

文章编号: 1673-1689(2011)02-0172-06

泰和乌骨鸡活性肽对小鼠骨髓有核细胞的增殖作用

刘建华, 王勇, 黄丹菲, 田颖刚, 聂少平, 谢明勇*

(食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 采用MTT法测定活性肽对正常小鼠骨髓有核细胞的增殖作用, 利用高效液相色谱-2,4-二硝基氟苯柱前衍生法测定4个活性肽组分的氨基酸组成。结果表明: 小鼠骨髓细胞培养时间为24 h, 泰和乌骨鸡活性肽质量浓度为0.1、1、10、100 $\mu\text{g/mL}$, 组分7、8、9、10可极显著($P < 0.01$)促进小鼠骨髓有核细胞增殖, 增殖率达130%以上。在低质量浓度(0.1 $\mu\text{g/mL}$)条件下, 组分7能显著促进小鼠骨髓有核细胞增殖($P < 0.01$)且重现性较好, 组分8可刺激小鼠骨髓有核细胞增殖298%。氨基酸组成分析表明, 组分7、8、9、10均含有丰富的酪氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和丙氨酸, 可以推测该5种氨基酸组成了刺激小鼠骨髓有核细胞增殖活性成分的物质基础。

关键词: 泰和乌骨鸡活性肽; 小鼠骨髓有核细胞; MTT法; 氨基酸组成

中图分类号: R 282.74

文献标识码: A

Effect of Taihe Black-Bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) Active Peptides on Proliferation of Bone Marrow Nucleated Cells from Mice

LIU Jianhua, WANG Yong, HUANG Danfei, TIAN Yinggang,
NIE Shaoping, XIE Mingyong*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The present study aimed at exploring the effect of Taihe Black-bone silky fowl active peptides and their 13 separated fractions on the proliferation of bone marrow nucleated cells from normal mice. MTT method was used to investigate the effect of active peptides on the proliferation of bone marrow nucleated cells from normal mice. HPLC precolumn derivation with 2,4-dinitrofluorobenzene method was used to determine the amino acid compositions of four active peptide fractions. When mice bone marrow nucleated cells were cultivated for 24 h, it was found that the fractions 7, 8, 9 and 10 separated from Taihe Black-bone silky fowl active peptides exhibited significantly strong activity ($P < 0.01$) in stimulating mice bone marrow nucleated cells, and the proliferation rate could be up to 130%. Especially, at lower concentration (0.1 $\mu\text{g/mL}$), fraction 7 was able to significantly stimulate mice bone marrow nucleated cells ($P < 0.01$) and revealed better reproducibility. Fraction 7 was capable of stimulating mice bone marrow

收稿日期: 2010-07-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20862012)。

作者简介: 刘建华(1982-), 男, 安徽宁国人, 食品科学博士研究生。Email: liujin82@yahoo.com.cn

* 通信作者: 谢明勇(1957-), 男, 江西宜春人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事天然产物的开发方面的研究。Email: myxie@ncu.edu.cn

nucleated cells proliferation by 298%. Amino acid composition analysis demonstrated that the main amino acids of fraction 7, 8, 9 and 10 consisted of tyrosine, glycine, glutamic acid, aspartate and alanine. It could be presumed that tyrosine, glycine, glutamic acid, aspartate and alanine may be the material base of active component in stimulating mice bone marrow nucleated cells.

Key words: Taihe black-bone silky fowl active peptides, mice bone marrow nucleated cells, MTT method, amino acid composition

各种原因如缺铁、出血等引起的贫血症常见于儿童、青少年、孕妇以及老年人当中,而在诸多原因当中,由放疗和化疗引起恶性肿瘤病人的急性贫血尤为严重。这种贫血很容易导致病人出现昏睡、疲劳、虚弱以及呼吸困难等症状^[1-3]。虽然临床上促红细胞生长素(EPO)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)能在一定程度上治疗放疗和化疗引起的贫血,但是尚未发现它们能够使贫血症状完全恢复^[4-5]。现代中药的发展为该问题的解决拓宽了思路。研究者发现,鸡血藤^[6]、白花蛇舌草^[7]、黄芪^[8]、白术^[9]能明显促进正常或贫血小鼠骨髓有核细胞的增殖。骨髓是造血的主要场所,骨髓造血既需要一定数量和功能正常的造血干细胞(HSC),又需要有利于其生长发育的造血微环境(HM),构成微环境主要成分的成纤维细胞、巨噬细胞、网状细胞、淋巴细胞等,不仅作为造血细胞生长的支架,而且可通过细胞间的直接作用和分泌多种造血生长因子(HGF)来调节造血^[10]。

作为江西省重要的特色药食资源,泰和乌骨鸡既是一种营养丰富的滋补食品,又是特有药用鸡种,被历代医家延用,历史悠久,名扬中外。我国传统大量医药文献记载,乌骨鸡具有补肝肾、益血气、退虚热、调经止带、保肝等功能,可医治心腹痛、虚损、崩中带下、遗精、消渴、久痢、骨折、腰酸腿痛、风湿性关节炎、各种出血症、紫癜、肝炎等疾病。本课题组已对泰和乌骨鸡进行了较深入的研究,发现其具有低脂肪、高磷脂含量及多不饱和脂肪酸、必需脂肪酸和花生四烯酸在脂肪酸组成中比例较高等特点^[11-12],鉴定出泰和乌骨鸡有高含量的肌肽^[13],证明了泰和乌骨鸡总脂质具有明确的补血作用^[14]、黑色素为真黑色素且具有抗氧化作用^[15-17]、活性肽具有体外非酶糖基化抑制作用^[18]以及良好的体外抗氧化作用。本课题组还发现,泰和乌骨鸡活性肽可在一定程度上恢复血虚小鼠红细胞(RBC)以及血红蛋白(HGB)水平,说明泰和乌骨鸡活性肽亦具有一定的补血作用。作者从体外细胞水平研究泰和

乌骨鸡活性肽及其13种分离组分对小鼠骨髓细胞增殖活性的影响,并对具有骨髓细胞增殖活性的活性肽进行氨基酸组成分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泰和乌骨鸡活性肽及其反相柱分离13组分:泰和乌骨鸡活性肽由均匀设计优化的木瓜蛋白酶酶解法制备;活性肽分离13组分由0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH 6.8)通过制备型RP-HPLC分离活性肽制得。RPMI 1640:美国Gibco公司;胎牛血清:美国Hyclone公司;MTT:美国Sigma公司;18种氨基酸标准品分别为天门冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、蛋氨酸(Met)、半胱氨酸(Cys)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、苯丙氨酸(Phe)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、酪氨酸(Tyr)均为光谱纯;乙腈和2,4-二硝基氟苯为色谱纯;二甲亚砜、N,N-二甲基甲酰胺等其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

3100 series II CO₂培养箱:美国Thermo electron公司;超净工作台:新加坡Streamline Laboratory;高速冷冻离心机:德国Sigma公司;CKX41倒置显微镜:日本Olympus公司;酶标仪:美国Thermo electron公司;Waters515二元高效液相色谱仪:美国Waters公司。Milli-Q超纯水处理系统:美国Millipore公司。电子天平FA1104:上海天平仪器厂;恒温水浴锅HH24:国华电器有限公司。

1.3 实验动物

昆明小鼠,4~6周龄,体重18~20 g,雄性,由南昌大学医学院实验动物中心提供,合格证号:医动字第021-9602号。

1.4 实验方法

1.4.1 泰和乌骨鸡活性肽对小鼠骨髓有核细胞增

殖作用 取4~6周龄昆明小鼠,无菌取股骨核胫骨,收集骨髓细胞,调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$,取120 μL 接种于96孔培养板,每组设6个复孔,经37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱孵育24 h或48 h后,每孔加入MTT液(5 mg/mL)10 μL ,继续避光培养4 h,弃上清液,加入二甲基亚砜,振荡10 min,用酶联免疫检测仪于570 nm下测定各孔吸光度,计算细胞增殖率^[19]。

1.4.2 泰和乌骨鸡活性肽氨基酸组成测定

1) 色谱条件。色谱柱:Kromasil C18柱(4.6 $\times$ 250 mm,5 μm);流动相A:50 mmol/L 乙酸钠缓冲溶液,含体积分数1% N,N-二甲基甲酰胺,pH 6.8;流动相B:乙腈:水=1:1(V/V);流动相B的梯度洗脱程序:0~0.3 min,16%;0.3~4 min,16%~31%;4~9.5 min,31%~36%;9.5~17 min,36%~55%;17~28 min,55%~65%;28~34 min,65%~100%;34~36 min,100%~16%。流动相流速:1.0 mL/min;柱温:27 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:360 nm;进样量:20 μL 。

2) 样品的衍生与测定。分别取组分7、8、9、10样品溶液(质量浓度均为10 mg/mL)0.5 mL分别置于安瓿瓶内,加入6 mol/L 盐酸溶液2.5 mL,真空状态下,酒精喷灯封口,于110 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中水解24 h,取出放冷。将水解后样品从安瓿管转入蒸发皿中,并用水多次洗涤安瓿管,洗液一并转入蒸发皿中,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干。用pH 9.0 硼酸缓冲溶液多次洗涤蒸发皿,洗液转入50 mL容量瓶中,并用pH 9.0 硼酸缓冲溶液定容。氨基酸衍生:移取5.0 mL样品溶液(上述组分7、8、9、10溶液或18种氨基酸标准液,质量浓度均为0.05 mg/mL),加入50 mL棕色容量瓶中,再加入pH 9.0 硼酸缓冲溶液5.0 mL,混匀,加入5.0 mL 2,4-二硝基氟苯衍生化溶液。放入60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中,暗处反应60 min。取出,冷却至室温,用pH 7.0 磷酸缓冲溶液稀释至刻度,静置15 min,过0.22 μm 微孔滤膜,取20 μL 进样分析。

1.5 数据处理

增殖率以($\bar{x} \pm s$)表示, $n=6$ 。应用Origin 7.0软件进行统计处理,采用One Way ANOVA方法分析样品组和对照组之间的差异显著性。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 泰和乌骨鸡活性总肽对小鼠骨髓有核细胞增殖作用的影响

如图1所示,质量浓度在3.1~500 $\mu\text{g/mL}$ 范

围内,培养时间为24 h或48 h,泰和乌骨鸡活性总肽均能促进小鼠骨髓有核细胞的增殖。全骨髓细胞培养24 h条件下,质量浓度为0~25 $\mu\text{g/mL}$ 时,泰和乌骨鸡活性总肽表现出较弱的促小鼠骨髓有核细胞增殖作用。质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 时,增殖率较高,为134.5%。质量浓度为100~500 $\mu\text{g/mL}$ 时,增殖率从104.3%增加到152.4%,与泰和乌骨鸡活性总肽质量浓度呈明显的量效关系。培养时间为24 h时,泰和乌骨鸡活性总肽质量浓度越高,其促小鼠骨髓有核细胞增殖作用越强。全骨髓细胞培养48 h条件下,质量浓度为6.2 $\mu\text{g/mL}$ 时,泰和乌骨鸡活性总肽表现出最高的促小鼠骨髓有核细胞增殖作用,增殖率为163.5%。随后,随着质量浓度的增加,增殖率逐渐降低,质量浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时达到最小值,为110.6%。说明培养时间为48 h时,低质量浓度的泰和乌骨鸡活性总肽促小鼠骨髓有核细胞增殖作用较强。

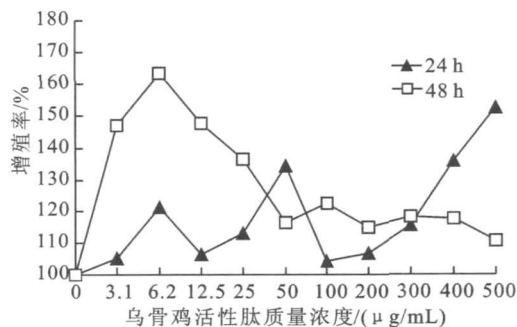


图1 泰和乌骨鸡活性肽对小鼠骨髓细胞增殖作用的影响

Fig. 1 Effect of Taihe Black bone Silky Fowl active peptide on the proliferation of bone marrow cells from mice

2.2 泰和乌骨鸡活性肽13个分离组分对小鼠骨髓有核细胞增殖作用的影响

为进一步筛选泰和乌骨鸡活性肽促小鼠骨髓有核细胞增殖的活性成分,泰和乌骨鸡活性总肽经反相C18柱分离得到13个组分。在活性肽质量浓度分别为1、20、400 $\mu\text{g/mL}$ 条件下,将该13组分与小鼠骨髓细胞共同培养24 h,并重复5次独立实验,所得该13组分促小鼠骨髓有核细胞增殖率见表1。在质量浓度为1 $\mu\text{g/mL}$ 时,活性肽组分1、4、7、8、9、10、12、13均表现出极显著($P < 0.01$)的促小鼠骨髓有核细胞增殖作用,其中,组分7、13表现出了300%以上促小鼠骨髓有核细胞的增殖率;在质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 时,活性肽组分1、2、4、5、6、7、8、9、11、12、13均表现出极显著($P < 0.01$)的促小鼠骨髓有核细胞增殖作用。其中,组分4、5、7、8、

13 重复性较好, 组分 7 甚至表现出 400% 以上的促小鼠骨髓有核细胞增殖率; 当质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 1、2、4、7、8、9、10、11、12、13 均表现出极显著($P < 0.01$)的促小鼠骨髓有核细胞增殖作用。且组分 1、4、7、8、13 重复性较好, 组分 7 和 13 表现出 300% 以上的促小鼠骨髓有核细胞增殖率。另外, 从表 1 还可以看出, 在高质量浓度条件下, 活性肽组分促小鼠骨髓有核细胞增殖作用重复性较好, 说明质量浓度越高, 促小鼠骨髓有核细胞增殖作用越明显, 这与 2.1 结果相吻合。

综合 3 种质量浓度下该 13 组分的促小鼠骨髓有核细胞增殖活性以及重复性, 从该 13 组分中选

取活性最好的 8 个组分(1、4、7、8、9、10、11、13), 重新设定 4 个质量浓度(0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 24 h, 并重复 4 次独立实验, 所得该 8 组分促小鼠骨髓有核细胞增殖率见表 2。从表 2 可以看出, 在 4 个质量浓度下, 组分 7、8、9、10 表现出极显著($P < 0.01$)刺激小鼠骨髓有核细胞增殖作用, 且重复性较好。尤其在低质量浓度下(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 组分 7 表现出 100% 重复性, 增殖率保持在 132% ~ 170%。在 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下, 组分 8 甚至表现出 298% 的高增殖率。由以上结果可知, 作者从泰和乌骨鸡活性总肽中成功筛选出 4 个具有有效刺激小鼠骨髓有核细胞增殖的活性肽组分。

表 1 泰和乌骨鸡活性肽 13 个分离组分对小鼠全骨髓细胞增殖作用的影响

Tab. 1 Effect of 13 separated fractions separated from Taihe black bone silky fowl active peptide on the proliferation of bone marrow cells from mice

质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	重复 次数	增殖率/%												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1	156	84	102	95	107	98	119	187	205	142	127	138	93
	2	165	118	66	164	236	86	365	180	152	132	152	85	346
	3	83	87	120	99	95	119	105	96	091	95	90	93	109
	4	117	118	102	159	138	/	177	98	099	96	115	161	140
	5	102	119	116	125	128	124	129	144	148	130	118	114	139
20	1	163	78	52	93	112	124	145	174	244	143	142	122	90
	2	124	110	81	225	409	105	424	159	152	102	167	122	308
	3	100	95	142	100	97	120	98	92	103	88	93	107	96
	4	121	138	127	188	134	/	224	132	120	115	118	166	160
	5	109	113	114	126	126	141	118	124	146	114	116	109	144
400	1	143	83	81	85	128	116	140	218	312	154	121	114	101
	2	283	62	68	285	232	96	361	153	128	97	126	148	403
	3	97	73	85	138	102	108	106	106	93	92	93	103	93
	4	140	142	118	207	109	/	256	154	126	135	133	167	182
	5	94	110	116	123	129	127	129	145	140	110	117	112	147

注: 增殖率= (加药组在 570 nm 下 OD 值/ 阴性组在 570 nm 下 OD 值) $\times$ 100%; 忽略 s (方差) 值; “/” 表示没有检测到增殖活性; 加粗表示加药组 OD 值与阴性组相比差异极显著($P < 0.01$)且增殖率 $\geq 130\%$ 。

2.3 泰和乌骨鸡活性肽组分 7、8、9、10 氨基酸组成分析

上述结果表明, 泰和乌骨鸡活性肽组分 7、8、9、10 具有明确的刺激小鼠骨髓有核细胞增殖作用, 为了进一步探索该 4 个组分的活性成分的物质基础, 作者对它们进行了氨基酸组成分析, 结果见表 3。从 18 种氨基酸中, 活性肽组分 7、8、9、10 主要含有 12 种氨基酸, 分别占总氨基酸质量分数的 55.9%、64.7%、53.9%、55.3%。该 12 种氨基酸分别为天

冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、精氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。组分 7 主要含酪氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和丙氨酸, 占该 12 种氨基酸总质量分数的 81.9%。组分 8 主要含甘氨酸、谷氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、脯氨酸和丙氨酸, 占该 12 种氨基酸总质量分数的 71.3%。组分 9 主要含甘氨酸、酪氨酸、谷氨酸、丙氨酸和天冬氨酸, 占该 12 种氨基酸总质量分数的 76.3%。组分 10 主要含苯丙氨酸、甘氨酸、

丙氨酸、谷氨酸、酪氨酸和天冬氨酸, 占该 12 种氨基酸总含量的 74.6%。

表 2 泰和乌骨鸡活性肽 8 个分离组分对小鼠全骨髓细胞增殖作用的影响

Tab.2 Effect of 8 fractions separated from Taihe black bone silky fowl active peptide on the proliferation of bone marrow cells from mice

质量浓度/ (μg/mL)	重复 次数	增殖率/%								
		1	4	7	8	9	10	11	13	
0.1	1	104	118	142	107	115	107	91	94	
	2	70	114	151	157	166	154	98	88	
	3	70	56	167	298	83	89	135	111	
	4	108	65	154	146	171	133	120	148	
1	1	110	114	132	131	115	101	92	99	
	2	74	82	162	180	165	127	104	85	
	3	74	92	170	134	102	60	99	68	
	4	113	123	141	166	188	208	133	168	
10	1	112	122	135	152	115	105	83	90	
	2	68	92	153	172	165	151	94	82	
	3	68	124	158	140	95	59	73	127	
	4	131	100	128	149	168	220	103	137	
100	1	108	111	132	140	107	108	75	98	
	2	54	85	132	129	182	147	131	118	
	3	54	97	117	138	109	81	81	86	
	4	111	91	121	150	150	185	125	131	

注: 增殖率= (加药组在 570 nm 下 OD 值/ 阴性组在 570 nm 下 OD 值) × 100%; 忽略 s(方差) 值; “/” 表示没有检测到增殖活性; 加粗表示加药组 OD 值与阴性组相比差异极显著 (P< 0.01) 且增殖率 ≥130%。

从上述结果可以看出, 组分 7、8、9、10 主要成分均含有丰富的酪氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和丙

氨酸, 可以推测, 该 5 种氨基酸组成了刺激小鼠骨髓有核细胞增殖活性成分的物质基础。

表 3 泰和乌骨鸡活性肽组分 7、8、9、10 氨基酸组成分析

Tab.3 Amino acid composition analysis of fractions 7, 8, 9 and 10 separated from Taihe black bone silky fowl active peptide

序号	所属氨基酸 类型	质量分数/%			
		组分 7	组分 8	组分 9	组分 10
1	Asp 天冬氨酸	3.91	7.35	4.44	4.35
2	Glu 谷氨酸	4.09	7.40	5.50	4.44
3	Ser 丝氨酸	1.63	2.72	1.75	2.56
4	Arg 精氨酸	1.72	4.31	2.31	1.97
5	Gly 甘氨酸	5.73	14.26	15.86	9.04
6	Thr 苏氨酸	1.52	3.43	1.62	2.11
7	Pro 脯氨酸	1.71	5.06	2.81	3.63
8	Ala 丙氨酸	2.71	4.70	5.34	6.33
9	Ile 异亮氨酸	1.12	2.37	1.12	1.53
10	Leu 亮氨酸	1.38	3.34	1.64	2.24
11	Phe 苯丙氨酸	1.05	2.37	1.54	12.71
12	Tyr 酪氨酸	29.33	7.39	9.97	4.42

3 结 语

作者从泰和乌骨鸡活性肽中成功筛选出 4 种具有有效刺激小鼠骨髓有核细胞增殖的组分, 这些活性肽可能直接或间接刺激骨髓中的基质细胞, 促进分泌一系列的 HGF, 从而提高血循环种细胞集落刺激因子(CSFs) 的活性, 进行造血调控。而具有刺激小鼠骨髓有核细胞增殖的活性肽主要是由酪氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和丙氨酸等氨基酸组成的肽类。

参考文献(References):

[1] Curt G A. Impact of fatigue on quality of life in oncology patients[J]. **Seminars In Hematology**, 2000, 37(Suppl 6): 14–17.

[2] Curt G A, Breitbart W, Cella D. Impact of cancer related fatigue on the lives of patients: new findings from the fatigue coalition[J]. **The Oncologist**, 2000, 5(5): 353– 360.

[3] Vogelzang N J, Breitbart W, Cella D. Patient, caregiver, and oncologist perceptions of cancer related fatigue: results of a tripart assessment survey. the fatigue coalition[J]. **Seminars In Hematology**, 1997, 34(Suppl 3): 4– 12.

[4] Lundholm K, Daneryd P, Bosaeus I, et al. Palliative nutritional intervention in addition to cyclooxygenase and erythropoietin treatment for patients with malignant disease: effects on survival, metabolism, and function[J]. **Cancer**, 2004, 100(9): 1967– 1977.

[5] Clibon U, Bonewald L, Caro J, et al. Erythropoietin fails to reverse the anemia in mice continuously exposed to tumor necrosis factor alpha in vivo[J]. **Experimental Hematology**, 1990, 18(5): 438– 441.

- [6] 陈东辉, 罗霞, 余梦瑶, 等. 鸡血藤煎剂对小鼠骨髓细胞增殖的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 352–355.
CHEN Donghui, LUO Xia, YU Mengyao, et al. Effect of *Spatholobus suberectus* on the bone marrow cells and related cytokines of mice[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2004, 29(4): 352–355. (in Chinese)
- [7] 孟玮, 邱世翠, 刘志强, 等. 白花蛇舌草对小鼠骨髓细胞增殖和 IL-2 生成的影响[J]. 滨州医学院学报, 2004, 27(4): 256–257.
MENG Wei, QIU Shicui, LIU Qiang, et al. Effect of *Oldenlandia diffusa* Roxb. (ODR) on proliferation of bone marrow cells and IL-2 production[J]. **Journal of Binzhou Medical College**, 2004, 27(4): 256–257. (in Chinese)
- [8] 王广丽, 邱世翠, 李淑珍, 等. 黄芪对小鼠骨髓细胞增殖和白细胞介素 1 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(16): 27–28.
WANG Guangli, QIU Shicui, LI Shuzhen, et al. Effects of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (AMB) on proliferation of bone marrow cells and interleukins 1 (IL-1) [J]. **China Journal of Modern Medicine**, 2002, 12(16): 27–28. (in Chinese)
- [9] 牛新华, 邱世翠, 丁长玲, 等. 白术对小鼠骨髓细胞增殖和白细胞介素 1 的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(3): 83–84.
NIU Xinhua, QIU Shicui, DING Changling, et al. Effect of white atractylodes rhizome on marrow cell transplantation and interleukin 1 of rats[J]. **China Journal of Modern Medicine**, 2002, 12(3): 83–84. (in Chinese)
- [10] Greenberger T S. The hematopoietic microenvironment[J]. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, 1991, 11(1): 65–84.
- [11] 田颖刚, 谢明勇, 付志红, 等. 乌骨鸡脂肪油中脂肪酸组成的气相色谱-质谱分析[J]. 南昌大学学报:理科版, 2006, 30(3): 264–267.
TIAN Yinggang, XIE Mingyong, FU Zhihong, et al. Analysis of fatty acids in oil extracted from black bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* brisson) by GC-MS[J]. **Journal of Nanchang University: Natural Science**, 2006, 31(3): 264–267. (in Chinese)
- [12] 田颖刚, 谢明勇, 吴红静, 等. 乌骨鸡与非药用鸡种鸡肉总脂质含量及脂肪酸组成的比较[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 29–32.
TIAN Yinggang, XIE Mingyong, WU Hongjing, et al. Comparison of total lipid content and fatty acid composition of meat from black bone silky fowl and other chickens[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(3): 29–32. (in Chinese)
- [13] Tian Y G, Xie M Y, Wang W Y, et al. Determination of carnosine in Black Bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) and common chicken by HPLC[J]. **European Food Research and Technology**, 2007, 226(1): 311–314.
- [14] 田颖刚, 谢明勇, 吴红静, 等. 乌骨鸡正己烷提取物补血作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 48–50.
TIAN Yinggang, XIE Mingyong, WU Hongjing, et al. Effects of hexane extract from Black bone silky fowl on hematopoiesis[J]. **Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica**, 2007, 23(1): 48–50. (in Chinese)
- [15] Tu Y G, Xie M Y, Sun Y Z, et al. Structural characterization of melanin from Black bone Silky Fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. **Pigment Cell Research**, 2008, 22(1): 134–136.
- [16] Tu Y G, Sun Y Z, Tian Y G, et al. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. **Food Chemistry**, 2009, 114(4): 1345–1350.
- [17] 涂勇刚, 孙亚真, 田颖刚, 等. 泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 145–149.
TU Yonggang, SUN Yazhen, TIAN Yinggang, et al. The antioxidant activity of melanin from Taihe Black bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 145–149. (in Chinese)
- [18] 吴光杰, 田颖刚, 谢明勇, 等. 乌骨鸡活性肽对体外非酶糖基化的抑制作用[J]. 南昌大学学报:理科版, 2007, 31(5): 456–458.
WU Guangjie, TIAN Yinggang, XIE Mingyong, et al. Inhibitory effect of bioactive peptides from Black bone silky fowl on nonenzymatic glucosylation of protein in vitro[J]. **Journal of Nanchang University: Natural Science**, 2007, 31(5): 456–458. (in Chinese)
- [19] 韩红梅, 杨贵贞. 人参三醇型皂甙调整骨髓受抑模型鼠的免疫功能[J]. 中国免疫学杂志, 1991, 7(5): 321–316.
HAN Hongmei, YANG Guizhen. Immune function modulation of panaxatriol ginsenoside on myelosuppression mice[J]. **Chinese Journal of Immunology**, 1991, 7(5): 321–316. (in Chinese)