1 的相关研究提供技术方法和理论数据。将鲫随机分为 3 组, 即对照组、氟苯尼考组和乙醇组。实验组鲫分别每日经口给予氟苯尼考 100 mg/kg·bw 和乙醇 1 g/kg·bw, 连续 5 d 后, 与对照组鲫同时一次性腹腔注射氯唑沙宗 10 mg/kg·bw, 用高效液相色谱法测定氯唑沙宗在鲫体内不同时间点的血药浓度, 并计算药动学参数。结果表明氯唑沙宗在三组鲫体内的药时数据均符合二室模型; 与对照组相比, 氟苯尼考组和乙醇组氯唑沙宗的半衰期分别增加了 5 倍和 0.9 倍 ( $P < 0.01$ ), 药时曲线下面积分别增加了 3.3 倍和 0.8 倍 ( $P < 0.01$ ), 总清除率分别减少了 83.8% 和 51.2% ( $P < 0.01$ )。提示氟苯尼考和乙醇对鲫 CYP2E1 的活性具有显著的抑制作用。其它药物与其合用时, 有效性和安全性可能会受到影响。

**关键词:** 鲫; 细胞色素 P450 2E1; 氟苯尼考; 乙醇; 氯唑沙宗; 药动学

中图分类号: S 948 文献标识码: A

## Study on effects of florfenicol and ethanol on cytochrome P450 2E1 in *Carassius auratus* by pharmacokinetic method

CHEN Da-jian, FENG Xiu-juan, JIANG Shan-xiang

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The effects of florfenicol (FFC) and ethanol (EtOH) on the activity of cytochrome P450 2E1 in *Carassius auratus* was investigated by pharmacokinetics using chlorzoxazone (CZX) as a specific substrate. Fish were divided into three groups as follows: FFC-treated group, EtOH-treated group and the control group. The experimental group fish received either FFC (100 mg/kg/day, orally) or EtOH (1 g/kg/day, orally) for 5 consecutive days. Control fish received an equal volume of normal saline only. On day 6, all groups were given an intraperitoneal injection with 10 mg/kg CZX. The plasma concentrations of CZX were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated. The results showed that the concentration-time data of CZX in three groups were all fitted two compartment model. Compared with the saline-treated control group, elimination half-lives were increased by 5 and 0.9 fold ( $P < 0.01$ ), area under the curve were increased by 3.3 and 0.8 fold ( $P < 0.01$ ), and total clearances were shortened by 83.8% and 51.2% ( $P < 0.01$ ) in the FFC- and EtOH-treated groups, respectively. The results indicated that the activity of CYP2E1 could be

收稿日期: 2007-04-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771626)

作者简介: 陈大健 (1981-), 男, 江苏滨海人, 硕士, 专业方向为兽医药理学。E-mail: nauvet@yahoo.com.cn

通讯作者: 江善祥, Tel: 025-84396770, E-mail: navy@sina.com

obviously inhibited by florfenicol and EtOH. Efficacy and safety profiles of a drug may be affected when concomitantly used with them.

**Key words:** *Carassius auratus*; CYP2E1; florfenicol; ethanol; chlorzoxazone; pharmacokinetics

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是一组由许多同功酶组成的超基因大家族, 对许多内源性和外源性化合物在体内的生物转化有重要作用<sup>[1]</sup>。许多药物可诱导或抑制特定的 CYP450 亚族的活性, 从而影响其对相应底物的代谢<sup>[2]</sup>。CYP2E1 (cytochrome P450 2E1) 是一个非常重要的代谢酶, 主要负责催化大量小分子的前毒物和前致癌物生成有毒和致癌物质<sup>[3-4]</sup> 以及 4% 上市药物的代谢<sup>[5]</sup>。CYP2E1 的活性可以通过一些特异性敏感底物来测定, 其中氯唑沙宗 (chlorzoxazone, CZX) 代谢过程是由 CYP2E1 特异催化反应, 已被用作评价 CYP2E1 体内活性的探针药物<sup>[6]</sup>。氟苯尼考 (florfenicol, FFC) 为防治水产动物细菌性疾病的常用药物; 乙醇是哺乳动物 CYP2E1 的常用诱导剂。然而, 迄今尚未见有氟苯尼考和乙醇对鱼类 CYP450 作用的研究报道。试验以鲫为研究对象, 采用体内探针药物动力学方法研究了氟苯尼考和乙醇对鱼类 CYP2E1 活性的影响, 以期在水产临床合理用药提供参考以及鱼类 CYP2E1 的相关研究提供技术方法和理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

健康雌性鲫 (*Carassius auratus*), 平均体重 ( $151.5 \pm 23.4$ ) g, 平均体长  $16.24 \pm 0.81$  cm, 由江苏省淡水水产研究所养殖基地提供, 室内养殖于  $60\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 40\text{ cm}$  的塑料水箱内, 水源为充分暴气脱氯的自来水, pH ( $7.2 \pm 0.1$ ), 空气增氧机连续充氧, 溶解氧 (DO) 为  $7.5 \sim 8.5$  mg/L, 可调控温装置控制水温在 ( $22 \pm 2$ ) °C, 每个水箱放养 5 尾, 每天换水 3 次。试验前驯养 2 周, 每日投喂不含抗生素的全价鱼饲料, 试验前 1 天停止喂食。

### 1.2 药品及试剂

氯唑沙宗标准品: Sigma, 批号 043K9020, 纯度 99.5%; 氯唑沙宗原粉: 江苏神龙药业有限公司, 批号 050708, 纯度  $\geq 98\%$ ; 氟苯尼考原粉: 湖北中牧安达药业有限公司, 批号 0503011-1, 纯度  $\geq 98\%$ ; 乙醇: 分析纯, 含量  $\geq 99.7\%$ , 南京化学试剂有限公司, 批号 050610607; 0.9% 氯化钠注射液: 国营张家港市制药厂, 批号 05062502; 甲醇: 德国 Merck, 色谱级; 乙腈: Sigma-Alorich, 色谱级; 超纯水: 用 Millipore 公司的 Milli-Q Biocel 超纯水系统制备, 电阻值  $18.2\text{ M}\Omega$ 。

### 1.3 仪器

高效液相色谱仪 (Waters); 台式高速冷冻离心机 (Beckman); 微型涡旋混合仪 (上海沪西); 电子分析天平 (北京赛多利斯)。

### 1.4 给药与血样采集

将试验鱼随机分为 3 组, 即对照组、氟苯尼考处理组和乙醇处理组。氟苯尼考处理组和乙醇处理组分别按  $100\text{ mg/kg}\cdot\text{bw}$  和  $1\text{ g/kg}\cdot\text{bw}$  剂量将氟苯尼考悬液和乙醇溶液灌入鲫前肠, 每日 1 次, 连续 5 d, 无回吐者保留试验; 对照组鲫给予等量生理盐水。第 6 天将探针药物氯唑沙宗按  $10\text{ mg/kg}\cdot\text{bw}$  剂量给 3 组鱼腹腔注射<sup>[7]</sup>, 分别于注射给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 共 13 个时间段开始采血。将每组鱼群体看作一个整体, 每个时间点每组随机取 5 尾鱼采样, 做 5 个平行样, 每尾鱼从尾静脉一次性无菌取血 1 mL 分别置预先涂有肝素钠的塑料离心管中,  $4\text{ }^\circ\text{C}$   $3\ 000\text{ r/min}$  离心 5 min, 分离出血浆, 保存于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中待测。

## 1.5 血药浓度测定

### 1.5.1 血浆样品处理

将冷冻保存的血浆自然解冻,摇匀后吸取 200  $\mu\text{L}$  于尖底具塞离心管中,加入乙腈 400  $\mu\text{L}$ ,在漩涡混合器上充分混合,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析。

### 1.5.2 色谱条件<sup>[8-9]</sup>

色谱柱为 Kromasil  $\text{C}_{18}$  柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相为甲醇-水(65:35, V/V),流速为 0.8 mL/min,检测波长为 282 nm。

## 1.6 数据处理

将所得的血药浓度-时间数据采用中国药理学学会数学药理专业委员会编制的 3P97 实用药代动力学程序软件处理,分别按一、二和三室模型用 Marquardt 法迭代拟合,根据  $F$  检验和  $AIC$  值选择最佳房室模型,计算药动学参数。对照组与实验组的主要药动学参数用  $t$  检验进行比较。

## 2 结果

### 2.1 色谱行为

氯唑沙宗的色谱行为如图 1 所示。在设定的色谱条件下,峰形较好,基线走动平稳,氯唑沙宗的保留时间在 7.8 min 左右,对照品与血浆中的杂质分离良好,无干扰峰出现。

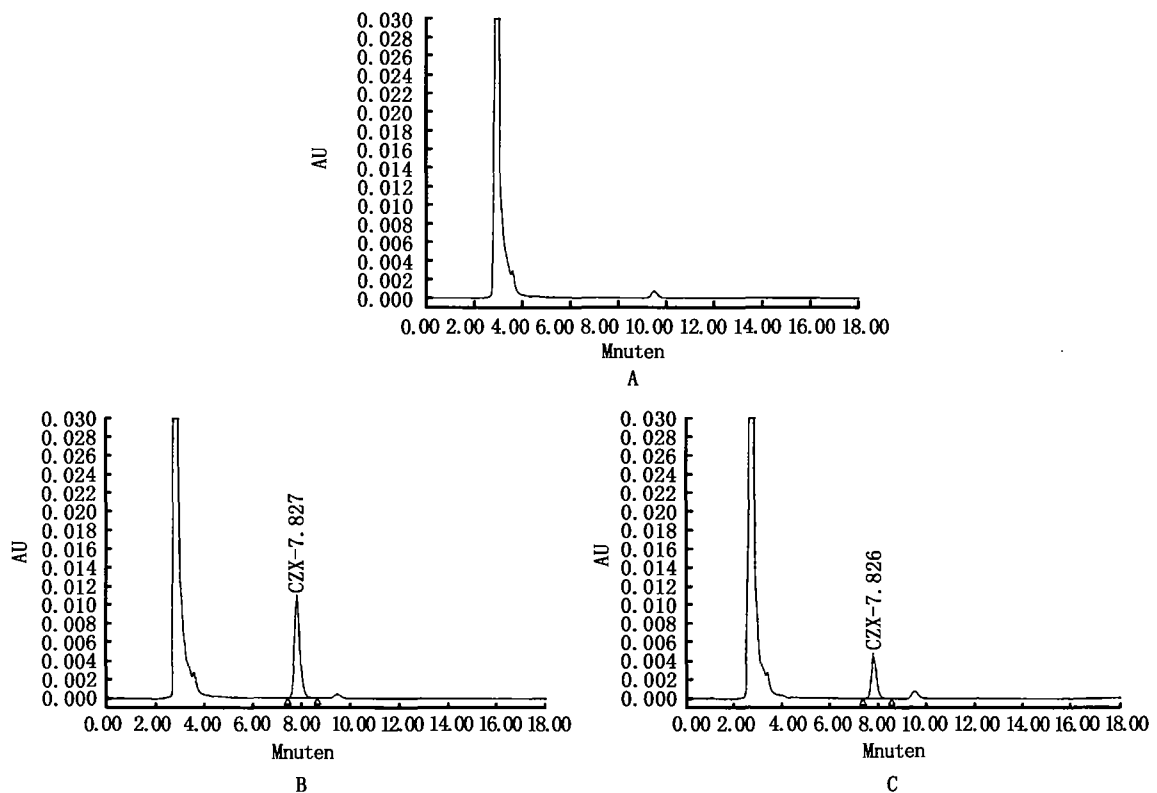


图 1 空白血浆(A)、加入氯唑沙宗的标准血浆(B)和体内注射氯唑沙宗后的样品血浆(C)的色谱图

Fig. 1 Representative HPLC chromatograms of (A) blank fish plasma, (B) plasma spiked with CZX standard, (C) plasma sample obtained after injection of CZX

### 2.2 血浆标准曲线及回收率

分别取空白鲫鱼血浆 250  $\mu\text{L}$  置于 7 个尖底具塞离心管中,各加入不同浓度氯唑沙宗标准液 250  $\mu\text{L}$ ,

制成含药物浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1、5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的血浆,按样品处理方法处理后进样,每个样品重复测定 5 次,以氯唑沙宗的峰面积( $Y$ )对其血浆浓度( $X$ )进行线性回归,得回归方程  $Y = 18955X - 53.213$ ,相关系数  $R = 0.9997$ ,线性范围 0.1 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,最低检出浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另取血浆 3 份,加入标准液,制成含药物浓度为 0.5、5、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的血样,按上述方法处理后作 HPLC 测定,每个浓度分别于日内、日间各测 5 次,结果高、中、低三个浓度的回收率均大于 95%,日内及日间变异系数均小于 6%,符合生物样品测定要求。

### 2.3 氟苯尼考和乙醇对氯唑沙宗血药浓度的影响

不同处理鲫按 10 mg/kg 剂量单次腹腔注射氯唑沙宗后的药时曲线见图 2。由结果可以看出,氟苯尼考和乙醇处理组各时间点氯唑沙宗的平均血药浓度均明显高于对照组。

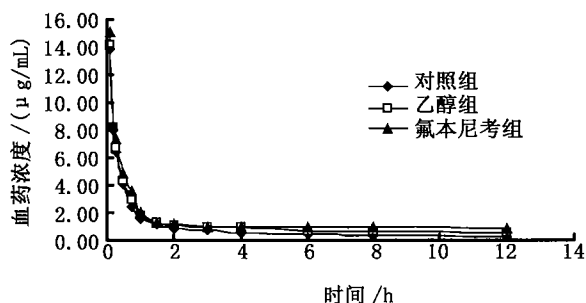


图 2 不同处理鲫单次腹腔注射氯唑沙宗(10 mg/kg)后的药时曲线

Fig. 2 CZX plasma concentration-time curve in differently treated *Carassius auratus* after single *i. p.* administration of 10 mg/kg of CZX ( $n = 5$ )

### 2.4 氟苯尼考和乙醇对氯唑沙宗药动学参数的影响

不同处理鲫腹腔注射 CZX (10 mg/kg) 后,氯唑沙宗在鲫血液中的最佳药物动力学模型均为一级吸收二室模型,权重为 1/C/C,与扈金萍等<sup>[10]</sup>在大鼠上的有关报道一致,主要药物动力学参数见表 1。结果表明,和对照组相比,氟苯尼考组和乙醇组氯唑沙宗的半衰期分别增加了 5 倍和 0.9 倍,经  $t$  检验差异显著 ( $P < 0.01$ );药时曲线下面积分别增加了 3.3 倍和 0.8 倍 ( $P < 0.01$ );总清除率分别减少了 83.8% 和 51.2% ( $P < 0.01$ )。

表 1 不同处理鲫腹腔注射氯唑沙宗(10 mg/kg)后的主要药动学参数

Tab. 1 Pharmacokinetic parameter values of CZX after single *i. p.* administration of 10 mg/kg of CZX in differently treated *Carassius auratus*

参数	单位	对照组	乙醇组	氟苯尼考组
$t_{1/2\beta}$	h	6.809 ± 0.584	13.027 ± 1.425 **	40.975 ± 4.355 **
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$	14.083 ± 1.615	25.741 ± 3.203 **	60.916 ± 5.828 **
CL	L/kg/h	0.672 ± 0.074	0.328 ± 0.058 **	0.109 ± 0.021 **

注:结果以平均数 ± 标准差形式表示,  $n = 5$ ;与对照组比较 \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

氟苯尼考是一种兽医专用的氯霉素类广谱抗生素,具有广谱、高效、体内分布广泛等特点,对部分耐氯霉素的菌株仍表现出较强的抗菌活性,同时消除了氯霉素致再生障碍性贫血的副作用,可作为氯霉素的替代品用于食品动物疾病的防治。由于 FFC 对常见水产病原菌引起的系列疾病疗效很好,加之氯霉素被禁用,因而已成为目前水产养殖中最广为使用的药物之一。然而,虽然氟苯尼考最早作为水产抗菌药物上市,但其目前在畜牧业中的应用程度已远超过水产业。目前国内尚无 FFC 在水生动物的药代动力学研究<sup>[11]</sup>,虽然国外有 FFC 在一些鱼类上的药代动力学研究报道,但有关其对动物肝药酶影响的研究国内外均属空白。

探针药物广泛地用于各种药物代谢和药代动力学方面的研究。特定的选择性探针药物可用来评价某种药物对药酶的诱导和抑制效应,可通过药物代谢的药代动力学参数的变化来评价,药代动力学参数的变化可间接反映肝脏对药物的体内代谢情况。氯唑沙宗是目前唯一的对生物体无损害的 CYP2E1 的体内探针药,约 90% 在肝脏经 6-羟化代谢生成 6-氯唑沙宗,该代谢途径主要由 CYP2E1 催化,故其在体内的代谢

情况可以反应 CYP2E1 的活性。

药酶的诱导和抑制可引致代谢性药物相互作用,从而使药物的疗效降低或者产生严重的不良反应。据统计,因药物间相互作用所引起的不良反应发生率约为 4%~54%,并且随着联合用药中药物种类的增加而增加<sup>[12]</sup>。然而目前联合用药已成为临床上重要的治疗手段,不了解和重视药物间相互作用,就可能引起意外的药源性病患。因此,在新药研发阶段就应了解候选药物的代谢酶以及候选药物本身对主要药物代谢酶的影响,这已成为国外新药临床前安全性评价的一项重要内容。迄今为止,国外已有数篇文献证实鱼类肝脏存在 CYP2E1 活性<sup>[13-15]</sup>。水生动物的肝脏药物代谢研究目前国内还是空白,国外研究的也甚少,但随着水产养殖业的发展,水产药物开发已刻不容缓。药物代谢是药物研究的基础,由于水产药物研究起步较晚,目前尚无特定的纯系水生实验动物,本试验仅选用来源广泛、适应性强、易于饲养的鲫为试验动物,采用临床给药途径,按临床 10 倍量(100 mg/kg·bw)连续 5 d 口灌给予氟苯尼考后再腹腔注射给予探药氯唑沙宗,通过氯唑沙宗的体内代谢变化情况来间接反应 FFC 对 CYP2E1 的影响。同时,本试验还研究了哺乳动物 CYP2E1 的经典诱导剂乙醇对鲫该亚型的影响。

由实验结果可以看出氯唑沙宗在鲫体内吸收非常迅速,本实验最早一个采血点是给药后 5 min,并没有观察到明显的吸收相。CZX 于相同条件下在美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes omericanus*)肝微粒体测得的代谢速率较哺乳动物低,分别为 65~148 和 400~800 pmol/min·mg<sup>[13]</sup>。本实验对照组鱼 CZX 的半衰期为 6.81 h,而文献[7]报道类似条件下 CZX 在大鼠的半衰期为 89.2 min,这种半衰期的差异与上述氯唑沙宗在鱼类和哺乳动物肝微粒体的体外代谢速率的差异是一致的,均反应了 CYP2E1 在鱼类的基础水平较低。目前,CZX 作为 CYP2E1 活性的药物探针主要通过观察  $t_{1/2\beta}$ 、CL 和 AUC 等指标,其中药物的消除半衰期( $t_{1/2\beta}$ )是决定药物消除的速度与程度的重要指标,也是最主要的评价指标。实验结果显示,和对照组相比氟苯尼考处理组氯唑沙宗的药时曲线下面积增加,清除率降低,代谢和排泄减慢。 $t_{1/2\beta}$ 为 40.98 h,和对照组(6.81 h)相比显著延长( $P < 0.01$ ),这表明氟苯尼考对鲫 CYP2E1 具有较强的抑制作用。大鼠和小鼠上的研究结果显示,氯霉素是肝微粒体 CYP450 的抑制剂<sup>[16-18]</sup>。Farombi 等<sup>[19]</sup>进一步证实氯霉素对多种细胞色素 P450 同功酶有抑制作用,可引起大鼠苯胺羟化酶、氨基比林 *N*-脱甲基酶、对硝基苯甲醚 *O*-脱甲基酶和乙氧基异吩噻唑 *O*-脱乙基酶活性显著下降。结合试验结果可以发现,氟苯尼考和氯霉素在对肝药酶的作用上具有一致性,即对肝药酶都有抑制作用。因此,当氟苯尼考与 CYP2E1 酶的底物药物如氟烷、恩氟烷、醋氨酚、非那西丁等合用时,很可能会发生药物间的相互作用,应减少后者的用量,避免蓄积中毒。乙醇在哺乳动物是 CYP2E1 的经典诱导剂,而从本试验结果可以看出,和对照组相比乙醇处理组可以使氯唑沙宗血药浓度明显升高,药时曲线下面积增加,清除率降低, $t_{1/2\beta}$ (13.03 h,约为对照组的 1.9 倍)延长( $P < 0.01$ ),表明乙醇对鲫 CYP2E1 有一定的抑制作用。鱼类的 CYP2 同功酶可被哺乳动物的 CYP2E 和 CYP2B 抗体识别,但不出现哺乳动物上观察到的苯巴比妥和乙醇型诱导剂对 P450 的诱导作用<sup>[20-21]</sup>。Schlenk 等<sup>[22-23]</sup>的研究显示,按 1 mL/kg 体重剂量给斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)腹腔注射乙醇后,肝 Western 印迹中抗 CYP2K1 的 CYP2 样条带均减少;肝脏 P450 CATL1 和 CATL2(属于 CYP2 基因家族)表达分别减少了 31% 和 41%。随后,他们又发现将斑鲴分别暴露于含 0.5% 和 1.0% 乙醇的静水中 24 h,低分子量(47-ku)的 CYP2 相关条带呈剂量依赖性减少,和哺乳动物 CYP2E1 对乙醇的反应相比,给予 EtOH 后 47-ku 条带也有表达,但是下调的<sup>[24]</sup>。这与试验乙醇对鲫 CYP2E1 活性有抑制作用的结果相符,说明乙醇对鱼类 CYP2E1 没有诱导作用,相反有一定的抑制作用,其具体作用机制尚有待进一步研究。

近几年中国对水产违禁药物和药物残留进行专项整治,氯霉素、硝基呋喃类等抗菌药物相继被禁用,加之病原菌对土霉素、磺胺类等药物耐药性日益严重,作为获准使用的抗菌药物之一,氟苯尼考以其优良的抗菌活性和安全性在水产病害防治中的科学规范使用将有助于中国水产品的食品安全及水产养殖的可持续发展。本试验研究结果为其临床合理使用提供了酶学基础上的理论依据,同时也为鱼类 P450 亚型的体内活性研究奠定了技术基础。

## 参考文献:

- [1] Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors[J]. *Biochem J*, 2000, 347(2): 321 - 337.
- [2] 夏伟. 细胞色素 P450 的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(1): 41 - 45.
- [3] Koop D R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P4502E1[J]. *FASEB J*, 1992, 6(2): 724 - 730.
- [4] Powell H, Kitteringham N R, Pirmohamed M, et al. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver; assessment by mRNA, genotype and phenotype[J]. *Pharmacogenetics*, 1998, 8(5): 411 - 421.
- [5] Kashuba A D, Bertino J S Jr. Mechanisms of drug interactions[C]//Piscitelli S C, Rodvold K A. *Drug Interactions in Infectious Disease*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000: 13 - 38.
- [6] Yamazaki H, Guo Z, Guengerich F P. Selectivity of cytochrome P4502E1 in chlorzoxazone 6-hydroxylation[J]. *Drug Metab Dispos*, 1995, 23(3): 438 - 440.
- [7] Mizuno D, Tanaka E, Tanno K, et al. Chlorzoxazone: a probe drug whose metabolism can be used to monitor toluene exposure in rats[J]. *Arch Toxicol*, 2000, 74(3): 139 - 144.
- [8] 何怀冰, 刘德林, 岳群英. RP-HPLC 测定人体血浆中氯唑沙宗[J]. *上海医科大学学报*, 1990, 17(4): 306 - 309.
- [9] 张玮芳, 郁韵秋. 血浆氯唑沙宗的反相高效液相色谱法测定[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2002, 37(5): 660 - 662.
- [10] 扈金萍, 闫淑莲, 唐静成, 等. Cocktail 探针药物评价姜黄对肝细胞色素 P450 酶的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2004, 25(4): 427 - 430.
- [11] 徐力文, 廖昌容, 刘广锋. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(4): 512 - 518.
- [12] 张安年, 梁民琦, 刘元伟. 临床常见非合理用药[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 466.
- [13] Wall K L, Crivello J. Chlorzoxazone metabolism by winter flounder liver microsomes; evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleosts[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 151(1): 98 - 104.
- [14] Crivello J F, Schultz R J. Genetic variation in the temperature dependence of liver microsomal CYP2E1 activity, within and between species of the viviparous fish *Poeciliopsis*[J]. *Environ Toxicol and Chem*, 1995, 14(1): 1 - 8.
- [15] Kaplan L A E, Fielding E, Crivello J F. Genetic regulation of liver microsomal CYP2E1 activity, among strains of the viviparous fish *P. occidentalis* and *P. lucida*[J]. *Environ Biol Fish*, 1999, 53(4): 337 - 343.
- [16] Adams H R, Isaacson E L, Masters B S. Inhibition of hepatic microsomal enzymes by chloramphenicol[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977, 203(2): 388 - 396.
- [17] Porter T D, Coon M J. Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic regulatory mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(21): 13469 - 13472.
- [18] Vincent F M, Mills L, Sullivan J K. Chloramphenicol-induced phenytoin intoxication[J]. *Ann Neurol*, 1978, 3(5): 469.
- [19] Farombi E O, Adaramoye O A, Emerole G O. Influence of chloramphenicol on rat hepatic microsomal components and biomarkers of oxidative stress: protective role of antioxidants[J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91(3): 129 - 134.
- [20] Kleinow K M, Haasch M L, Williams D E, et al. A comparison of hepatic P450 induction in rat and trout (*Oncorhynchus mykiss*): delineation of the site of resistance of fish to phenobarbital-type inducers[J]. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol*, 1990, 96(2): 259 - 270.
- [21] Stegeman J J, Hahn M E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species [C]//Malins D C, Ostrander G K. *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Boca Raton: CRC Press, 1994: 87 - 206.
- [22] Schlenk D, Ronis M J J, Miranda C L, et al. Channel catfish liver monooxygenases; immunological characterization of constitutive cytochromes P450 and the absence of active flavin-containing monooxygenases[J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(1): 217 - 221.
- [23] Schlenk D, Ronis M J J, Miranda C L, et al. Effects of 2-methylisoborneol (MIB), and ethanol on the expression and activity of cytochrome P450s from the channel catfish[J]. *J Fish Bio*, 1995, 46(2): 282 - 291.
- [24] Perkins E J, Schlenk D. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish; assessment of sexual, developmental and treatment-related effects[J]. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol*, 1998, 121(1-3): 305 - 310.