

# 二乙二醇類農藥其他成分對小鼠免疫細胞與特異性抗體之影響

吳偉嘉<sup>1</sup> 廖俊麟<sup>1</sup> 蔡鍵任<sup>1\*</sup>

## 摘要

吳偉嘉、廖俊麟、蔡鍵任。2017。二乙二醇類農藥其他成分對小鼠免疫細胞與特異性抗體之影響。臺灣農藥科學 2: 55-74。

本研究以小鼠免疫毒性測試方法，評估國內外常用二乙二醇類 (diethylene glycols) 農藥其他成分 (inert ingredients) 對小鼠免疫系統之影響。試驗分為體外 (*in vitro*) 與體內 (*in vivo*) 試驗。*In vitro* 試驗為評估二乙二醇類農藥其他成分對小鼠脾臟淋巴細胞之影響，並以此細胞增殖模式評估 3 種二乙二醇類農藥其他成分，其試驗濃度分別為 0、2.5 mM、5 mM、10 mM 及 25 mM。結果顯示，正對照組藥劑環磷醯胺 (cyclophosphamide, CPA)、二乙醇單丁醚 (diethylene glycol monobutyl ether, DGBE) 於濃度 (2.5 ~ 25 mM) 可明顯抑制脾臟 T 與 B 淋巴細胞的增殖作用 ( $P < 0.05$ )；二乙醇單甲醚 (diethylene glycol monomethyl ether, DGME) 於濃度 (2.5 ~ 25 mM) 可明顯抑制脾臟 T 淋巴細胞的增殖作用 ( $P < 0.05$ )；二乙醇單乙醚 (diethylene glycol monoethyl ether, DGEE) 對小鼠之脾臟淋巴細胞的增殖則無顯著差異。進一步以明顯抑制脾臟淋巴細胞的 DGBE 進行 *in vivo* 試驗，以胃管投予 DGBE (50、100 及 200 mg/kg) 進行 28 d 之免疫毒性，並以 CPA 為正對照組藥劑，評估其對 BALB/c 品系小鼠之免疫反應。分析項目包括脾臟活性細胞數 (cellularity) 與淋巴細胞增殖反應、血液相、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)、脾臟淋巴細胞分型及組織病理變化。結果顯示，DGBE 處理組對小鼠之體重、臟器重、紅血球總數、白血球總數、血球容積比及血色素等與空白對照組相較均無顯著差異，CPA 處理組對小鼠之胸腺重量呈現明顯的降低 ( $P < 0.05$ )。白血球分類計數 (WBC differential count) 結果顯示，DGBE 處理組對小鼠之淋巴球、單核球、嗜中性球、嗜伊紅性球及嗜鹼性球之比例上亦無顯著差異，CPA 處理組小鼠血液中淋巴球比例與空白對照組相較呈現明顯的減少現象 ( $P < 0.05$ )。脾

---

接受日期：2017 年 5 月 5 日

\* 通訊作者。Email: sftsai@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

臟活性細胞總數與淋巴細胞增殖試驗結果顯示，DGBE 處理組小鼠之脾臟活性細胞總數與其 T、B 淋巴細胞 *in vivo* 增殖均無顯著差異；CPA 處理組小鼠之脾臟活性細胞總數呈現明顯的抑制效應 ( $P < 0.05$ )，但其 T、B 淋巴細胞 *in vivo* 增殖數量呈現顯著的上升 ( $P < 0.05$ )。DGBE 處理組對小鼠之 IgM 抗體與淋巴細胞分型均無顯著差異，CPA 處理組對小鼠之 IgM 抗體與 B 淋巴細胞比例具明顯的抑制 ( $P < 0.05$ )。組織病理觀察結果顯示，DGBE 處理組均無明顯組織病理變化，CPA 處理組可見小鼠胸腺細胞明顯減少 ( $P < 0.05$ )，而呈現胸腺組織細胞排列鬆散情形。綜合以上結果顯示，DGBE 對小鼠在此試驗下無明顯的免疫毒性，其 28 d 免疫毒性之無可見毒害劑量 (no observed adverse effect level, NOAEL) 為 200 mg/kg/day。

**關鍵詞：**二乙二醇類、農藥其他成分、免疫毒性、無可見毒害劑量

## 緒言

二乙二醇類 (diethylene glycols) 農藥其他成分屬醇醚類 (glycol ethers) 溶劑，在美國環境保護署 (U. S. environmental protection agency, USEPA) 之毒性分類上歸為第二類農藥其他成分 (inert ingredients)，其大部分顯示對動物均具有潛在毒性，或者在結構上相似於已知毒性的化學物質<sup>(2, 29)</sup>。根據 Besenhofer 等人研究報告指出，大鼠在投予高劑量之二乙二醇類溶劑 (10000 mg/kg) 後，其代謝產物會引起代謝性酸中毒 (metabolic acidosis)、血液中尿素氮 (BUN) 與肌酸酐 (creatinine) 增加、肝臟脂肪變性 (steatosis) 以及明顯的腎臟壞死 (necrosis) 等臨床症狀<sup>(3)</sup>。根據 Johnson 等人研究報告顯示，醇醚類溶劑主要藉由醚鍵 (ether bond) 將較短鏈的烷

基 (alkyl groups) 與乙二醇 (ethylene glycol) 或丙烯乙二醇 (propylene glycol) 等相互鍵結，為極性水溶性且低揮發性之有機溶劑。因此，廣泛使用於印刷油墨、繪畫顏料、除冰劑、清潔劑、煞車油及其他化學製品的中間產物等<sup>(4, 19)</sup>，其中二乙二醇單乙醚 (diethylene glycol monoethyl ether, DGEE) 近來亦使用於超過 500 種的化妝產品當中，成為應用在皮膚醫學上新興的溶劑<sup>(24)</sup>。

另外，研究報告指出，醇醚類溶劑中乙二醇單丁醚 (ethylene glycol monobutyl ether, EGBE) 為二乙二醇類相關的衍生物 (derivatives)，對動物的紅血球細胞會造成溶血反應，進而引起脾臟、肝臟及腎臟產生繼發性之影響<sup>(4)</sup>。依據美國環境保護署毒性物質管理法 (Toxic Substances Control Act, TSCA) 提供的測試結果顯示，二乙二醇單丁醚 (dieth-

ylene glycol monobutyl ether, DGBE) 對大鼠會產生皮膚刺激性，但並不會引起生殖與發育毒性、基因毒性及神經毒性等毒性反應，其無可見毒害劑量 (no observed adverse effect level, NOAEL) 為 300 mg/kg/day<sup>(14)</sup>。

化學藥劑引起的免疫毒性主要是對免疫系統造成負面之影響，如增加疾病感染的發生率與嚴重性、腫瘤形成 (neoplasia) 及免疫系統失調 (可能誘發過敏或自體免疫疾病的產生) 等多種臨床症狀<sup>(9, 13, 26)</sup>。免疫毒性反應主要可分為四種類型，包含免疫抑制 (immunosuppression)、免疫激發 (immunostimulation)、過敏反應 (hypersensitivity) 及自體免疫反應 (autoimmunity)<sup>(10)</sup>，並且從以往人類與動物實驗證據得知，免疫抑制作用與腫瘤細胞的生長具有密切的關係<sup>(21)</sup>。在過去數十年期間，隨著免疫毒性試驗研究領域不斷地發展，對於不同種的農藥 (如殺蟲劑等) 已成為檢測是否具潛在免疫毒性的研究方向，進而評估其無可見毒害劑量 (NOAEL)<sup>(15)</sup>。

藥物對免疫系統的影響常為一較低的暴露量，使消費者在日常生活當中可能忽略長期低劑量接觸化學物質的風險，而農藥中其他成分的含量又常高於主成分，可能導致使用者容易暴露於農藥中其他成分產生的危害。對於國內外常用農藥其他成分可能殘留於蔬果的風險，實有必要瞭解常用的農藥其他成分之免疫毒性劑量與容許量間之關係外，面對近年來國內外塑化劑事件的發生，各類食品與藥品等主成分以外之其他成分的毒性作用亦成為查核與檢測

之重點，因此本研究針對國內外常用的二乙二醇類農藥其他成分缺乏免疫毒性資料，試驗上以免疫毒性之陽性藥劑——環磷醯胺 (cyclophosphamide, CPA) 作為正對照組，利用細胞增殖模式評估二乙醇單甲醚 (diethylene glycol monomethyl ether, DGME)、DGEE 及 DGBE 對小鼠脾臟淋巴細胞之增殖是否具有明顯的抑制作用，並進一步篩選對脾臟淋巴細胞增殖具明顯抑制之二乙二醇類，進行小鼠 28 d 之免疫毒性與其無可見毒害劑量，以強化常用的二乙二醇類農藥其他成分之免疫毒性資料不足。

## 材料與方法

一、試驗動物：4 週齡 BALB/c 品系雌性小鼠，購自國家實驗研究院國家實驗動物中心，在本所動物飼育室觀察 2 wk 後，依隨機方式分為空白對照組、正對照組及藥劑處理組 (50、100 及 200 mg/kg)，各組小鼠數目皆為 5 隻，以聚碳酸酯 (polycarbonate) 飼育盒飼養，分別以尾號作為標識。給予充足之飼料 (LabDiet<sup>®</sup> 5001 Rodent Diet, PMI Nutrition International, LLC, Brentwood, MO, USA) 與逆滲透水，動物飼育室之進氣經由初級、中級及高效能濾網過濾空氣，溫度範圍為 19 ~ 25°C、相對濕度範圍為 40 ~ 70% 及 12 h 光 / 12 h 暗之光照週期。所有實驗動物之使用與操作均依據「實驗動物管理與使用指南」<sup>(1)</sup> 之規範進行，且經本所實驗動物照護及使用小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, TACTRI) 審查通過。

二、試驗藥劑：二乙醇單甲醚 (DGME, Sigma, Steinheim, Germany)；二乙醇單乙醚 (DGEE, Sigma, Steinheim, Germany)；二乙醇單丁醚 (DGBE, Sigma, Steinheim, Germany)。環磷醯胺 (CPA, Sigma, Steinheim, Germany)，化學分子式： $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$ ，分子量 279.10，為白色粉末，可溶於蒸餾水。刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A, Sigma, Missouri, USA)；脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS, Sigma, L4391, Steinheim, Germany)；免疫球蛋白 M 分析套組 (Mouse IgM ELISA Quantitation Set, Bethyl, Montgomery, U.S.A.)；細胞增殖分析套組 (CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent, MTS/PES, Promega, Wisconsin, USA)。

三、實驗設計：為進一步探討農藥中其他成分是否造成免疫系統的影響，本研究主要利用體外 (*in vitro*) 與體內 (*in vivo*) 試驗進行免疫毒性之安全評估。*In vitro* 試驗以細胞增殖模式評估 3 種二乙醇類農藥其他成分對小鼠脾臟淋巴細胞之影響，其試驗濃度分別為 0、2.5 mM、5 mM、10 mM 及 25 mM；CPA 之試驗濃度分別為 0、5 mM 及 10 mM。*In vivo* 試驗分為空白對照組 (D. W.)、CPA 正對照組 (50 mg/kg) 及 DGBE 藥劑處理組 (50、100 及 200 mg/kg)，以胃管授予試驗藥劑 10 mL/kg body weight 體積量之藥物，連續投藥 28 d。試驗於第 23 d 以腹腔 (intraperitoneally) 投藥方式注射 0.2 mL 綿羊紅血球 (sheep red blood cell, SRBC)，5 d 後解剖取脾臟進行臟器重測量、脾臟細胞分離與計數、血液學分析、

白血球分類計數、脾臟淋巴細胞增殖試驗、免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 抗體測量、脾臟淋巴細胞分型及組織病理切片觀察。

四、*In vitro* 脾臟淋巴細胞增殖試驗：以無菌方式分離脾臟並製成單一細胞懸浮液，培養於 96 孔平底細胞培養盤，每孔加入  $1 \times 10^5$  個細胞後，再加入各試驗藥劑及適量的淋巴細胞裂殖素 (T 細胞裂殖素 concanavalin A (Con A) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，B 細胞裂殖素 lipopolysaccharide (LPS) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 後，培養時間與條件為 37°C、5%  $\text{CO}_2$  濃度下培養 72 h，並以 MTS 方法分析細胞增殖情形。取 MTS reagent 加入 96 孔盤 (加入 20  $\mu\text{L}$  MTS reagent/100  $\mu\text{L}$  細胞培養液) 後，培養至 37°C、5%  $\text{CO}_2$ ，4 h。使用 ELISA reader ( $\mu\text{Quant}$ , Bio-Tek Instruments, Inc.) 在波長 490 nm 下測量其吸光 (optical density, O. D.) 值。

五、脾臟細胞分離與計數：將小鼠解剖後，於無菌操作臺取出脾臟，以 RPMI-1640 (Invitrogen Corporation, N.Y., USA) 培養液將脾臟表面沖洗乾淨，置於無菌拍打袋 (Whirl-Pak<sup>®</sup>, Nasco) 內剪碎，加入 4 mL 冰冷的 RPMI-1640 培養液，以鐵胃均質機 (Stomacher, Seward, London, England) 拍打 60 s。取出細胞懸浮液至離心管，拍打袋內以 1 mL 冰冷的 RPMI-1640 培養液沖洗，並取細胞懸浮液至離心管。以下步驟均將細胞置於冰上操作。將細胞懸浮液靜置於冰上 3 min 後，離心 1000 rpm ( $104 \times g$ )，5 min，去除上清液。加入 1 mL 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -tris，混合均勻後靜置於冰上作用 3 min。加入 10

mL RPMI-1640 培養液，離心去除上清液，觀察是否仍有紅血球存在。經由無菌細胞過濾篩 (40  $\mu\text{m}$ , BD Falcon) 過濾後加入 1 mL RPMI-1640 培養液 /spleen，取細胞懸浮液與錐藍溶液 (trypan blue solution, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) 各 20  $\mu\text{L}$  混合均勻，計算每隻小鼠脾臟活性細胞總數。

六、體重與臟器重測量：每 wk 進行小鼠體重之秤重並記錄。試驗第 5 wk 結束後，解剖取脾臟、胸腺、肝臟、腦、腎臟及腎上腺，秤重後除脾臟需進行細胞分離外，其餘臟器浸泡置於 10% 福馬林中。

七、血液學分析：以含 EDTA 抗凝血管收集小鼠心臟血液後，以自動血液分析儀 (Sysmex K-4500, TOA Medical Electronics Co., Ltd., Kobe, Japan) 檢測其白血球 (white blood cell, WBC)、紅血球 (red blood cell, RBC)、血色素 (hemoglobin, HGB)、血球容積比 (hematocrit, HCT)、平均血球容積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) 及血小板 (platelet, PLT) 之數值。

八、白血球分類計數：取微量血液製作血液抹片，利用 Diff-Quick (International Reagents, Tokyo, Japan) 染色後，在光學顯微鏡下計算 200 個細胞中的白血球比例 (單核球、淋巴球、嗜中性球、嗜伊紅性球及嗜鹼性球)，再由細胞總數依比例換算各類細胞所占之百分比。

九、脾臟淋巴細胞增殖試驗：計算脾臟活性細胞總數後，調整細胞濃度至  $1 \times 10^6$  cells/mL。取 100  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液加入 96 孔平底細胞培養盤 ( $1 \times 10^5$  cells/well，每個測試樣品進行 4 重複)。再加入 100  $\mu\text{L}$  T 細胞裂殖素 Con A (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 B 細胞裂殖素 LPS (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下培養 72 h，刺激 T 或 B 細胞增殖，再以 MTS 方法分析其細胞活性。取 MTS reagent 加入 96 孔盤 (加入 20  $\mu\text{L}$  MTS reagent/100  $\mu\text{L}$  細胞培養液) 後，培養至  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ，4 h。使用 ELISA reader ( $\mu\text{Quant}$ , Bio-Tek Instruments, Inc.) 在波長 490 nm 下測量其吸光值。

十、免疫球蛋白 M 抗體測量：試驗於第 23 d 以腹腔投藥方式注射 0.2 mL 綿羊紅血球，5 d 後解剖並收集血清，利用 IgM 分析套組進行酵素結合免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。其簡要操作步驟如下：經由 Coating 抗體與 Blocking Solution 作用處理後，於 96 孔盤中加入 100  $\mu\text{L}$  的待測血清或一系列連續 2 倍稀釋的 Standard IgM，靜置 60 min 後以 Wash Solution 進行沖洗，再加入 100  $\mu\text{L}$  稀釋的 HRP Detection 抗體，靜置 60 min 並沖洗後加入 100  $\mu\text{L}$  TMB Substrate，避光靜置 15 min 後加入適量  $\text{H}_2\text{SO}_4$  結束反應，並以波長 450 nm 測定其吸光值。

十一、脾臟淋巴細胞分型：調整細胞濃度至  $1 \times 10^7$  cells/mL，取 100  $\mu\text{L}$  細胞懸浮液 ( $1 \times 10^6$  cells) 加入微量離心管中，分別加入 20  $\mu\text{L}$  的 FITC 或 PE-conjugated (BD Biosciences, California, USA) 抗體。輕微地振盪混

合均勻後，在 4°C 避光環境中作用 30 min。加入 3 mL 冰冷的 PBS (含 0.1% sodium azide 與 2% fetal bovine serum)，輕微地混合均勻。離心 1500 rpm (234 × g)，5 min，去除上清液，約留 50 μL 的細胞溶液，避免碰到細胞團塊。均勻打散細胞，加入 0.5 mL 冰冷的 PBS (含 1% paraformaldehyde)，立即輕微地振盪混合均勻，儲放在 4°C 避光環境中，在 24 h 內進行流式細胞儀 (FACSCalibur, Becton Dickinson, California, USA) 上機分析。

十二、組織病理切片觀察：將解剖後取下之臟器置於 10% (V/V) 中性福馬林溶液中固定 48 h 以上，經石臘包埋等過程製成切片 (2 μm)，經蘇木紫 (Leica, Illinois, USA) 與伊紅 (Merck, Darmstadt, Germany) 染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain) 後，在光學顯微鏡 (Nikon, Tokyo, Japan) 下觀察組織病理變化。

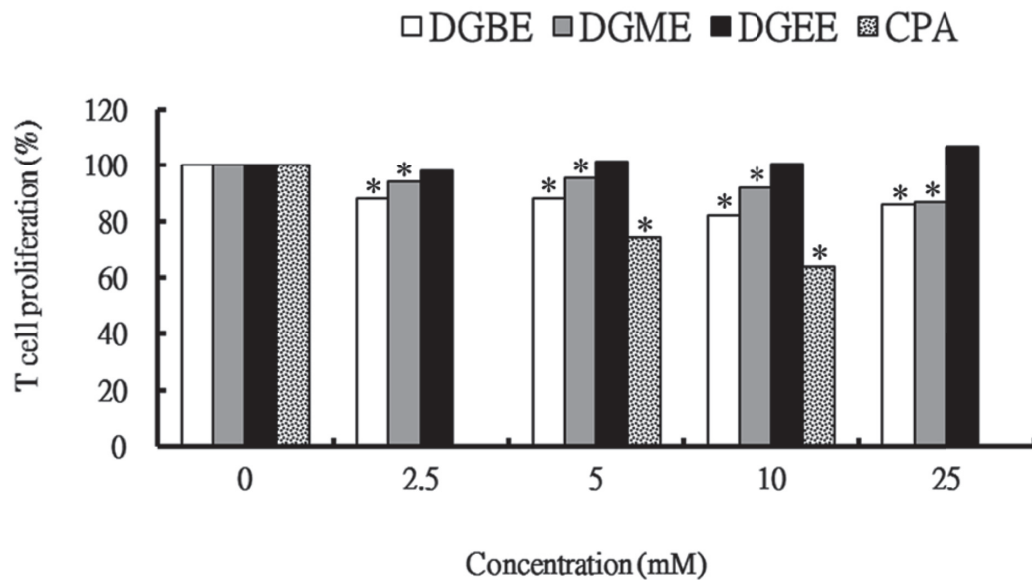
十三、結果分析：各試驗組所得數值以 Microsoft Excel 之 AVERAGE 法求取平均值與 STDEV 法求取標準偏差值，並以 one-way ANOVA 之 Dunnet 分析法比較各處理組與空白對照組之組間差異，倘數值  $P < 0.05$  則具顯著性差異。

## 結果

一、*In vitro* 脾臟淋巴細胞增殖試驗：DGBE 於低濃度 (2.5~25 mM) 可明顯抑制脾臟 T 與 B 淋巴細胞的增殖作用 ( $P < 0.05$ )，在 T 細胞裂殖素 Con A 刺激增殖下，各試驗濃度之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.51 \pm$

$0.01$ 、 $0.45 \pm 0.01$ 、 $0.45 \pm 0.01$ 、 $0.42 \pm 0.03$  及  $0.44 \pm 0.01$ ，與空白對照組 (0 mM) 相較其降低率分別為 (12.01、11.81、18.11 及 14.11)%。在 B 細胞裂殖素 LPS 刺激增殖下，各試驗濃度之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.49 \pm 0.02$ 、 $0.45 \pm 0.01$ 、 $0.44 \pm 0.01$ 、 $0.43 \pm 0.01$  及  $0.44 \pm 0.01$ ，與空白對照組 (0 mM) 相較其降低率分別為 (9.14、10.63、12.25 及 11.10)%；DGME 於低濃度 (2.5~25 mM) 可明顯抑制脾臟 T 淋巴細胞的增殖作用 ( $P < 0.05$ )，在 T 細胞裂殖素 Con A 刺激增殖下，各試驗濃度之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.54 \pm 0.01$ 、 $0.51 \pm 0.01$ 、 $0.51 \pm 0.01$ 、 $0.49 \pm 0.02$  及  $0.47 \pm 0.01$ ，與空白對照組 (0 mM) 相較其降低率分別為 (5.87、4.80、8.10 及 13.13)%。在 B 細胞裂殖素 LPS 刺激增殖下，各試驗濃度之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.52 \pm 0.01$ 、 $0.51 \pm 0.01$ 、 $0.51 \pm 0.01$ 、 $0.51 \pm 0.01$  及  $0.48 \pm 0.02$ ，與空白對照組 (0 mM) 相較其降低率分別為 (2.41、1.83、1.45 及 7.91)%；DGEE 對小鼠之脾臟淋巴細胞的增殖均無顯著差異；CPA 於各濃度 (5 與 10 mM) 均可明顯抑制脾臟 T 與 B 淋巴細胞的增殖 ( $P < 0.05$ ) (圖一、圖二)。*In vivo* 試驗進一步篩選對脾臟淋巴細胞較具抑制作用之 DGBE 進行 28 d 免疫毒性之安全評估，其胃管投予劑量分別為 50、100 及 200 mg/kg，並藉由脾臟活性細胞總數分析、血液學分析、脾臟淋巴細胞增殖試驗、酵素結合免疫吸附分析、脾臟淋巴細胞分型試驗及病理組織判讀等技術，評估其對小鼠免疫系統之影響。

二、體重與臟器重測量：DGBE 處理組



圖一、*In vitro* 處理，DGBE、DGME、DGEE 及 CPA 對小鼠脾臟 T 淋巴細胞增殖之影響。

**Fig. 1.** Blastogenic effect on splenocyte T lymphocyte under *in vitro* treatment with DGBE, DGME, DGEE, or CPA.

Data are expressed as a percentage (%) ( $n = 4$ ). The \* symbol indicates that results between the treatment group and blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).

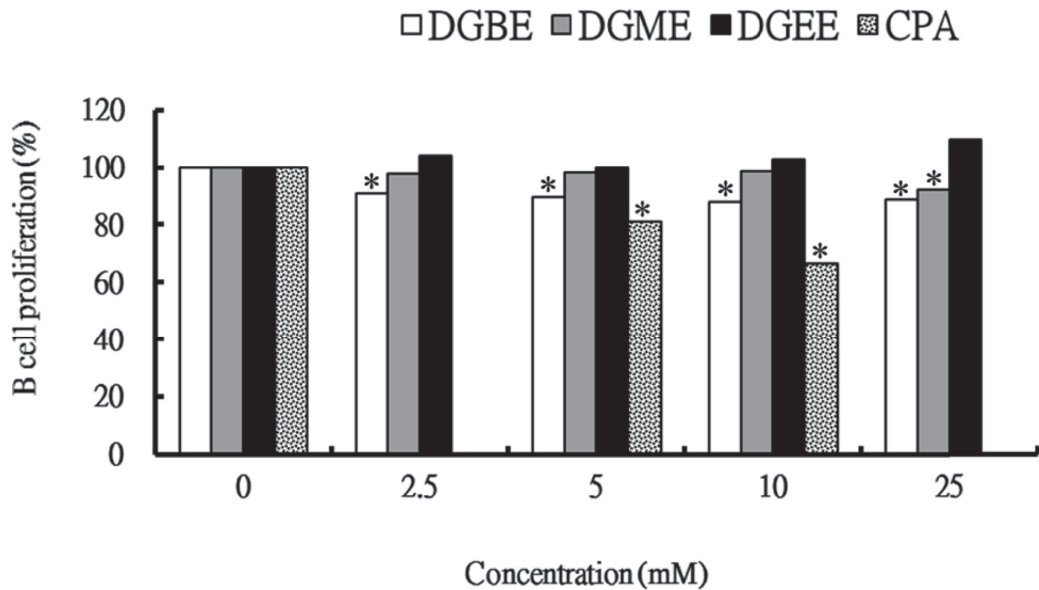
對小鼠之體重與臟器重均無顯著差異，CPA 處理組對小鼠之胸腺重量呈現明顯的降低 ( $P < 0.05$ )，其絕對 (absolute) 與相對 (relative) 臟器重分別為  $0.02 \pm 0.00$  與  $0.10 \pm 0.02$  (表一、表二)。

三、血液學分析：DGBE 處理組對小鼠之紅血球總數、白血球總數、血球容積比及血色素等與空白對照組相較均無顯著差異 (表三)；白血球分類計數 (WBC differential count) 結果顯示，DGBE 處理組對小鼠之淋巴球、單核球、嗜中性球、嗜伊紅性球及嗜鹼性球之比例上亦無顯著差異，CPA 處理組之淋巴球比例與空白對照組相較呈現

明顯的減少現象 ( $P < 0.05$ )，其比例為  $(39.00 \pm 13.23) \%$  (表四)。

四、脾臟活性細胞分析與 IgM 抗體測量：DGBE 處理組對小鼠之脾臟活性細胞均無顯著差異，CPA 處理組對小鼠之脾臟活性細胞呈現明顯的抑制 ( $P < 0.05$ )，其活性細胞為  $0.47 \pm 0.24 (\times 10^7 \text{ cells/spleen})$  (圖三)。在 IgM 抗體測量上，DGBE 處理組對小鼠之 IgM 抗體均無顯著差異，CPA 處理組對小鼠之 IgM 抗體具明顯的抑制 ( $P < 0.05$ )，其數值為  $(3.06 \pm 0.04) \mu\text{g/mL}$  (圖四)。

五、*In vivo* 脾臟淋巴細胞增殖試驗：DGBE 處理組對小鼠之淋巴細胞增殖均無顯



圖二、*In vitro* 處理，DGBE、DGME、DGEE 及 CPA 對小鼠脾臟 B 淋巴細胞增殖之影響。

**Fig. 2.** Blastogenic effect on splenocyte B lymphocyte under *in vitro* treatment with DGBE, DGME, DGEE, or CPA.

Data are expressed as a percentage (%) (n = 4). The \* symbol indicates that results between the treatment group and blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).

表一、經口投予 DGBE 對小鼠體重之經時變化

**Table 1.** Changes of body weight in mice orally treated with DGBE at different exposed periods

Treatment*	Body weight (g)				
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
D.W. (10 mL/kg)	21.08 ± 0.68	20.94 ± 0.99	21.52 ± 0.93	21.66 ± 1.13	21.74 ± 1.18
CPA (50 mg/kg)	21.20 ± 0.79	20.96 ± 0.75	21.00 ± 0.48	21.12 ± 0.60	20.54 ± 0.71
DGBE (50 mg/kg)	21.32 ± 0.93	21.10 ± 1.01	21.34 ± 1.10	21.84 ± 1.24	21.92 ± 1.07
DGBE (100 mg/kg)	20.90 ± 0.66	20.92 ± 0.80	21.68 ± 0.71	21.54 ± 0.89	21.60 ± 0.85
DGBE (200 mg/kg)	20.72 ± 0.45	21.22 ± 0.50	21.50 ± 0.85	21.76 ± 0.72	21.58 ± 0.72

\* Mice were orally exposed to 10 mL/kg/day D.W.; 50 mg/kg/day CPA; or 50, 100, or 200 mg/kg/day DGBE for 28 days. Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 5).

表二、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠絕對與相對臟器重之變化<sup>1)</sup>**Table 2.** Absolute and relative weight changes in organs of mice orally treated with DGBE at different concentrations<sup>1)</sup>

Organ	D.W. (10 mL/kg)	CPA (50 mg/kg)	DGBE (50 mg/kg)	DGBE (100 mg/kg)	DGBE (200 mg/kg)
Thymus (g)	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00 <sup>2)</sup>	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02
% of body weight	0.21 ± 0.06	0.10 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.26 ± 0.08	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.07
Spleen (g)	0.15 ± 0.04	0.10 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.05
% of body weight	0.71 ± 0.20	0.49 ± 0.21	0.84 ± 0.18	0.78 ± 0.19	0.84 ± 0.23
Liver (g)	1.16 ± 0.08	1.17 ± 0.09	1.13 ± 0.09	1.11 ± 0.08	1.08 ± 0.08
% of body weight	5.32 ± 0.10	5.71 ± 0.26	5.17 ± 0.34	5.16 ± 0.34	5.02 ± 0.28
Kidney (g)	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.33 ± 0.06
% of body weight	1.35 ± 0.12	1.33 ± 0.04	1.39 ± 0.07	1.32 ± 0.14	1.53 ± 0.28
Adrenal (mg)	9.07 ± 1.79	8.70 ± 1.05	8.82 ± 1.80	8.91 ± 0.56	8.43 ± 1.88
% of body weight	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01
Brain (g)	0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.02
% of body weight	1.97 ± 0.18	2.02 ± 0.09	1.94 ± 0.08	2.02 ± 0.12	2.01 ± 0.09

<sup>1)</sup> Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 5).

<sup>2)</sup> Results between the treatment group and the blank control group were significantly different at a level of  $P < 0.05$ .

表三、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠血液學之變化<sup>1)</sup>**Table 3.** Hematological changes in mice orally treated with DGBE at different concentrations<sup>1)</sup>

Hematological characteristic	D.W. (10 mL/kg)	CPA (50 mg/kg)	DGBE (50 mg/kg)	DGBE (100 mg/kg)	DGBE (200 mg/kg)
RBC <sup>(2)</sup> (10 <sup>6</sup> )	8.34 ± 0.85	7.31 ± 0.47	8.18 ± 1.01	8.60 ± 0.29	6.98 ± 1.77
Hct <sup>(3)</sup> (%)	43.82 ± 4.74	40.80 ± 2.36	43.12 ± 5.62	45.08 ± 1.52	41.27 ± 9.00
Hb <sup>(4)</sup> (g/dL)	15.07 ± 0.42	14.66 ± 1.67	14.10 ± 1.81	14.85 ± 0.42	14.78 ± 1.25
MCV <sup>(5)</sup> (fL)	52.52 ± 0.60	55.82 ± 0.57	52.70 ± 0.47	52.43 ± 0.72	52.04 ± 0.33
WBC <sup>(6)</sup> (10 <sup>3</sup> )	5.27 ± 0.84	3.64 ± 1.45	5.88 ± 2.66	4.85 ± 1.14	3.50 ± 1.27

<sup>1)</sup> Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 5).

<sup>2)</sup> RBC: red blood cell

<sup>3)</sup> Hct: hematocrit

<sup>4)</sup> Hb: hemoglobin

<sup>5)</sup> MCV: mean corpuscular volume

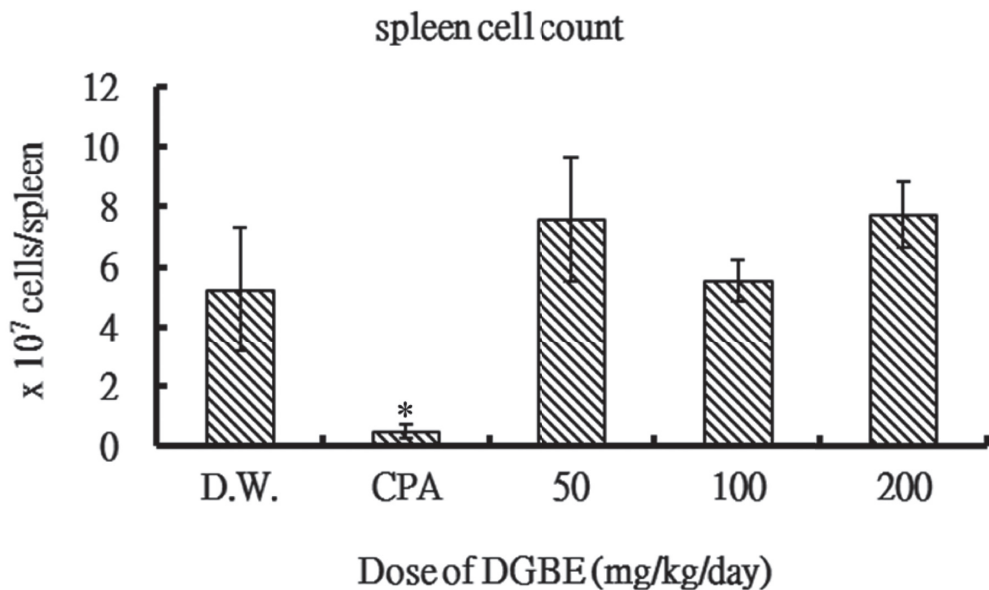
<sup>6)</sup> WBC: white blood cell

表四、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠白血球分類計數之變化<sup>1)</sup>Table 4. WBC differentials in mice orally treated with DGBE at different concentrations<sup>1)</sup>

Type of WBC	D.W. (10 mL/kg)	CPA (50 mg/kg)	DGBE (50 mg/kg)	DGBE (100 mg/kg)	DGBE (200 mg/kg)
Monocytes (%)	5.80 ± 4.21	3.80 ± 1.64	3.60 ± 1.52	5.40 ± 2.88	4.00 ± 1.00
Lymphocytes (%)	73.60 ± 5.41	39.00 ± 13.23 <sup>2)</sup>	65.00 ± 6.63	62.40 ± 7.60	66.40 ± 8.38
Neutrophils (%)	16.40 ± 6.80	54.60 ± 12.12 <sup>2)</sup>	28.60 ± 6.31	29.80 ± 8.14	26.80 ± 6.83
Eosinophils (%)	4.20 ± 1.48	2.60 ± 1.52	2.80 ± 1.30	2.40 ± 1.14	2.80 ± 0.84
Basophils (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

<sup>1)</sup> Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 5).

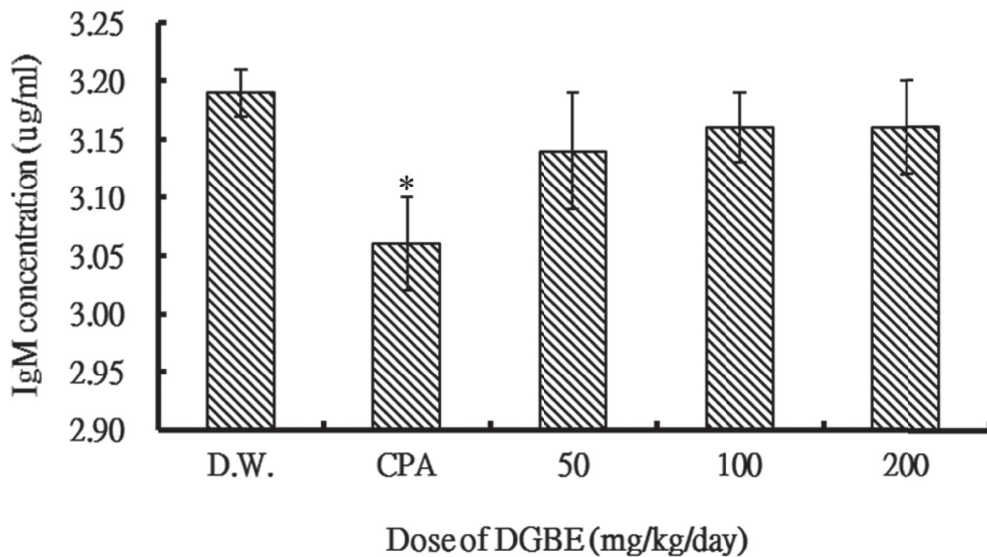
<sup>2)</sup> Results between the treatment group and the blank control group were significantly different at a level of  $P < 0.05$ .



圖三、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠脾臟活性細胞總數之變化。

Fig. 3. Changes in spleen cellularity in mice orally treated with DGBE at different concentrations.

Data are expressed as the mean ± S.D. (n = 5). The \* symbol indicates that results between the treatment group and the blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖四、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠免疫球蛋白 M (IgM) 抗體反應之變化。

**Fig. 4.** Changes of immunoglobulin M (IgM) antibody response to SRBC in mice orally treated with DGBE at different concentrations.

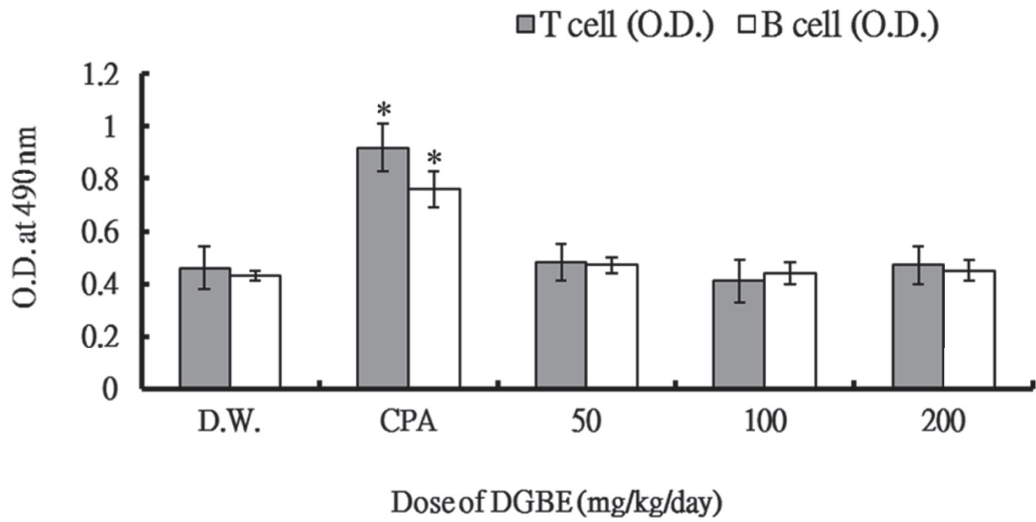
Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). The \* symbol indicates that between the treatment group and the blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).

著差異，CPA 處理組對小鼠之 T 與 B 淋巴細胞具明顯的增殖作用 ( $P < 0.05$ )。在 T 細胞裂殖素 Con A 刺激增殖下，各試驗處理組之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.46 \pm 0.08$ 、 $0.92 \pm 0.09$ 、 $0.48 \pm 0.07$ 、 $0.41 \pm 0.08$  及  $0.47 \pm 0.07$ ，CPA 處理組與空白對照組相較其增加率為 100%；在 B 細胞裂殖素 LPS 刺激增殖下，各試驗處理組之淋巴細胞增殖結果分別為  $0.43 \pm 0.02$ 、 $0.76 \pm 0.07$ 、 $0.47 \pm 0.03$ 、 $0.44 \pm 0.04$  及  $0.45 \pm 0.04$ ，CPA 處理組與空白對照組相較其增加率為 76.74% (圖五)。

六、脾臟淋巴細胞分型：DGBE 處理組對小鼠之 T 淋巴細胞 (CD3+)、輔助型

(helper) T 淋巴細胞 (CD4+)、毒殺型 (cytotoxic) T 淋巴細胞 (CD8+) 以及 B 淋巴細胞 (CD19+) 均無顯著差異。CPA 處理組對小鼠之 T 淋巴細胞 (CD3+、CD4+、CD8+) 呈現明顯的增加 ( $P < 0.05$ )，其比例 (CD3+、CD4+、CD8+) 分別為  $(56.04 \pm 6.03$ 、 $34.54 \pm 4.78$  及  $15.64 \pm 0.60)$  %；對小鼠之 B 淋巴細胞則具顯著抑制之影響 ( $P < 0.05$ )，其比例為  $(19.70 \pm 2.64)$  % (圖六、圖七)。

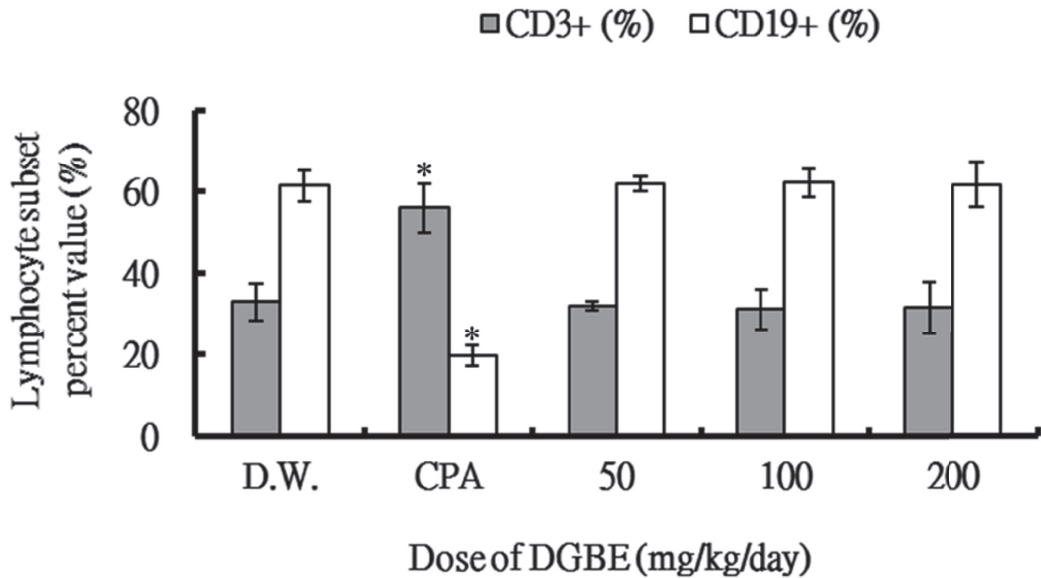
七、組織病理觀察：經蘇木紫與伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin stain, H&E stain) 後，在光學顯微鏡下觀察組織病理變化。DGBE 處理組均無明顯的組織病變 (圖八)，CPA



圖五、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠脾臟 T 與 B 淋巴細胞增殖之影響。

Fig. 5. Blastogenic response of splenocyte T and B lymphocyte in mice orally treated with DGBE at different concentrations.

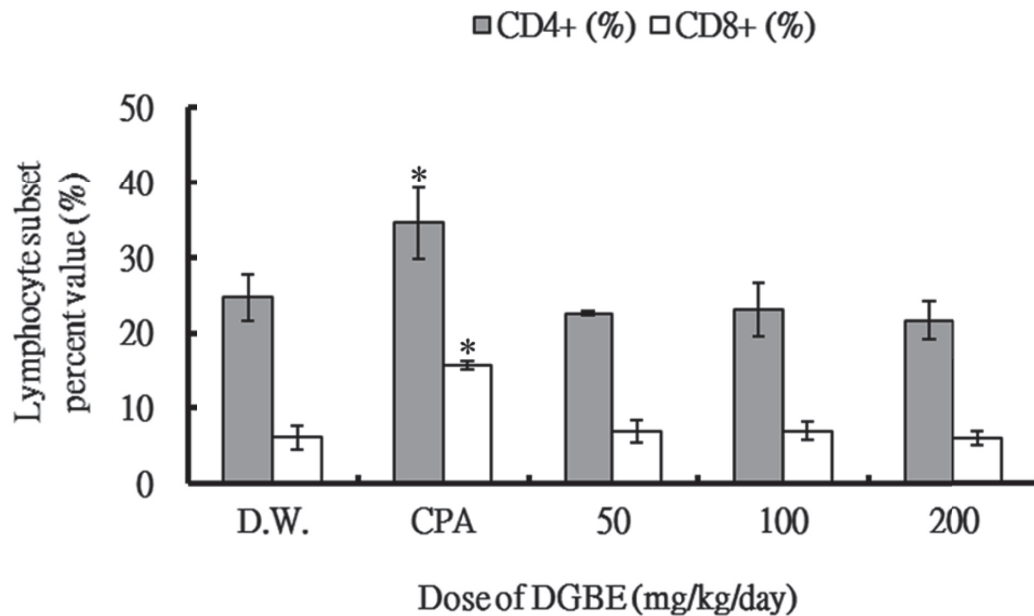
Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). The \* symbol indicates that results between the treatment group and the blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖六、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠脾臟淋巴細胞分型之變化。

Fig. 6. Changes in the splenocyte subset of mice orally treated with DGBE at different concentrations.

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). The \* symbol indicates that results between the treatment group and the blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖七、經口投予不同劑量 DGBE 對小鼠脾臟 T 淋巴細胞分型之變化。

Fig. 7. Changes in the T cell subset of mice orally treated with DGBE at different concentrations.

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). The \* symbol indicates that results between the treatment group and the blank control group were significantly different ( $P < 0.05$ ).

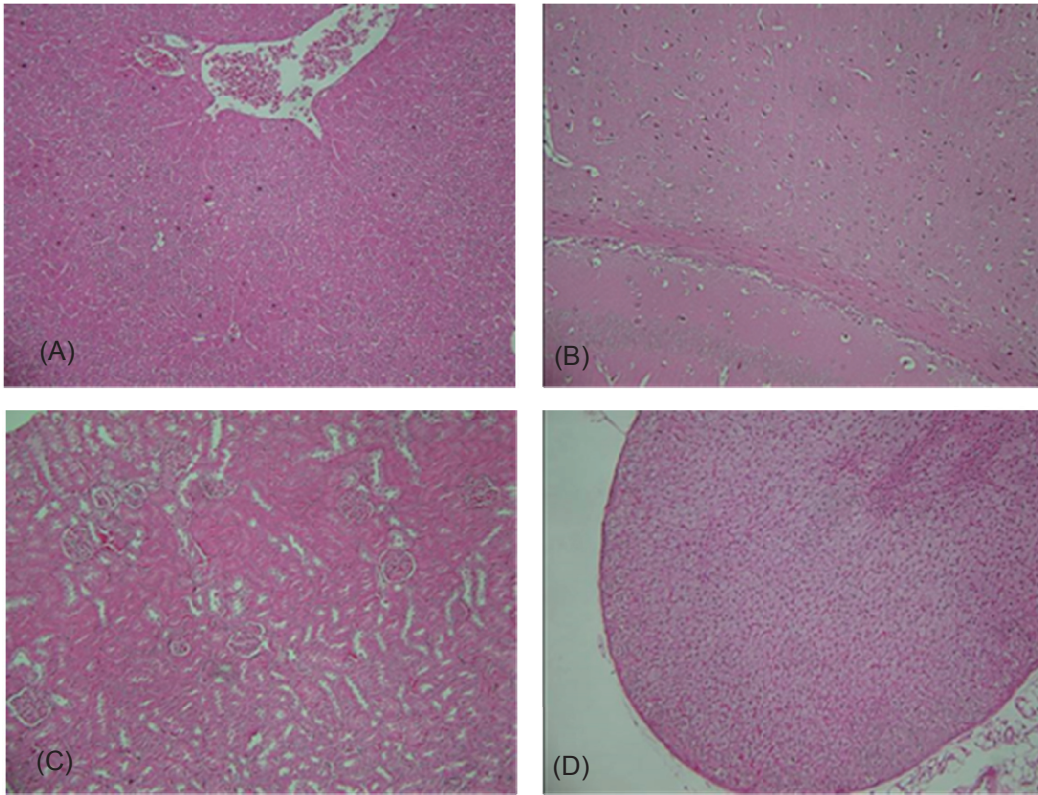
處理組可導致小鼠之胸腺細胞明顯減少，而呈現胸腺組織細胞排列鬆散情形（圖九）。

## 討論

本研究所評估之二乙醇單丁醚 (DGBE) 為美國環境保護署列為第二類農藥其他成分<sup>(2, 29)</sup>，大部分顯示對動物均具有潛在毒性，或者在結構上相似於已知毒性的化學物質，才引起我們研究的興趣。相較於第一類其他成分已確認具有特定毒性，如致癌性 (carcinogenicity)、神經毒性 (neurotoxicity)、生殖毒性 (reproductive toxicity) 以及發

育毒性 (developmental toxicity) 等不同。另外根據前人研究報告顯示，成長發育中的免疫系統對於化學藥劑所誘導 (xenobiotic-induced) 的傷害比成人時期更加敏感<sup>(11)</sup>。因此，近年來對於發育中免疫毒性 (developmental immunotoxicity, DIT) 之研究亦漸漸引起許多人的關注，並且被認為是影響人類疾病發生之重要因子<sup>(17, 18)</sup>，也是本研究要對具潛在毒性二乙二醇類之農藥其他成分進行免疫毒性探討的主因。

本研究所評估之 DGBE 藥劑雖對小鼠之主要臟器或免疫器官重量無顯著差異，但在 CPA 正對照處理組則對小鼠之胸腺

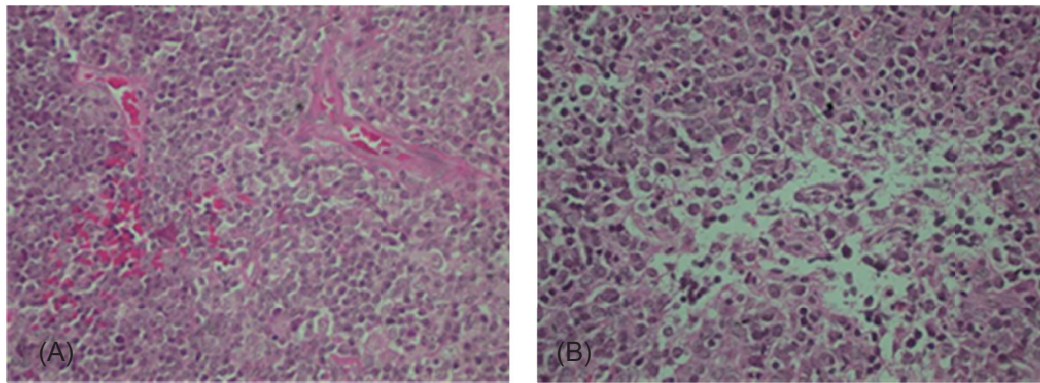


圖八、DGBE 處理組對小鼠主要臟器之組織病理變化 (H&E 染色，100×)。肝臟 (A)、腦 (B)、腎臟 (C) 及腎上腺 (D) 均無明顯組織病理變化。

**Fig. 8.** Histopathological changes in major organs of mice treated with DGBE (H&E stain, 100 × magnification). No significant histopathological changes were observed in the liver (A), brain (B), kidney (C), or adrenal gland (D).

重量呈現明顯的降低之影響。由於胸腺屬於淋巴系統裡的初級免疫器官 (primary lymphoid organs)，為 T 淋巴細胞成熟的地方，當胸腺器官受損常為免疫抑制判斷的標準之一<sup>(20)</sup>。根據前人研究報告顯示，胸腺的萎縮 (atrophy) 可能與其淋巴細胞之細胞凋亡 (apoptosis) 有關<sup>(7, 8, 12)</sup>。多數生物利用細胞死亡作為防禦措施，當細胞

被感染、老化或突變時，往往導致細胞死亡<sup>(5)</sup>。在脾臟淋巴細胞增殖研究上，體外試驗雖然 DGBE 於低濃度 (2.5 mM) 可明顯抑制脾臟 T 與 B 淋巴細胞的增殖作用，但在動物實驗則呈現無顯著差異情形，目前有關 DGBE 對細胞作用之機制還未完全明瞭，但可能與其會造成氧化壓力有關<sup>(27, 31)</sup>，在 CPA 處理組則對小鼠之 T 與 B 淋巴細胞



圖九、環磷醯胺處理組小鼠胸腺之組織病理變化 (H&E 染色，400×)。空白對照組 (A) 之胸腺無明顯病理變化，環磷醯胺處理組 (B) 之胸腺呈現明顯淋巴細胞數量減少的現象。

**Fig. 9.** Histopathological changes in mice treated with cyclophosphamide (H&E stain, 400× magnification). In the control group (A) the thymus did not show significant histopathological changes. However, in the cyclophosphamide group (B), the thymus showed a significant decrease in the number of lymphocytes.

具明顯的增殖作用，推測其原因可能與整體脾臟淋巴細胞受抑制時所產生的補償效應 (compensative effect) 有關<sup>(23)</sup>。當外來物質或病原菌接觸淋巴細胞時，須先進行細胞增殖反應並產生足夠的細胞或抗體以清除異物，使得淋巴細胞增殖為免疫反應重要的過程，亦為評估是否具潛在免疫毒性的重要指標之一，其中 T 細胞裂殖素 Con A (為一聚合的植物蛋白質，廣泛地使用於促進 T 細胞的活化) 與 B 細胞裂殖素 LPS (具高度免疫性之抗原且能刺激 B 細胞的增殖與分化) 為目前測試上常用來作為刺激淋巴細胞增殖藥劑之一<sup>(21, 22)</sup>。

在 IgM 抗體評估方面，DGBE 藥劑對小鼠之 IgM 抗體無顯著差異，而 CPA 處理組則具明顯的抑制，推測其原因可能跟

小鼠整體免疫力降低與具分泌抗體功能之 B 細胞受到抑制有關<sup>(21)</sup>，此 CPA 處理組之 IgM 受抑制亦與造成血液之淋巴球比例明顯減少及脾臟淋巴細胞分型中 B 淋巴細胞受到明顯的抑制之結果趨勢一致。B 細胞是屬於體液性免疫反應 (humoral immunity response)，當 B 細胞免疫球蛋白受器接受到外來抗原時，除了輔助 T 細胞的刺激外，主要為促進 B 細胞的分化與繁殖成為漿細胞 (plasma cell) 與記憶細胞 (memory cell)，進而產生大量抗體。其主要包含 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 等五種免疫球蛋白，IgG 主要平均分布於血管內外，為續發性免疫反應與抗毒素 (antitoxin) 中的主要抗體，也是血液中含量最高的抗體，並可以藉由胎盤由母體傳給胎兒<sup>(20)</sup>；IgM 為對抗

抗原性複雜的感染性微生物時，最早出現的抗體。細胞性免疫反應 (cellular immunity response) 則以活化毒殺型 T 細胞為主，使得毒殺型 T 細胞能快速繁殖進而殲滅被病原菌感染的細胞。因此，T 細胞在細胞性免疫反應中扮演重要的角色，其活化可經由 T 細胞受體 (T cell receptor, TCR) 與共激分子 (co-stimulatory molecule) CD28 的作用下形成<sup>(25)</sup>。

本研究利用國際公認較快速、敏感且變異性較少之 ELISA 分析方法評估 DGBE 對體液性免疫反應之影響，並以 SRBC (T 細胞依賴性之抗原) 作為誘發初級抗體反應之抗原，其分析結果為評估化學藥劑或農藥其他成分是否具潛在免疫毒性的重要指標之一<sup>(28, 30)</sup>。根據前人研究報告顯示，T 細胞依賴性之抗原 (T-cell-dependent antigen) 所誘發的初級抗體反應 (primary antibody response) 已被廣泛地作為免疫功能之綜合評估<sup>(16)</sup>。此外，在免疫反應的過程中 T 細胞除了幫助 B 細胞進行細胞增殖、分化以及製造抗體外，主要負責各種細胞激素的分泌與生成，如腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 與干擾素- $\gamma$  (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ) 等，這些細胞激素分別負責扮演上游細胞間訊息傳遞之關鍵性蛋白質與抑制腫瘤細胞及參與免疫反應<sup>(6)</sup>。另外，在組織病理觀察與判讀上，DGBE 藥劑對小鼠之主要臟器或免疫器官無產生明顯病理變化，而 CPA 處理組則造成胸腺組織細胞明顯減少情形，其結果與 CPA 藥劑造成胸腺重量減輕、脾臟活性細胞總數減少及淋

巴細胞受抑制等現象一致，為化學物質篩選是否引起免疫毒性反應之重要評估指標與檢查參數之一<sup>(30)</sup>。

綜合以上試驗結果顯示，DGBE 處理組對小鼠之體重與臟器重、脾臟活性細胞總數、血液與白血球分類分析、脾臟淋巴細胞增殖與分型、IgM 抗體及組織病理變化等與空白對照組相較均無顯著差異，顯示 DGBE 對小鼠在此試驗劑量下無明顯的免疫毒性，其 28 d 免疫毒性之無可見毒害劑量 (NOAEL) 為 200 mg/kg/day，此劑量可做為二乙醇單丁醚 (DGBE) 的暴露風險評估與管理參考，當 DGBE 所訂定人體每日可接受暴露量的 NOAEL 值低於此劑量時，則其免疫毒性暴露風險低。

## 謝辭

本研究承蒙農委會農業藥物毒物試驗所科技計畫之經費補助，本組張淑滿小姐及劉清標先生等人協助實驗之進行，謹此誌謝。

## 引用文獻

1. 王明升、余玉林、余俊強、宋永義、李碧珍、林宗德、林宗毅、周京玉、洪昭竹、翁仲男、秦咸靜、梁善居、許桂森、陳保基、張維正、黃英豪、葉力森、廖欽峰、蔡倉吾、蘇怡欣 編。2010。實驗動物管理與使用指南 (第三版擴充版)。行政院農業委員會。臺北。270 頁。

2. 蔡三福、戴仔奴、黃振聲。2007。農藥佐劑對哺乳類動物可能的毒性與危害。藥毒所專題報導 86：1-14。
3. Besenhofer, L. M., Adegboyega, P. A., Bartels, M., Filary, M. J., Perala, A. W., McLaren, M. C., and McMartin, K. E. 2010. Inhibition of metabolism of diethylene glycol prevents target organ toxicity in rats. *Toxicol. Sci.* 117: 25-35.
4. Boatman, R. J., and Knaak, J. B. 2001. Ethers of ethylene glycol and derivatives, pp. 73-270. *In: E. Bingham, B. Cohrssen, and C. H. Powell [eds.], Patty's Toxicology, 5th ed. John Wiley & Sons, New York, NY, USA. 1024 pp.*
5. Burlacu, A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* 7: 249-257.
6. Carfi', M., Gennari, A., Malerba, I., Corsini, E., Pallardy, M., Pieters, R., Van Loveren, H., Vohr, H. W., Hartung, T., and Gribaldo, L. 2007. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology* 229: 11-22.
7. Dacasto, M., Cornaglia, E., Nebbia, C., and Bollo, E. 2001. Triphenyltin acetate-induced cytotoxicity and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> depletion in mouse thymocyte primary cultures. *Toxicology* 169: 227-238.
8. Dacasto, M., Nebbia, C., and Bollo, E. 2001. In vitro effects of triphenyltin acetate (TPTA) on mouse lymphocyte proliferation. *Toxicol. In Vitro.* 15: 343-346.
9. De Jong, W. H., and Van Loveren, H. 2007. Screening of xenobiotics for direct immunotoxicity in an animal study. *Methods.* 41: 3-8.
10. Descotes, J. 2004. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective. *Toxicol. Lett.* 149: 103-108.
11. Dietert, R. R., and Holsapple, M. P. 2007. Methodologies for developmental immunotoxicity (DIT) testing. *Methods.* 41: 123-131.
12. Gao, S., Wang, Y., Zhang, P., Dong, Y., and Li, B. 2008. Subacute oral exposure to dibromoacetic acid induced immunotoxicity and apoptosis in the spleen and thymus of the mice. *Toxicol. Sci.* 105: 331-341.
13. Germolec, D. R. 2004. Sensitivity and predictivity in immunotoxicity testing: immune endpoints and disease resistance. *Toxicol. Lett.* 149: 109-114.
14. Gingell, R., Boatman, R. J., Corley, R. A., Knaak, J. B., Rosica, K. A., and Wise, R. C. 1995. Toxicology of diethylene glycol butyl ether, pp. 293-302. *In: J. M. Harrington, and K. Gardiner [eds.], Occupational Hygiene, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA. 456 pp.*
15. Hassan, Z. M., Ostad, S. N., Minaee, B., Narenjkar, J., Azizi, E., and Neishabouri, E. Z. 2004. Evaluation of immunotoxicity

- induced by propoxure in C57Bl/6 mice. *Int. Immunopharmacol.* 4: 1223-1230.
16. Herzyk, D. J., and Gore, E. R. 2004. Adequate immunotoxicity testing in drug development. *Toxicol. Lett.* 149: 115-122.
  17. Holsapple, M. P. 2003. Developmental immunotoxicity testing: a review. *Toxicology* 185: 193-203.
  18. Hussain, I., Piepenbrink, M. S., Fitch, K. J., Marsh, J. A., and Dietert, R. R. 2005. Developmental immunotoxicity of cyclosporin-A in rats: age-associated differential effects. *Toxicology* 206: 273-284.
  19. Johnson, K. A., Baker, P. C., Kan, H. L., Maurissen, J. P., Spencer, P. J., and Marty, M. S. 2005. Diethylene glycol monobutyl ether (DGBE): two- and thirteen-week oral toxicity studies in Fischer 344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 43: 467-481.
  20. Kenneth, M., and Casey, W. 2016. *Jane-way's Immunobiology*, 9th ed. Garland Science, New York, NY, USA. 924 pp.
  21. Lee, J. K., Byun, J. A., Park, S. H., Kim, H. S., Park, J. H., Eom, J. H., and Oh, H. Y. 2004. Evaluation of the potential immunotoxicity of 3-monochloro-1,2-propanediol in Balb/c mice. I. Effect on antibody forming cell, mitogen-stimulated lymphocyte proliferation, splenic subset, and natural killer cell activity. *Toxicology* 204: 1-11.
  22. Lee, J. K., Ryu, M. H., and Byun, J. A. 2005. Immunotoxic effect of  $\beta$ -chlorolactic acid on murine splenocyte and peritoneal macrophage function in vitro. *Toxicology* 210: 175-187.
  23. Neishabouri, E. Z., Hassan, Z. M., Azizi, E., and Ostad, S. N. 2004. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. *Toxicology* 196: 173-179.
  24. Osborne, D. W. 2011. Diethylene glycol monoethyl ether: an emerging solvent in topical dermatology products. *J. Cosmet. Dermatol.* 10: 324-329.
  25. Park, J. H., Lee, J. K., Kim, H. S., Chung, S. T., Eom, J. H., Kim, K. A., Chung, S. J., Paik, S. Y., and Oh, H. Y. 2004. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *Int. Immunopharmacol.* 4: 429-436.
  26. Putman, E., van der Laan, J. W., and van Loveren, H. 2003. Assessing immunotoxicity: guidelines. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17: 615-626.
  27. Sitarek, K., Gromadzińska, J., Lutz, P., Stetkiewicz, J., Świercz, R., and Wasowicz, W. 2012. Fertility and developmental toxicity studies of diethylene glycol monobutyl ether (DGBE) in rats. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 25: 404-417.
  28. Smith, H. W., Winstead, C. J., Stank, K. K., Halstead, B. W., and Wierda, D. 2003. A predictive F344 rat immunotoxicology model: cellular parameters combined with humoral response to NP-C $\gamma$ G and KLH.

- Toxicology 194: 129-145.
29. United States Environmental Protection Agency. 1987. Inert ingredients in pesticide products. Inert ingredients in pesticide products; policy statement. OPP-36140; FRL-3190-1.
  30. Van Wijk, F., and Nierkens, S. 2006. Assessment of drug-induced immunotoxicity in animal models. *Drug Discov. Today Technol.* 3: 103-109.
  31. Wells, P. G., and Winn, L. M. 1996. Biochemical toxicology of chemical teratogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 31: 1-40.

# Effects of Inert Diethylene Glycols in Pesticides on Immunocytes and Specific Antibodies in Mice

Wei-Jia Wu<sup>1</sup>, Chun-Lin Liao<sup>1</sup>, Wei-Ren Tsai<sup>1\*</sup>

## Abstract

Wu, W. J., Liao, C. L., and Tsai, W. R. 2017. Effects of inert diethylene glycols in pesticides on immunocytes and specific antibodies in mice. *Taiwan Pestic. Sci.* 2: 55-74.

In this study, both *in vitro* and *in vivo* tests were performed to elucidate the effects of diethylene glycols, which comprise inert ingredients in pesticides, on immunocytes and specific antibodies in mice. For the *in vitro* test, the proliferation of mouse splenocyte cells was quantified to determine the effects of DGME (diethylene glycol monomethyl ether), DGEE (diethylene glycol monoethyl ether) and DGBE (diethylene glycol monobutyl ether), each of which was administered at 5 different concentrations (0, 2.5, 5, 10, and 25 mM). We found that only DGBE significantly influenced the proliferation of spleen lymphocytes at all treatment levels. Consequently, a 28-day oral immunotoxicity test was performed, in which mice were administered 50, 100, or 200 mg/kg DGBE. (For this, cyclophosphamide (CPA) was used as a positive control.) Assay results did not show significant differences in terms of spleen cellularity, lymphocyte proliferation, IgM antibodies, various spleen lymphocytes, hematological data, or histopathological data between the DGBE-treatment group and the blank control group. Conversely, as we expected, CPA was found to significantly reduce thymus weight, spleen cellularity, IgM antibodies, and lymphocyte counts in mice. Taken together, the no observed adverse effect level (NOAEL) of DGBE of this 28-days immunotoxicity test was estimated to be 200 mg/kg/day in mice.

**Key words:** diethylene glycols, inert pesticide ingredients, immunotoxicity, no observed adverse effect level.

---

Accepted: May 5, 2017.

\* Corresponding author, Email: sftsai@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.