

专著

辣根过氧化物酶催化处理 水体中的甾体激素

李洪枚◎著

LAGEN GUOYANGHUAWUMEI CUIHUA CHULI
SHUITIZHONG DE ZAITI JISU



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

辣根过氧化物酶催化处理 水体中的甾体激素

李洪枚 著



知识产权出版社

全国百佳图书出版单位

图书在版编目 (CIP) 数据

辣根过氧化物酶催化处理水体中的甾体激素/李洪枚著. —北京: 知识产权出版社, 2015. 1

ISBN 978 - 7 - 5130 - 2980 - 3

I. ①辣… II. ①李… III. ①过氧化物酶—酶催化剂—甾体激素—研究 IV. ①Q548

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 207368 号

内容提要

本书介绍了 17- β 雌二醇和己烯雌酚两个典型环境雌激素的危害与毒性作用机理, 以及含这两个雌激素废水的处理方法, 重点将辣根过氧化物酶催化处理含这两种雌激素废水的最新研究方法、研究成果和研究趋势等呈现给读者。本书内容翔实、新颖, 对本科生、研究生和大学教师, 以及从事环境激素教育与研究的人员, 均具有一定的参考价值。

责任编辑: 国晓健

责任校对: 谷 洋

封面设计: 刘 伟

责任出版: 孙婷婷

辣根过氧化物酶催化处理水体中的甾体激素

李洪枚 著

出版发行: 知识产权出版社有限责任公司 网 址: <http://www.ipph.cn>

社 址: 北京市海淀区马甸南村 1 号 邮 编: 100088

责编电话: 010 - 82000860 转 8385

责编邮箱: guoxiaojian@cnipr.com

发行电话: 010 - 82000860 转 8101/8102

发行传真: 010 - 82000893/82005070/
82000270

印 刷: 北京中献拓方科技发展有限公司 经

销: 各大网上书店、新华书店及
相关专业书店

开 本: 880mm × 1230mm 1/32

印 张: 4

版 次: 2015 年 1 月第 1 版

印 次: 2015 年 1 月第 1 次印刷

字 数: 85 千字

定 价: 18.00 元

ISBN 978 - 7 - 5130 - 2980 - 3

出版权专有 侵权必究

如有印装质量问题, 本社负责调换。

目 录

1 引 言	1
1.1 环境激素的种类和危害	2
1.2 E2 的特性及处理方法	14
1.3 己烯雌酚的特性及处理方法	19
1.4 其他几种常见雌激素	25
1.5 酶催化氧化处理含雌激素废水概述	28
2 辣根过氧化物酶	34
2.1 辣根过氧化物酶的来源	34
2.2 辣根过氧化物酶的性质与结构	37
2.3 辣根过氧化物酶催化反应机理	41
2.4 辣根过氧化物酶活性测定方法	44
2.5 辣根过氧化物酶的应用	48
3 辣根过氧化物酶催化氧化雌二醇	56
3.1 研究方法	57
3.2 反应体系 pH 值对 17 β -雌二醇去除效果的 影响	60

3.3	反应温度对 17β - 雌二醇去除效果的影响	62
3.4	H_2O_2 用量对 17β - 雌二醇去除效果的影响	64
3.5	辣根过氧化物酶浓度对 17β - 雌二醇 去除效果的影响	66
3.6	底物初始浓度对 17β - 雌二醇去除效果的影响 ...	68
3.7	小结	70
4	辣根过氧化物酶催化氧化己烯雌酚	74
4.1	研究方法	75
4.2	pH 对反应体系的影响	80
4.3	温度对反应体系的影响	83
4.4	各反应物对己烯雌酚去除效果的影响	86
4.5	小结	91
5	辣根过氧化物酶催化氧化雌激素的动力学	95
5.1	反应条件对辣根过氧化物酶催化氧化雌 激素的影响	95
5.2	辣根过氧化物酶催化氧化雌激素反应动 力学研究	102
6	辣根过氧化物酶催化氧化雌激素展望	113
6.1	辣根过氧化物酶催化处理含雌激素废水 工程应用瓶颈	114
6.2	辣根过氧化物酶催化处理水体中雌激素 有待进一步开展的工作	117

1 引 言

近年来，一些外源性干扰人体和动物正常内分泌机能的化学物质备受国内外环境工作者的广泛关注^[1,2]。这些物质能显著降低生物的生殖机能，改变性器官形态和使生物雌性化，表现出雌激素活性^[3,4]，称为环境激素。

环境激素是一类能进入生物体内、具有类似雌性激素作用的、危害生物体正常激素分泌的化学物质，多数是人工合成并随着人类生产和生活排放到环境中的污染物。当它们进入人（或动物）体内时，会让人（或动物）体内的内分泌系统误认为是激素，与激素受体结合，取代了细胞中正常激素的位置，而干扰人（或动物）体的内分泌系统，尤其是造成生殖系统机能异常，导致人（或动物）体精子数量减少、生殖器官出现异常，最终引起生殖能力下降。除了影响动物和人体内分泌系统以外，科学家发现环境激素还能引起人神经系统功能障碍，智力低下，也会对人的免疫功能产生影响，即使是极其微量的环境激素也会对免疫功能产生影响^[5-8]。

1.1 环境激素的种类和危害

1.1.1 野生动物和人类的异常现象^[9]

20 世纪后期, 野生动物和人类的内分泌系统、免疫系统、神经系统出现了各种各样的异常现象。人类内分泌系统异常的突出表现是生殖异常, 除了个别现象之外, 总的趋势是“阴盛阳衰”。

最早发现一些鱼类的生殖器官始终不能发育成熟, 雌雄同体率增多, 雄性退化, 种群退化。1998 年, 研究人员发现有多只北极熊生殖器官变异; 1999 年 4 月, 日本建设省公布一项调查结果, 日本 7 条河流中的雄鲤鱼有 1/4 雌性化。^[9]

类似的现象也在人类身上出现。在世界范围内出现了人类男性的精液中精子密度减小、质量下降的现象。1992 年, 丹麦研究人员卡尔桑德等人通过对 20 多个国家 1.5 万人的调查, 得出以下结论: 从 1940 年到 1990 年, 人类男性精子质量不断下降, 精子密度下降 50%, 精液量减少 25%, 环境污染是造成人类生殖系统功能下降的主要原因。这项研究结果在世界医学界引起极大的震动和争论。随后, 法国、美国、英国和日本等国的科学家相继提出类似的报告。目前在西方发达国家, 有大约 20% 的夫妇苦于没有孩子。1998 年年底, 我国医疗部门的统计数字表明, 目前我国每 8 对夫妇当中就有一对不育, 这

个比例比 20 年前上升了 3%。医学家发现, 20 世纪 40 年代, 我国男性的平均精子密度是 $6 \times 10^7/\text{mL}$, 到了 20 世纪 90 年代, 只有大约 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 。精子活度也大幅度下降。此外, 在世界范围内, 男性睾丸癌患者显著增加。^[9]

女性乳腺癌、子宫内膜症的发病率急剧上升。现在全球每年有 120 万名妇女被确诊为乳腺癌, 50 万名妇女死于乳腺癌, 发病率以每年 5% ~ 20% 的速度上升。我国乳腺癌发病率最高的城市依次为: 上海、北京、天津。雌雄同体的“阴阳人”现象日益严重。其他内分泌异常、免疫系统功能下降、神经系统障碍的现象均大量发生。胎儿和婴儿出现多起先天性畸形、发育不全和智障的病例^[9]。

1.1.2 环境激素污染是异常现象的重要原因^[9]

究竟是什么原因造成了上述异常现象呢? 经过大量实际调查, 学者们发现, 重要原因是环境中存在一些能够像激素一样影响人体和动物体内分泌功能的物质。早在 1977 年, 日本学者就提出“环境激素”这个名词, 但是没有引起广泛注意。1996 年, 美国环境记者戴安·达玛诺斯在西方首先提出“环境激素”这个名词。她认为“环境激素”并不直接作为有毒物质给生物体带来异常影响, 而是以激素的面貌对生物体起作用, 即使数量极少, 也能让生物体的内分泌失衡, 出现种种异常现象。“环境激素”(Environmental Hormone) 也译作“环境荷尔蒙”, 学术上命名为“内分泌干扰物”(Endocrine Disrupter 或 Endocrine Disrupting Chemicals)。人们原来知道人体内有八

类激素，所以也有人把“环境激素”称为“第九类激素”。尽管它们环境中浓度极小，但是一旦进入人体和动物体内，便可以与特定的激素受体结合，进而诱导产生雌激素，或者进一步与生物体 DNA 特定的片段结合，使 DNA 序列或构象发生变化，干扰内分泌系统的正常功能。“环境激素”是影响和扰乱生物体内分泌系统的化学物质的总称，可以是自然界已经存在的化合物，也可以是人工合成的化合物。

环境激素问题一经提出，立即在全世界引起强烈反响，得到许多国家政府和有关国际组织的高度重视，被视为像臭氧层破坏、全球气候变暖一样的世界范围的重大环境问题。日本环境厅发表“环境激素战略规划公告”，对今后的方针政策作了综述。美国国家环保署和美国国家环境保健科学研究所已经成为美国环境激素研究的中枢机构，于 1998 年开始实施内分泌干扰物筛选计划，对年产量超过 4.5 万 t 的 15000 种化学品进行调查，1998 年完成简易试验法的预分析筛选，2003 年以后进行特定环境激素的动物实验。欧洲各国也普遍建立政府行为的研究中心，实施环境激素的研究计划。一些国际组织成立了环境激素专门委员会。联合国协同化学品安全国际规划署（简称 IPCS）和联合国经济合作与开发组织（简称 OECD）的专家委员会联合成立了环境激素专家委员会。1998 年，欧洲议会以压倒多数的优势通过了从欧洲市场逐步淘汰干扰激素的化学品的决议，501 名议员中仅有 4 人反对。欧共体已经禁止生产和销售用聚氯乙烯（PVC）制造的儿童玩具。

环境激素问题已经成为国际上环境科学领域中的热门研究

课题。发达国家以巨大的投入,研究环境激素的种类、污染途径、主要污染源、生态危害、分子作用机理、污染控制和防治对策。近二十年来,我国环境科学界也在积极开展环境激素的相关研究工作,环境激素影响对象也不断扩大。^[10]

1.1.3 环境激素的来源、种类及特性

环境激素无处不在,如金属罐头内部的金属防腐膜,盛食品和饮料的塑料容器,以聚碳酸酯(Polycarbonate)为原料的婴儿用奶瓶及餐具、塑料玩具,含苯乙烯的聚苯乙烯方便饭盒,合成洗涤剂 and 化妆品等日常用具或用品,大都含有环境激素类物质。有机氯农药,除草剂,杀虫剂,塑料中常用的增塑剂及原料(以双酚A和酞酸酯为主),食品加工业的清洗剂和家用洗涤剂所用的表面活性剂,食品工业用的抗氧化剂,口服避孕药,养殖业使用的抗生素和催长素,重金属类物质铅、镉、汞及有机锡以及来自人类生活、工业生产和城市固体垃圾焚烧产生的苯并[a]芘,呋喃,二恶英,这些化学物质都具有环境激素的特征。目前已被证实而被列入环境激素黑名单的有七十多种^[11,12],主要包括以下几大类:①农药、杀虫剂及其降解产品:2,2-双(对氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷、双对氯苯基三氯乙烷、2,2-双(4-氯苯基)-1,1-二氯乙烯、二溴氯丙烷、八氯化甲桥茛、六氯-环氧八氢-二甲撑萘、六氯-六氢-二甲撑萘、1,2,3,4,10,10-六氯-6,7-环氧-1,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢-1,4-挂-5,8-挂-二甲撑萘、 β -1,2,3,4,5,6-六氯环己烷、 γ -

1, 2, 3, 4, 5, 6 - 六氯环己烷、2, 2, 2 - 三氯 - 1 - (3, 4 - 二氯苯基) 乙基乙酸酯、七氯化茚、(2, 4 - 二氯苯氧基) 乙酸、2 - 氯 - 2', 6' - 二乙基 - N - 甲氧基甲基 - 乙酰基苯胺、2 - 氯 - 4 - 二乙氨基 - 6 - 异丙氨基 - 1, 3, 5 - 三嗪、1 - 正丁氨基甲酰 - 苯并咪唑 - 2 - 氨基甲酸甲酯、甲胺甲醇茶酯、1, 2, 3, 4, 7, 7 - 六氯双环 [2.2.1] 庚 - 2 烯 - 5、6 - 双羟甲基亚硫酸酯 1, 1 - 二 (对氯苯基) - 2, 2, 2 - 三氯乙醇、全氯五环癸烷和五氯酚钠。②化学工业品类 (主要是塑料和洗涤剂相关的物质): 双酚 A、二丁基酞酸、二乙基己基酞酸、苯乙烯、丁基苯甲基酞酸和 4 - 壬酚。③化学工业品: 二苯甲酮、六氯苯、多氯联苯、多溴联苯、四丁基锡、邻苯二甲酸盐、二溴乙酸。④重金属类: 铅、镉、汞和有机锡。⑤食品添加剂: 抗氧化剂丁基羟基茴香醚、肠内酯酶和雌激素类。⑥医药及医疗用品类: 己烯雌酚、4 - 氢雌二醇苯和双酚 A (牙齿填料)。⑦养殖业用的催长素: 17 β - 雌二醇。⑧二次污染物: 二噁英类和苯并呋喃类。⑨电器中使用的: 多氯联苯。⑩邻苯二甲酸 (酞酸) 类。⑪酚类。⑫苯乙烯二聚体和苯乙烯三聚体。⑬还有氯化乙烯单体、苯乙烯单体和环氧氯丙烷。

研究表明, 环境激素对生物作用具有如下特点^[13]:

①延迟性。生物在胚胎、幼年时所造成影响可能到成年或晚年才显露出来。②时段性。不同生长阶段对生物个体会造成不同方式的影响与后果。③复杂性。不同剂量、不同暴露方式对不同器官可能造成不同影响, 其毒性有时有协同或拮抗作

用。另外，环境激素的去除比较困难，主要原因是：①环境激素在环境中不易分解；②环境激素会通过食物链蓄积放大；③环境激素通常具有脂溶性，进入生物体后不易排除。

1.1.4 环境激素对动物及人类生殖的影响

通过对野生动物和实验动物的观察与研究表明，环境激素类物质能导致人及动物的生殖系统、生殖功能异常，性激素水平分泌下降，精子数量降低，生殖器官肿瘤增多，子宫癌和乳腺癌发病率提高等。

(1) 对野生动物的影响^[14]

近年来，有关野生动物生态多样性出现异常现象的报道比较多。例如：美国西北部、东南亚等地有机锡导致腹足类雄性变为不育的雌性；日本也发现了雌性贝类长出了雄性器官；加拿大的一种白鳍豚中许多雄性不仅有精巢，而且具有卵巢；在英国，雄性红鳟鱼体内发现了通常只有雌性红鳟鱼肝脏中才有的特殊蛋白质。最典型的例子是在美国佛罗里达州，曾发生剧毒物质双对氯苯基三氯乙烷泄湖事件，致使湖中鳄鱼数量锐减，且雄性的生殖器普遍变小，而雌性卵都不成熟。通过检测研究，发现双对氯苯基三氯乙烷的激素作用使鳄鱼的内分泌紊乱，从而影响正常的生殖发育机能。

(2) 对人类生殖的影响

据调查，法国男性从 1938 ~ 1990 年的 50 年来精子数量由 113×10^6 个/mL 下降到 60×10^6 个/mL，下降了近一半，且精

子活动能力减弱^[15]。苏格兰研究表明,1970年以后出生的人比1959年以前出生的人精子数量显著降低,活动精子数由 169×10^6 个/mL减少到 129×10^6 个/mL。伦敦市以泰晤士河为水源的居民中,男人的精子数量在1984~1989年比1978~1983年急剧减少,而不以泰晤士河为水源的居民则无此现象。

精巢癌在年轻男人中常见而在老年人中少见。丹麦、苏格兰、北欧各国、澳大利亚、新西兰和日本等国精巢癌症发病率逐年增高,美国50岁以下男人以每年2%~4%的比率上升,1940年以来,前列腺癌增加达3倍之多。^[16]

女性中患子宫癌及卵巢癌、乳腺癌的比率也大大提高。在美国1960~1970年间,曾有大量孕妇使用了合成雌激素己烯雌酚,而她们的子女大都有性早熟、生殖器发育异常和癌症增多等问题。

1.1.5 环境激素的毒理学研究

环境激素的特性决定了它的毒性,为有效防治环境激素对包括人类在内的生物体产生毒害作用,就必须研究环境激素的毒理学。

(1) 环境激素的毒害作用与途径^[17]

环境激素对人类的毒害作用主要表现在:①影响人类生殖功能,可导致男性精子减少 $1/4 \sim 1/2$,使女性子宫内膜症及不孕症的发病率增加;②导致免疫系统失调,癌症发病率上升,尤其是乳腺癌和前列腺癌;③通过母乳将化学污染传给下

一代，引发儿童的多动症、学习障碍等。环境激素尤其影响人类的生殖健康，诸如精子数的减少、精巢癌、前列腺癌、尿道下裂、滞留睾丸、子宫内膜症、子宫癌和乳腺癌等不胜枚举^[17]。环境激素对妇女健康的影响还突出表现为：影响她们的心情、记忆力和学习能力等。另外，环境激素对婴、幼儿的毒性比对成年人要高，主要原因是婴幼儿机体内尚未建立用于阻止或减缓外来污染物质由血液向组织器官分布的屏障，如血脑屏障、胎盘屏障^[18]。

环境激素的毒害途径：环境激素一般浓度较低，但在生态系统中，其主要是通过生物浓缩、生物积累和生物放大三种途径增大浓度，实现对生物和人类的危害。由于生物浓缩、积累和放大作用，进入环境中的污染物，即使是微量的，也会使生物尤其是处于高级营养级的生物受到严重毒害，这对生物和人类的健康构成了极大的威胁。

环境激素正是通过上述的毒害途径和其特有的作用机理，对整个生态系统尤其是人类健康产生了巨大的影响。

(2) 环境激素的作用机理^[17]

科学家们经过研究发现，激素在生物体内发挥作用大致过程如下：①内分泌腺分泌激素；②通过液体输送到目的地；③与靶细胞上的受体相结合；④向靶细胞发出遗传基因指令；⑤引起靶细胞产生特殊效应——调节控制各种物质代谢和生理功能。环境激素则会作用于上述过程中的某一环节，并产生负面影响。研究表明，环境激素可与雌激素的受体相结合，并导致雌激素的异常合成、释放和运输。例如，化学物质一旦粘附

于理应结合雌性激素的受体后,该细胞就误认为接受了雌激素,从而使机体趋于雌性化并出现早熟,导致生殖系统功能异常等。^[17]

具体来说,环境激素的毒害作用机理有以下几方面。

①激素受体途径。

环境激素具有内源性激素的活性,能与雌激素受体结合。如环境激素通过类固醇激素受体而起作用。当然,雌激素受体、雄性激素受体、补体、孕激素受体等也参与环境激素对生殖系统的毒害作用。^[19]

②神经系统途径。

环境雌激素对生物的神经系统产生毒害,影响大脑皮层、下丘脑、脑垂体等对激素分泌的调节作用,导致激素合成、释放、传输异常,作用于生物体的生殖腺,影响性激素的分泌。在雄性生殖系统中毒害睾丸,在雌性生殖系统中影响卵巢中的卵泡。通过影响肝肾代谢功能,改变体内的激素水平。人的免疫系统在环境激素的长期作用之下,会发生免疫失调和病理反应。^[20]

③染色体途径。^[20]

一些环境激素作用于细胞的染色体,使染色体的数目或结构发生变化,从而改变携带遗传信息的某些基因,使一些组织、细胞的生长失控,产生肿瘤,如发生在生殖细胞,则可能造成流产、畸胎或患遗传性疾病;胎儿出生后,体细胞遗传物质的突变易引起肿瘤。流行病学调查发现,许多农药接触者的染色体畸变率高于对照组,喷洒季节染色体的畸变率比非喷洒

季节高 5 倍。多环芳烃、芳族胺、芳族偶氮化合物、酞酸酯、氯乙烯和有亲电子基的烷化剂等都是强致癌物，它们或其代谢产物可与 DNA 共价键合，造成 DNA 的不可修复性损伤，导致细胞癌变。

1.1.6 环境激素作用机制的研究

(1) 直接进入细胞内

环境激素可能直接进入细胞内，作用于细胞核内的核酸或酶系统，引发遗传变异，虽然其发生概率很小，但不排除其可能性。

(2) 与荷尔蒙受体相结合

天然荷尔蒙是通过细胞内或细胞膜结合受体，与特定组织相互作用的。而某些环境激素分子结构与生物体的荷尔蒙结构类似，进而竞争受体或改变受体的识别，如多氯联苯类某些化合物分子与天然甲状腺素相似，对甲状腺素的作用产生干扰。1, 1, 1-三氯-2, 2-双（对甲氧苯基）乙烷、壬基酚等能够干扰雌激素受体。烯菌酮具有抗雄激素作用，就是因为它的代谢物对雄激素受体有亲和作用。环境激素的介入，与细胞膜上的荷尔蒙结合位点形成配体—受体复合物，配体—受体复合物再结合在 DNA 结合区的 DNA 反应元件上，继而 mRNA 翻译成蛋白质并表现出拟激素作用，启动一系列的生理生化过程。

(3) 阻碍天然荷尔蒙与受体的结合

某些环境激素具有阻碍天然荷尔蒙合成的能力，如在类固

醇的合成过程中，酮康唑可阻滞特定酶的反应，使类固醇类物质不能合成或合成量不足。睾丸酮是一种类固醇类物质，睾丸酮的欠缺使精子的数量以及质量均受到严重的影响。这一作用机制的观点被有关研究人员的实验研究证实。另外，雌激素的合成可被多菌醇阻滞；肾上腺素的合成可被二硫化碳改变。这些都造成体内荷尔蒙水平的变化，从而导致机体失调。

(4) 作用于细胞信号传导通路

环境激素可调节细胞膜上的离子通道。细胞内的 Ca^{2+} 浓度不超过 $10\mu\text{mol/L}$ ，而细胞外的 Ca^{2+} 浓度却超过细胞内的万倍，这是由细胞内 Ca^{2+} 的调节机理决定的。正常细胞内 Ca^{2+} 的调节机理是通过细胞膜上钙受体蛋白来发挥作用，环境激素的介入能与细胞膜上的钙受体蛋白结合，导致细胞内外的信号传导的破坏，引起细胞代谢失调甚至死亡。如某些金属离子会干扰 Ca^{2+} 在膜中的流动；硫丹可阻断 γ -氨基丁酸介导的氯通道；一些多氯联苯影响钙的体内平衡和蛋白激酶 C 的活性，也就是说，环境激素可通过调节细胞信号的途径来产生应答。

(5) 影响内分泌系统与其他系统的调控作用

内分泌系统与免疫、神经、生殖等各个系统相互影响、相互制约，内分泌调节和神经调节共同构成了机体的统一调控机制，内分泌系统的紊乱使其他系统受到伤害，从而引发致癌性、免疫毒性、神经毒性等。如甲状腺功能的低下可造成神经系统的异常。神经与免疫系统受到损害，内分泌系统也会发生障碍。

(6) 自由基学说

自由基是机体内不可缺少的，它可以维持身体内细胞的正