ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/273521432

EFFECT OF GANODERMA LUCIDUM (REISHI) ON CELL VIABILITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION

Article · November 2008

CITATIONS
0

READS
245

2 authors:

Kazem Ahmadi
Baqiyatallah University of Medical Sciences
52 PUBLICATIONS **156** CITATIONS
SEE PROFILE

Majid Riazipour
Baqiyatallah University of Medical Sciences
22 PUBLICATIONS **227** CITATIONS
SEE PROFILE

All content following this page was uploaded by Kazem Ahmadi on 15 March 2015.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۲، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۶
صفحات: ۲۸۷- ۲۸۱

اثر *گانودرما لوسیدوم* (Reishi) بر بقاء سلولی و ترشح نیتریک‌اکساید

کاظم احمدی ✍ .Ph.D، مجید ریاضی پور* .Ph.D

چکیـده

مقدمه: قارچ *گانودرمالوسیدوم (گ. لوسیدوم)*در طب گیاهی بعنوان تقویت کننده سیستم ایمنی شهرت دارد. بررسی اثر قارچ گ. لوسیدم بر بقاء سلولی وتولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش هدف این مقاله است.

مواد و روش‌ها: سلول های ماکروفاژی از صفاق موش ها با تزریق PBS سرد بـه داخـل حفـره شـکمی و سپس مکش آن به کمـک پیپـت پلاسـتیکی تهیـه شـد. پـس از سـه بـار شستشـو ماکروفاژهـا شـمارش و سوسپانسیون سلولی به تعداد $1x10^6$ سلول در حجم یک میلی لیتر محیط RPMI به هر چاهک پلیـت هـای ۲۴ خانه اضافه شد. پـس از دوسـاعت انکوباسـیون در ۵٪ Co_2، مـایع رویـی کشـت سـلولی آن خـارج شـد. ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت با غلظتهای مختلف گ. لوسیدم تیمار و پـس از ۲۴ سـاعت انکوباسـیون در شرایط فوق درصد مرگ سلول ها با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو و میزان نیتریک اکساید موجـود در مـایع رویی کشت با روش گریس، اندازه گیری شد.

نتایج: گ. لوسیدوم در غلظت های کمتر از ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر تاثیر قابل توجهی بر قابلیت حیـات ماکروفاژهای صفاقی موش نداشت اما در غلظـت هـای بـالاتر بـه تـدریج اثـرات سایتوتوکسـیک نشـان داد ($p<۰/۰۰۱$ ، $p<۰/۰۲۵$). همچنین گ. لوسیدوم در غلظت های ۵ تا ۳۲۰ میکروگرم در میلـی لیتـر بـه طـور وابسته به دوز ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها را افزایش داده است ($p<۰/۰۰۱$ ، $p<۰/۰۰۵$).

بحث: گ. لوسیدوم در غلظتهای بین ۵-۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر اثـر ایمونومـدولاتوری داشـته اسـت و بدون آنکه حیات سلول را تحت تاثیر قرار دهد باعث افـزایش ترشـح نیتریـک اکسـاید توسـط ماکروفاژهـای صفاقی موش می شود. افزایش مرگ سلولی در غلظت های بالاتر ایـن مـاده ممکـن اسـت ناشـی از اثـرات سایتوتوکسیک قارچ *گانودرما لوسیدم* باشد ولی احتمال اثر سایتو توکسیکی نیتریک اکسـاید بـر خـود سـلول تولید کننده آن نیز وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: مرگ سلولی، ماکروفاژ، گانودرما لوسیدوم و نیتریک اکساید.

دریافت مقاله: ۸۶/۶/۱۷، اصلاح مقاله: ۸۶/۱۲/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۲۵

✍ نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران - ایران
* دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران - ایران
آدرس پست الکترونیکی: k.ahmadi@bmsu.ac.ir

مقدمه

قارچ گ. لوسیدوم(*Ganoderma lucidum*) که از قارچ های کلاهک دار شاخه بازیدیومیکوتا محسوب می شود، در کشورهای آسیای شرقی بنامهای ریشی (Reishi)، مانتتاک (Mannentake) و لینگزی (Lingzhi) معروف است. این قارچ در طب سنتی برخی از کشورها از جمله چین و ژاپن اهمیت زیادی دارد و فواید درمانی متعددی را به آن نسبت می دهند(۵-۱). تقویت سیستم ایمنی از جمله خواصی است که برای این قارچ ذکر شده است و مطالعات متعدد آن را تائید نموده است(۹-۶). در طب سنتی چین از این قارچ در پیشگیری و درمان بیماریهای مختلفی نظیر فشار خون، برونشیت، آرتریت، بیماریهای کبدی، هپاتیت مزمن، افزایش کلسترول خون، و اختلالات ایمونولوژیکی استفاده می شود. با توجه به اینکه ماکروفاژها بعنوان مهمترین سلول در کشتن پاتوژنها شناخته شده اند، تحقیقات نشان داده که اثرات ضد توموری،؛ ضد میکروبی وضد التهابی این قارچ می تواند از طریق اثر بر ماکروفاژها اعمال شده باشد (۱۰). پلی ساکاریدها و بخصوص بتا- دی گلوکانهای (β-D-glucans)حاصل از قارچ گ. لوسیدوم تحریک کننده های بالقوه ماکروفاژهای موش و انسانی می باشند (۱۱). بتا- دی گلوکانها به رسپتورهای CR3 موجود در سطح ماکروفاژها متصل و پس از ورود بداخل سلول باعث برانگیخته شدن یک سری از وقایع داخل سلولی می شوند. عصاره پلی ساکاریدی این قارچ تولید و ترشح سایتوکاین توسط ماکروفاژهای انسانی را افزایش می دهد و نشان داده شده است که این سایتو کاینها باعث توقف تکثیر و تمایز سلولهای لوسمیHL-60 و U-937 و القاء آپوپتوزیس در آن ها می گردند (۱۳-۱۱).

Wany Sy و همکاران نشان داده اند که اثرات ضد توموری گ. لوسیدوم از طریق سایتوکاینهای مترشحه از ماکروفاژها و لنفوسیتهای فعال شده اعمال می شود (۱۰). همچنین Zhang و همکاران نشان داده اند که سایتو کاینهای التهابی نظیر IL-1β و TNF-α ترشح نیتریک اکساید توسط سلولهای هپاتوسیتها را درکشت تحریک می کنند ولی نقش دقیق نیتریک اکساید در فرآیند آسیب ایمنی بطور دقیق مشخص نشده است (۱۴). Zhang و همکاران در مطالعه دیگری نشان داده اند که گ. لوسیدوم از آسیب کبدی پس از دریافت BCG جلوگیری نموده و بیان داشته اند که این اثر گ. لوسیدوم از طریق کاهش نیتریک اکساید اعمال می شود (۱۵).

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر قارچ دارویی گ. لوسیدوم بر مرگ سلول های ماکروفاژ و ترشح نیتریک اکساید توسط آن ها بعنوان یکی ازمکانیزمهای دفاعی انجام شد.

مواد و روش‌ها

سلول های ماکروفاژی با تزریق PBS سرد به داخل حفره شکمی و سپس مکش آن به کمک پیپت پلاستیکی از صفاق موش های سوری استخراج و به داخل لوله آزمایش در شرایط روی یخ منتقل شد. سلول ها سه بار با PBS ۴ درجه سانتیگراد شستشو و در 1500g سانتریفیوژ شدند. سپس سلولها شمارش (حدود ۹۶٪ سلول زنده)و سوسپانسیون سلولی به تعداد ۱×۱۰^{۶} در هر میلی لیتر محیط کشت RPMI۱۶۴۰ به هر چاهک پلیت های ۲۴ خانه اضافه و بمدت ۲ ساعت در شرایط ۵٪ Co2 انکوبه شدند. سپس مایع رویی آن خارج و چاهک ها سه بار با PBS گرم(۳۷ درجه سانتیگراد) شسته شدند تا سلول های غیر ماکروفاژی حذف گردند. به ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت کامل RPMI بدون فنول رد و حاوی مقدار ۱۰٪ – Fetal Calf Serum- FCS و آنتی بیوتیک(۵۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۵۰ واحد پنی سیلین در میلی لیتر) اضافه شد. به یک ردیف از چاهک ها بعنوان گروه کنترل هیچگونه ماده ای اضافه نشد. به سایر چاهک ها غلظتهای مختلفی از گ. لوسیدوم بین ۵ میکروگرم تا ۶۴۰ میکروگرم اضافه شد (n=3). پلیت ها بمدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط ۵٪ Co2 انکوبه شدند. سپس مایع رویی کشت سلولی برای اندازه گیری نیتریک اکساید جمع شد و به لوله های اپندورف ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت.

شمارش سلولهای زنده: برای آزاد سازی ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت به دو طریق اقدام شد. راه اول اینکه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS سرد(۴ درجه سانتیگراد) به سلولهای چسبیده به ته پلیت اضافه و با تکان دادن ملایم آن نمونه ای از سلول ها در حجم ۱۰ میکرولیتر برداشت شد. راه دوم اینکه پلیتها برای

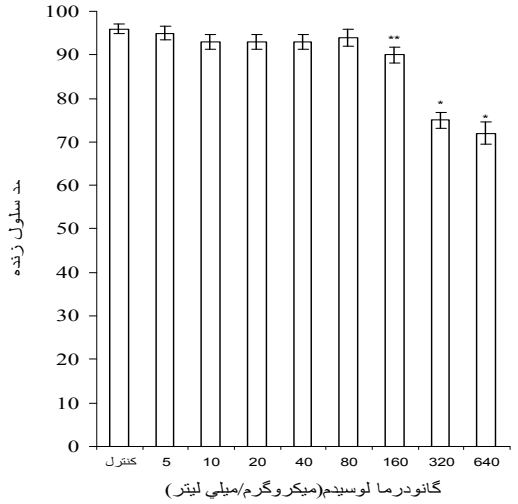
مدت ۵-۳ دقیقه بر روی یخ نگه داری شدند. در هر دوحالت مقدار ۱۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی با مقدار ۱۰ میکرو لیتر ترپن بلو۰/۴ درصد مخلوط و تعداد سلول های زنده و مرده با میکروسکوپ نوری شمارش شد. با تقسیم تعداد سلولهای زنده بر مجموع سلولهای زنده و مرده و ضرب حاصل در عدد ۱۰۰، نسبت سلول های زنده محاسبه شد (n=3).

اندازه گیری نیتریک اکساید (NO): نیتریک اکساید ماده ای است بسیار نا پایدار و بزودی به نیترات و نیتریت تبدیل می شود. لذا مقدار نیتریت بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید و بروش گریس اندازه گیری شد. برای اینکار مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک با هم حجم خود از ماده گریس (1%) Sulphanilamid, 0.1% N-1-Naphtylethylenediamine hydrochloride, و2.5% PO4H3) مخلوط شد. سپس رنگ تولیدی در دستگاه (micro plate multiscan) ودر طول موج ۵۴۰ نانو متر قرائت شد. غلظتهای مختلف نیتریت سدیم تهیه و پس از مخلوط نمودن با هم حجم خود از ماده گریس بعنوان استاندارد استفاده شد (۱۶).

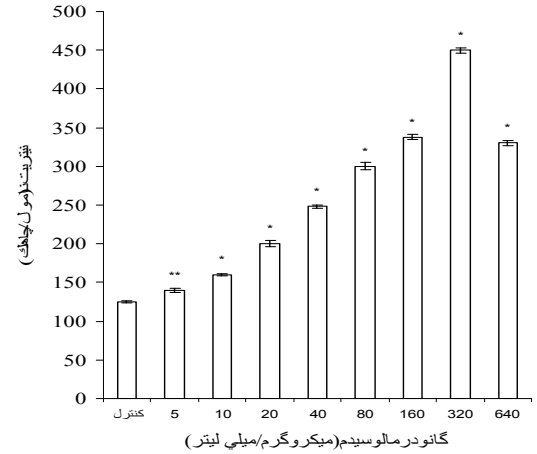
روش آماری: با استفاده از نرم افزار Mynova و روش Anova مدل ۱ داده های بدست آمده آنالیز شدند.

نتایج

رابطه بین غلظت های مختلف گ.لوسیدوم و قابلیت حیات ماکروفاژهای صفاقی موش در شکل شماره ۱ ارائه شده است. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان مرگ سلولی ناشی از گانودرما لوسیدم فقط در غلظت های ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر و بالاتر از آن با گروه کنترل اختلاف معنی دار دارد (p<۰/۰۰۱ ، p<۰/۰۲۵) (شکل ۱). رابطه بین غلظت گ.لوسیدوم و میزان ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در مجموع قارچ گ. لوسیدوم به حالت وابسته به دوز باعث افزایش تولید نیتریک اکساید می شود. حداکثر افزایش تولید نیتریک اکساید در پاسخ به ۳۲۰ میکروگرم در میلی لیتر گانودرمالوسیدم بدست آمد و در غلظت ۶۴۰ میکروگرم(و بالاتر) ترشح نیتریک اکساید رو به کاهش



شکل ۱. اثر غلظتهای مختلف گانودرما لوسیدم بر مرگ سلولی ماکروفاژهای صفاقی موش. (*p<0.001, **p<0.025)



شکل ۲. اثر غلظتهای مختلف گانودرما لوسیدم بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش.
***p<0.001, **p<0.005**

گذاشت که شاید علت آن مرگ سلولی و کاهش تعداد سلولهای زنده باشد (جدول ۱).

بحث

مطالعات In vitro و In vivo در موشها نشان داده است که عصاره آبی قارچ گ.لوسیدوم در حضور داروی مهار کننده سیستم ایمنی (هیدروکورتیزون) باعث تولید و ترشح اینترلوکین-۲ در سلولهای طحالی می شود (۱۷). این قارچ همچنین فعال کننده بالقوه سلولهای T و القاء کننده تعدادی از سایتوکاینها نظیر اینترلوکین-۲ در این سلول ها می باشد (۱۸). ماکروفاژها، بخش

مهمی از مسئولیت کشتن پاتوژن ها را بعهده دارند. فعال کردن ماکروفاژها بوسیله عصاره قارچ گ.لوسیدوم می تواند منجر به ترشح سایتوکاینها، تولید نیتریک اکساید و سایر واسطه های شیمیایی از این سلول ها شود که تمام این مواد با خاصیت ضد توموری، ضد میکروبی و ضد التهابی قارچ گ.لوسیدوم مرتبط می باشد (۱۰).

جدول۱. درصد افزایش مرگ سلولی و نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت های مختلف گانودرما لوسیدم در مقایسه با گروه کنترل.

غلظت گانودرما لوسیدم (میکروگرم)	درصد افزایش مرگ سلولی	درصد افزایش نیتریت
۵	۱	۱۲
۱۰	۳	۲۸
۲۰	۳	۶۰
۴۰	۳	۹۸/۴
۸۰	۲	۱۴۰
۱۶۰	۶	۱۷۰/۴
۳۲۰	۲۱/۸۷	۲۶۰
۶۴۰	۲۵	۱۶۴

در این مطالعه اثر عصاره قارچ گ.لوسیدوم با نام تجارتی Reishi بر مرگ سلولی و ترشح نیتریک اکساید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان دادکه مرگ سلولی حاصل از اثر گ.لوسیدوم وابسته به غلظت بوده است بطوریکه بیشترین مرگ سلولی در پاسخ به غلظتهای بالاتر از ۱۶۰ میکروگرم گ.لوسیدوم بدست آمد. از طرفی ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی در پاسخ به گ.لوسیدوم نیز تا محدوده غلظت ۳۲۰ میکروگرم وابسته به غلظت بوده است و حداکثر افزایش در پاسخ به ۳۲۰ میکروگرم بدست آمد. بطوریکه گ.لوسیدوم در غلظتهای ۵ و ۱۰ میکروگرم در مقایسه با گروه کنترل حداقل افزایش را در ترشح نیتریک اکساید ایجاد کرده است. مقایسه نتایج نشان میدهد که در غلظت بالا تا ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر که نیتریک اکساید بیشتری تولید شده است، مرگ سلولی نیز ۶ درصد بیشتر از مرگ سلولی در گروه کنترل بوده است. بنابر این می توان گفت که شاید بخشی از مرگ سلولی در غلظتهای بالا ناشی از وجود نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژها و اثر کشندگی آن بر خود سلول تولید کننده آن باشد (۱۹).

مطالعات قبلی نشان داده است که ایمنی علیه عفونت باسیل کالمت گرین(BCG) منجر به آسیب کبدی شده است(۱۷،۲۰)، و سایتوکاینهای γ-IFN, TNF-α, IL-1β در این آسیب کبدی دخیل می باشند (۱۷،۲۱،۲۲،۲۳).Zhang (۲۴)و همکاران طی مطالعه ای بر روی سلول های هپاتوسیت در محیط کشت ثابت کرده اند که سایتوکاین ها احتمالا از طریق تحریک تولید نیتریک اکساید توسط سلولهای هپاتوسیتی منجر به آسیب کبدی می‌شوند. در امتداد نتایج فوق، Zhang(۲۵)، و همکارانش نشان داده اند که عصاره آبی گ.لوسیدوم باعث حفاظت هپاتوسیت ها در برابر عفونت در موش می شود و ثابت کرده اند که این اثر حفاظتی از طریق مهار نیتریک اکساید (NO) می باشد.

در مطالعه حاضر ما افزایش نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی را شاهد بوده ایم که با نتایج بدست آمده در مطالعه Zhang (۲۵) متفاوت می باشد.یکی از دلایل این تفاوت می تواند اختلاف در نوع سلولهای استفاده شده باشد، به دلیل اینکه در مطالعهZhang (۲۵)، از هپاتوسیتهای تیمار شده با گ. لوسیدوم استفاده شده است که با ماکروفاژ های صفاقی در این مطالعه متفاوت است. در مطالعه آنها گروهی از هپاتوسیت ها که با BCG تیمار شده بودند گ.لوسیدوم باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید در مقایسه با گروهی که فقط با BCG تیمارشده بودند، شده است. Song (۲۶) و همکاران نیز کاهش نیتریک اکسایدمترشحه توسط سلولهای ماکروفاژی RAW-264.7 (سل لاین–ماکروفاژی) تیمار شده باLPS, γ-IFN در حضور گ.لوسیدوم را گزارش نموده اند.در تحقیق Song، میزان نیتریک اکساید مترشحه تحت تاثیر گ.لوسیدوم در مقایسه با گروه کنترل که هیچگونه محرکی دریافت نکرده بودند، افزایش قابل توجه ای داشته است. که در این حالت نتایج بدست آمده توسط Song و همکارانش(۲۶)با نتایج بدست آمده در این مطالعه همخوانی دارد.

ولی وقتیکه آنها سلولهارا بطور توام با LPS+γIFN تحریک کـرده اند، گ.لوسیدوم توانسته است با اثر تحریکـی آن دو بطـور کامـل مقابله نموده و باعث کاهش ترشح نیتریـک اکسـاید شـود. لـذا در تحقیق Song بهتر بود که در یـک گـروه، سـلولها بـدون حضـور LPS+γ-IFN و فقط با گ.لوسیدوم تیمار می شـدند کـه در ایـن صورت اثر مستقیم آن بهتر نمایان می شد.در هر صورت بـا توجـه به موضوع فوق بعلاوه استفاده از سلولهای لاین کـه بـا سـلولهای طبیعی تفاوت دارند، اختلاف نتایج ما در این تحقیق یـک موضـوع کاملا طبیعی و قابل قبولی می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه گ.لوسیدوم در غلظتهای بین ۱۶۰-۵ میکروگـرم در میلـی لیتـر باعـث افـزایش ترشـح نیتریـک اکسـاید توسـط ماکروفاژهای صفاقی موش شده است و از طرفـی نظـر بـه اینکـه مرگ سلولی در غلظت های مختلف گ.لوسیدوم را نمی توان بطور قطع ناشی از اثـر مسـتقیم گانودرمـا لوسـیدم دانسـت و شـاید بـه احتمال ضعیف ناشی از اثر توکسیک نیتریک اکساید بر خود سلول تولید کننده باشد، بنابر این می توان ادعا نمودکه گ.لوسیدوم مـی تواند اثر ایمونومدولاتوری داشـته باشـد. در ایـن رابطـه تحقیقـات کاملتر توسط نویسندگان این مقاله ادامه دارد(۲۸،۲۷).

تشکر و قدردانی

با تشکر ازمرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و اداره تحقیقات و فـن آوری دانشگاه علوم پزشکی بقیـه الله (عـج) بـه جهـت تصـویب و تامین اعتبار لازم در این پروژه.

References

1- Cao LZ, Lin ZB.,Regulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. Acta Pharmacol Sin. 2003;24(4):321-6.

2- Gao Y, Zhou S, Jiang W, Huang M, Dai X. Effects of ganopoly (a Ganoderma lucidum polysaccharide extract) on the immune functions in advanced-stage cancer patients. Immunol Invest. 2003;32(3):201-15.

3- Luo J, Lin ZB. [Advances of pharmacological effects of triterpenes from Ganoderma lucidum] Yao Xue Xue Bao. 2002;37(7):574-8.

4- Sliva D. Ganoderma lucidum (Reishi) in cancer treatment. Integr Cancer Ther. 2003;2(4):358-64.

5- Tan BK, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review. Curr Med Chem. 2004;11(11):1423-30.

6- Hsu MJ, Lee SS, Lee ST, Lin WW. Signaling mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from Ganoderma lucidum. Br J Pharmacol. 2003;139(2):289-98.

7- Kohguchi M, Kunikata T, Watanabe H, Kudo N, Shibuya T, Ishihara T, Iwaki K, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M.Immuno-potentiating effects of the antler-shaped fruiting body of Ganoderma lucidum (Rokkaku-Reishi). Biosci Biotechnol Biochem. 2004;68(4):881-7.

8- Lin ZB, Zhang HN. Anti-tumor and immunoregulatory activities of Ganoderma lucidum and its possible mechanisms. Acta Pharmacol Sin. 2004;25(11):1387-95

9- Zhang J, Tang Q, Zimmerman-Kordmann M, Reutter W, Fan H. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from Ganoderma lucidum. Life Sci. 2002;71(6):623-38.

10- Wang SY, Hsu ML The anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T-lymphocytes. Int. J. Cancer, 1997,70: 699- 705.

11- Won SJ, Enhancement of splenic NK cytotoxic

activity by the extracts of Ganoderma Lucidum mycelium in mice. J. Biomed. Lab. Sci. 1989, 2: 201-13.

12- Ma L, Lin ZB, Effects of Ganoderma polysaccharides on Il-2 production by mouse splenocytes in vitro. J. Beij. Med. Univ. 1991, 23: 412-17.

13- Lei LS, Lin ZB, Effect of Ganoderma polysaccharaides on T cell subpopulations and production of interleukin -2 in mixed lymphocyte response. Acta Pharmaceutica Sinica, 1992, 27: 331-35.

14- Zhang GL, Lin ZB, Effect of cytokines on the endotoxin stimulated nitric oxide production in the primary cultured rat hepatocytes. Beijing Yike Daxue Xuebao, 1998, 30, 180-82.

15- Zhang GL, Wang YH, NI W, Teng H.L., and Lin Z.B., Hepatoprotective role of ganoderma lucidum polysaccharide against BCG-induced immune Liver injury in mice. World Journal of Gastroentrology, 2002, 8(4), 728-33.

16- Green Lc, Wgner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JJ and Tannenbaum SS(1982).

Analysis of nitrate, nitrite and [15_N] Nitrate in Biological Fluids. Analytical Biochemistry; 126; 131-138.

17- Wang GS, Liu GT, Role of nitric oxide in immunological liver damage in mice. Biochem Pharmacol, 1995, 49; 1277-81.

18- Lei LZ, Regulatory effect of Ganoderma polysaccharides on T-cell subpopulation of interlukin-2 in mixed lymphocyte response. Yao Hsueh Pao- Acta Pharm. Sin. (Chinese), 1992, 27: 331-35.

19- Ahmadi K, and Arabsalmani F, Effect of Vitamin E on cell viability and nitric oxide release, Kosar, Journal of Medical Science. 2006, 11(2), 155-61.

20- Carpenter E, Fray L, Cormley E, Antigen – Specific lymphocytes enhance Nitric Oxide production in mycobacterium bovis BCG-infected bovine macrophages. Immunol. Cell Biol., 1998, 76;363-68.

21- Bai XY, Jia XH, Cheng LZ, Gu YD, influence of IFN-2B and BCG on the release of TNF and Il-1 by Kupffer Cells in rats with hepatoma. World J. Gastroentrol, 2001, 7; 419-21.

22- Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Chen WX, and Gros GL, IL-4, Il-5 and Il-10 are not required for the control of M. Bovis-BCG infection in mice. Immunol Cell Biol, 1998, 76, 41-46.

23- Ugaz EMA, Pinheiro SR, Guerra JL, and Palermo-Neto J, Effects of prenatal diazepam treatment on mycobacterium-induced infection in nHamsters. Immunopharmacology, 1999, 41;209-17.

24-Zhang GL, Lin ZB, Effects of cytokines on the endotoxin stimulated nitric oxide production in the primary cultured rat hepatocytes. Beijing Yike Daxue Xuebao, 1998, 30; 180-182.

25- Zhang G-L, Wang Y-H, Ni W, Teng H-L, and Lin L-B, Hepatoprotective role of ganoderma lucidum polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. World Gastroentrol, 2002, 8(4); 728-33.

26-Song YS, Kim S-H, Sa J-H, Jin C, Lim C-J, and Park E-H, Anti- angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom Ganoderma Lucidum. Journal of Ethno-Pharmacology, 2004, 90; 17-20.

27- Ahmadi K, and Riazi Pour M. Effect of G. Lucidum on cytokine release by peritoneal

macrophages, 2007, 4(4). 220-26.

28- Ahmadi K, and Riazi Pour M. T-2 toxin regulated G.lucidum induced cytokine release, 2008, 4(1). 8-13

View publication stats