

## اثر گانودرما لوسیدوم (Reishi) بر بقاء سلولی و ترشح نیتریک اکساید

کاظم احمدی<sup>ک</sup> Ph.D.، مجید ریاضی پور<sup>\*</sup> Ph.D.

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های ماکروفاژی از صفاق موش‌ها با تزریق PBS سرد به داخل حفره شکمی و سپس مکش آن به کمک پیپت پلاستیکی تهیه شد. پس از سه بار شستشو ماکروفاژها شمارش و سوسپانسیون سلولی به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در حجم یک میلی لیتر محیط RPMI به هر چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه اضافه شد. پس از دوساعت انکوباسیون در ۵٪  $CO_2$ ، مایع رویی کشت سلولی آن خارج شد. ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت با غلظت‌های مختلف گ. لوسیدوم تیمار و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط فوق درصد مرگ سلول‌ها با روش رنگ آمیزی با تریپان بلو و میزان نیتریک اکساید موجود در مایع رویی کشت با روش گریس، اندازه گیری شد.

**نتایج:** گ. لوسیدوم در غلظت‌های کمتر از ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر تاثیر قابل توجهی بر قابلیت حیات ماکروفاژهای صفاقی موش نداشت اما در غلظت‌های بالاتر به تدریج اثرات سایتوتوکسیک نشان داد ( $p < 0.025$ ،  $p < 0.001$ ). همچنین گ. لوسیدوم در غلظت‌های ۵ تا ۳۲۰ میکروگرم در میلی لیتر به طور وابسته به دوز ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژها را افزایش داده است ( $p < 0.005$ ،  $p < 0.001$ ).

**بحث:** گ. لوسیدوم در غلظت‌های بین ۵-۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر اثر ایمونومدولاتوری داشته است و بدون آنکه حیات سلول را تحت تاثیر قرار دهد باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش می شود. افزایش مرگ سلولی در غلظت‌های بالاتر این ماده ممکن است ناشی از اثرات سایتوتوکسیک قارچ گانودرما لوسیدوم باشد ولی احتمال اثر سایتوتوکسیکی نیتریک اکساید بر خود سلول تولید کننده آن نیز وجود دارد.

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

## مقدمه

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 از مکانیزمهای دفاعی انجام شد.

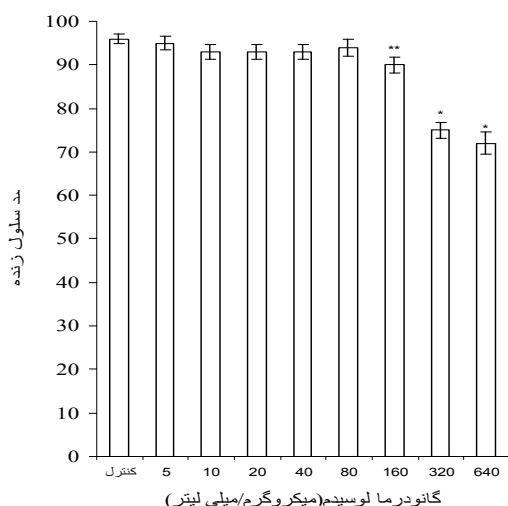
## مواد و روش ها

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  $1 \times 10^6$  در هر میلی لیتر محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ به هر چاهک پلیت های ۲۴ خانه اضافه و بمدت ۲ ساعت در شرایط ۵٪ CO<sub>2</sub> 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٪ CO<sub>2</sub> 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.

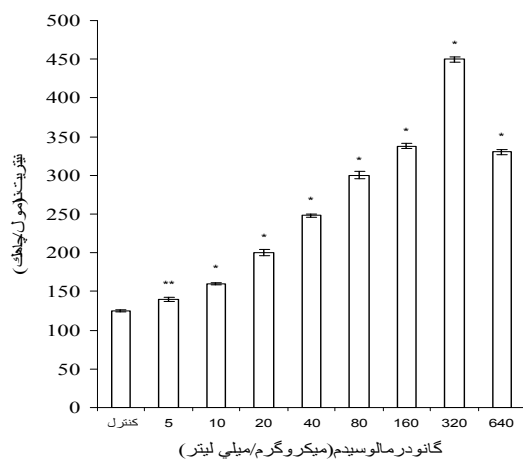
**شمارش سلولهای زنده:** برای آزاد سازی ماکروفاژهای چسبیده به ته پلیت به دو طریق اقدام شد. راه اول اینکه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS سرد (۴ درجه سانتیگراد) به سلولهای چسبیده به ته پلیت اضافه و با تکان دادن ملایم آن نمونه ای از سلول ها در حجم ۱۰ میکرولیتر برداشت شد. راه دوم اینکه پلیتها برای

قارچ گ. لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) که از قارچ های کلاهک دار شاخه بازیدیومیکوتا محسوب می شود، در کشورهای آسیای شرقی بنامهای ریشی (Reishi)، منتاک (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 تأیید نموده است (۹-۶). در طب سنتی چین از این قارچ در پیشگیری و درمان بیماریهای مختلفی نظیر فشار خون، برونشیت، آرتريت، بیماریهای کبدی، هپاتیت مزمن، افزایش کلسترول خون، و اختلالات ایمنولوژیکی 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 و ضد التهابی این قارچ می تواند از طریق اثر بر ماکروفاژها اعمال شده باشد (۱۰). پلی ساکاریدها و بخصوص بتا-دی گلوکانهای ( $\beta$ -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 لوسمی HL-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 لنفوسیت های فعال شده اعمال می شود (۱۰). همچنین Zhang و همکاران نشان داده اند که سایتو کاینهای التهابی نظیر IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  ترشح نیتریک اکساید توسط سلولهای هپاتوسیتها را در کشت 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



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



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف گانودرما لوسیدم بر ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفازهای 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 vivo و In vitro 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). ماکروفازها، بخش

مدت ۳-۵ دقیقه بر روی یخ نگه داری شدند. در هر دو حالت مقدار ۱۰ میکرو لیتر سوسپانسیون سلولی با مقدار ۱۰ میکرو لیتر ترین بلو ۰/۴ 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 نیتريت تبدیل می شود. لذا مقدار نیتريت بعنوان اندیکاتوری از نیتریک اکساید و بروش گریس اندازه گیری شد. برای اینکار مقدار ۵۰ میکرو لیتر از مایع رویی هر چاهک با هم حجم خود از ماده گریس ( 1% Sulphanilamid, 0.1% N-1-Naphtylethylenediamine hydrochloride, 2.5% PO4H3) مخلوط شد. سپس رنگ تولیدی در دستگاه (micro plate multiscan) و در طول موج ۵۴۰ نانومتر 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 به دست آمده آنالیز شدند.

## نتایج

رابطه بین غلظت های مختلف گ. لوسیدوم و قابلیت حیات ماکروفازهای 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 ( $p < 0.025$ ،  $p < 0.001$ ) (شکل ۱). رابطه بین غلظت گ. لوسیدوم و میزان ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفازها 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 گانودرما لوسیدم بدست آمد و در غلظت ۶۴۰ میکروگرم (و بالاتر) ترشح نیتریک اکساید رو به کاهش

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  $\gamma$ -IFN, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  در این آسیب کبدی دخیل می باشند (Zhang, ۲۰۱۷, ۲۲, ۲۳) و همکاران طی مطالعه ای بر روی سلول های هیپاتوسیت در محیط کشت ثابت کرده اند که سایتوکاین ها احتمالا از طریق تحریک تولید نیتریک اکساید توسط سلولهای هیپاتوسیتی منجر به آسیب کبدی می شوند. در امتداد نتایج فوق، Zhang (۲۵)، و همکارانش نشان داده اند که عصاره آبی گ. لوسیدوم باعث حفاظت هیپاتوسیت 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 مطالعه Zhang (۲۵)، از هیپاتوسیت های تیمار شده با گ. لوسیدوم استفاده شده است که با ماکروفاژ های صفاقی در این مطالعه متفاوت است. در مطالعه آنها گروهی از هیپاتوسیت ها که با BCG تیمار شده بودند گ. لوسیدوم باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید در مقایسه با گروهی که فقط با BCG تیمار شده بودند، شده است. Song (۲۶) و همکاران نیز کاهش نیتریک اکساید مترشحه توسط سلولهای ماکروفاژی RAW-264.7 (سل لاین-ماکروفاژی) تیمار شده با  $\gamma$ -IFN, LPS 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.

مهمی از مسئولیت کشتن پاتوژن ها را بعهدہ 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).

**جدول ۱. درصد افزایش مرگ سلولی و نیتریک اکساید مترشحه توسط ماکروفاژهای صفاقی موش در پاسخ به غلظت های مختلف گانودرما لوسیدوم در مقایسه با گروه کنترل.**

غلظت گانودرما لوسیدوم (میکروگرم)	درصد افزایش مرگ سلولی	درصد افزایش نیتریک اکساید
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 تجاری Reishi بر مرگ سلولی و ترشح نیتریک اکساید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که 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 ۱۰ و ۵ 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

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

ولی وقتیکه آنها سلولها را بطور توام با  $LPS+\gamma IFN$  تحریک کرده اند، گ.لوسیدوم توانسته است با اثر تحریکی آن دو بطور کامل مقابله نموده و باعث کاهش ترشح نیتریک اکساید شود. لذا در تحقیق Song بهتر بود که در یک گروه، سلولها بدون حضور  $LPS+\gamma-IFN$  و فقط با گ.لوسیدوم تیمار می شدند که در این صورت اثر مستقیم آن بهتر نمایان می شد. در هر صورت با توجه به موضوع فوق بعلاوه استفاده از سلولهای لاین که با سلولهای طبیعی تفاوت دارند، اختلاف نتایج ما در این تحقیق یک موضوع کاملا طبیعی و قابل قبولی می باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به اینکه گ.لوسیدوم در غلظتهای بین ۱۶۰-۵ میکروگرم در میلی لیتر باعث افزایش ترشح نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای صفاقی موش شده است و از طرفی نظر به اینکه مرگ سلولی در غلظت های مختلف گ.لوسیدوم را نمی توان بطور قطع ناشی از اثر مستقیم گانودرما لوسیدم دانست و شاید به احتمال ضعیف ناشی از اثر توکسیک نیتریک اکساید بر خود سلول تولید کننده باشد، بنابر این می توان ادعا نمود که گ.لوسیدوم می تواند اثر ایمنومودولاتوری داشته باشد. در این رابطه تحقیقات کاملتر توسط نویسندگان این مقاله ادامه دارد (۲۸،۲۷).

### تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی و اداره تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به جهت تصویب 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

- 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 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 Gastroentrol, 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 [<sup>15</sup>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

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

Archive of SID