

李昊阳, 黄永震, 黄荣, 等. 牦牛 JunD 基因生物信息学分析及其对成肌细胞凋亡的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (5): 61-70.

LI H Y, HUANG Y Z, HUANG R, et al. Bioinformatics of the JunD gene in yaks and its effect on myoblast apoptosis [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (5): 61-70.

## 牦牛 JunD 基因生物信息学分析及其对成肌细胞凋亡的影响

李昊阳<sup>1,2</sup>, 黄永震<sup>2</sup>, 黄荣<sup>3</sup>, 彭巍<sup>3</sup>, 张君<sup>3</sup>, 雷初朝<sup>2</sup>, 赵宗胜<sup>1\*</sup>

(1. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000;

2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 旨在解析牦牛转录因子 JunD 基因的生物信息学特征, 探究其对牦牛成肌细胞凋亡的影响。通过 TMHMM-2.0、ProtParam、SignalP 5.0 和 SWISS-MODEL 等工具对牦牛 JunD 基因进行生物信息学分析, 构建干扰片段和过表达载体对 JunD 基因进行干扰和过表达后, 采用 Western blot、免疫荧光染色、流式细胞术以及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法分析不同表达情况下 JunD 对牦牛成肌细胞凋亡的调控作用。结果: 相关性分析表明, 牦牛 JunD 基因主要定位于细胞核中, 共编码 346 个氨基酸, 存在 35 个潜在的磷酸化位点, 其中包括与细胞分化相关的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 及与细胞周期相关的酪蛋白激酶 II (CK II)、周期蛋白依赖性激酶 1 (cdc2) 等关键蛋白激酶的潜在作用位点, 且不含跨膜螺旋结构和信号肽; RT-qPCR 和 Western blot 结果显示, 干扰 JunD 基因后 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl2) 相关 X 蛋白 (BAX)、半胱氨酸蛋白酶 9 (Caspase9) 等凋亡标志基因的 mRNA 和蛋白表达量都显著上升 ( $P < 0.05$ ), 过表达后, 凋亡标志基因 BAX、Caspase9 的 mRNA 和蛋白表达量与干扰结果相反, 均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 流式细胞分析结果显示, 干扰 JunD 后对照组和干扰组的晚期凋亡率相近, 但干扰组的早期凋亡率明显高于对照组, 而过表达 JunD 基因后的试验结果则与干扰组相反。结论: JunD 基因主要定位于细胞核, 干扰 JunD 基因可促进成肌细胞的凋亡, 而过表达则抑制成肌细胞的凋亡, 提示该基因可能对牦牛肌肉的生长发育具有重要的调控作用。

**关键词:** 牦牛; JunD; 生物信息学; 成肌细胞; 细胞凋亡

**中图分类号:** S852 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)05-0061-10

## Bioinformatics of the JunD gene in yaks and its effect on myoblast apoptosis

LI Haoyang<sup>1,2</sup>, HUANG Yongzhen<sup>2</sup>, HUANG Rong<sup>3</sup>, PENG Wei<sup>3</sup>, ZHANG Jun<sup>3</sup>,

LEI Chuchao<sup>2</sup>, ZHAO Zongsheng<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;

2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining 810016, China)

**Abstract:** This study aimed to analyze the bioinformatics characteristics of the yak transcription factor JunD gene and investigate its effect on myoblast apoptosis in the animal. Bioinformatics analysis of the yak JunD gene was performed using TMHMM-2.0, ProtParam, SignalP 5.0, and SWISS-MODEL. After constructing interference fragments and overexpression vectors to knock down or overexpress the JunD gene, the regulatory effects of JunD on myoblast apoptosis in yaks under different expression conditions were analyzed using Western blot, immunofluorescence staining, flow cytometry, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results were as follows: The correlation analysis indicated that the yak JunD gene was primarily localized in the nucleus, encoding 346 amino acids with 35 potential phosphorylation sites, including putative target sites for key protein kinases associated with cellular processes such as p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK, related to differentiation), casein kinase II (CK II), and cyclin-dependent kinase 1 (cdc2, both associated with cell cycle regulation), and contained no transmembrane helices or signal peptide. The RT-qPCR and Western blot results showed that interference with JunD significantly raised both mRNA and protein expression levels of apoptosis marker genes including Bcl2-associated X protein (BAX) and caspase-9 (Caspase9) ( $P < 0.05$ ). After overexpression, the mRNA and protein expression levels of apoptosis marker genes BAX and Caspase9 showed opposite trends to the interference results, both significantly decreasing ( $P < 0.05$ ). The flow cytometry analysis showed

收稿日期: 2025-05-09; 修回日期: 2026-03-08

基金项目: 兵团重大科技项目 (32160770)

第一作者: 李昊阳, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 赵宗胜, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物遗传育种与繁殖, E-mail: zhaozongsh@shzu.edu.cn.

that, after JunD interference, the late apoptosis rates were similar between the control and interference groups, but the early apoptosis rate in the interference group was significantly higher than that in the control group; while the experimental results after JunD overexpression showed the opposite trend to the interference group. In conclusion, the JunD gene was mainly localized in the nucleus. Interference with JunD promoted myoblast apoptosis, while overexpression inhibited myoblast apoptosis; which suggested that this gene might play an important regulatory role in muscle growth and development of yaks.

**Keywords:** yak; JunD; bioinformatics; myoblasts; apoptosis

在自然高海拔牧场上生长的牦牛所提供的牛肉,以其肉质独特的风味和营养丰富著称,富含蛋白、矿物质与维生素<sup>[1]</sup>。然而,牦牛的产肉率相对较低,在一定程度上限制了高原牛肉市场的发展。肌肉生长和发育是影响牦牛肉品质和产量的关键因素。骨骼肌作为肉用家畜关键的经济性状,其生产性能一直是动物育种领域研究的核心课题。骨骼肌由不同收缩特性和代谢特点的肌纤维构成,而肌纤维数量和类型,直接决定了肉产品产量和质量的高低。在胚胎时期,成肌细胞的增殖和分化对肌纤维的形成发挥着关键作用,也决定着牦牛出生后肌肉的生长潜力。一般来说,肌肉中的肌纤维数量在胚胎发育阶段即已基本定型,此后,肌肉体积的增加主要通过肌纤维的增粗和类型转变来实现<sup>[2]</sup>。值得一提的是,成肌细胞的形成源于皮肤层,该细胞具备多能性特征,其转变为成肌细胞的过程受到特定信号蛋白的诱导作用所支配<sup>[3]</sup>。在肌肉发育进程中,成肌细胞增殖、分化和凋亡的过程起着至关重要的作用。实际上,肌肉发育受多种遗传因素的调控,包括基因多态性、转录因子、DNA 甲基化和非编码 RNA 等多个方面<sup>[4-5]</sup>。

转录因子 JunD 基因是多功能激活剂蛋白-1 (AP-1) 转录因子家族中的一员,可通过协调细胞周期进程和肌肉分化决定因素网络,对哺乳动物的肌肉生长进行调控。同时,JunD 还在应激响应、细胞增殖与死亡等过程中发挥关键调控作用。通过研究的深入,包括基因组测序与功能分析,揭示了 JunD 基因所编码的蛋白质在其细胞核内扮演着至关重要的转录调控角色<sup>[6]</sup>。过往研究采用基因敲除、过表达和功能调控等方法,深入探究了 JunD 基因在细胞信号传导、细胞增殖和凋亡等生物学过程中的所发挥的功能<sup>[7]</sup>。有研究指出,JunD 基因参与调控癌症、炎症和代谢性疾病等的发生和发展<sup>[8]</sup>,它还参与了哺乳动物的脂质积累与代谢的调控<sup>[9-10]</sup>。此外,研究还表明,JunD 可通过调节 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl2) 家族蛋白、天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白水解酶 (Caspase) 级联反应及活性氧 (ROS) 水平来抑制或促进细胞凋亡。例如, Paneni 等<sup>[11]</sup>发现缺失 JunD 的小鼠内皮细胞氧化应激显著加剧并伴随功能衰退; Wang 等<sup>[12]</sup>则证明 JunD 上调抗氧化基因表达,并保

护胰岛  $\beta$  细胞免于凋亡。然而,目前在牛科动物尤其是牦牛肌肉细胞凋亡调控方面尚无系统研究。因此,本研究以牦牛 JunD 为对象,首先对牦牛 JunD 基因的生物信息学功能进行了探究,其次通过蛋白免疫印记 (Western blot)、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、流式细胞术等试验方法验证 JunD 基因对牦牛成肌细胞凋亡的影响,进而深入探讨 JunD 基因对牦牛肌肉生长发育调控的作用,旨在揭示其在成肌细胞凋亡调控中的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

原代成肌细胞分离自青海省畜牧兽医研究所提供的 90 d 牦牛胚胎骨骼肌组织。

琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒大量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; Hoechst 33342 活细胞染色液、AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Lipofectamine™ 3000 为美国 Thermo Fisher Scientific 产品; DMEM 培养基为美国 Gibco 产品; 胎牛血清 (FBS) 为以色列 Biological Industries 产品。抗体 Bcl2 (1:5 000)、Caspase9 (1:1 000)、Bcl2 相关 X 蛋白 (BAX) (1:20 000)、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) (1:20 000) 及 HRP 偶联的兔抗山羊 (1:3 000) 为杭州华安生物技术有限公司产品; 肌球蛋白重链 (MyHC) (1:200) 为美国 GeneTex 公司产品; 荧光二抗 Alexa Fluor 594 为美国 ImmunoWay 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 牦牛成肌细胞的分离与培养

将冻存于液氮中的牦牛原代成肌细胞解冻后,接种于 100 mm 细胞培养皿内,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,温度与 CO<sub>2</sub> 含量分别设置为 37 °C、5%。使用细胞培养基 (DMEM+20% FBS+2% 双抗) 对原代成肌细胞进行培养,每天定时更换新鲜培养基。当细胞生长密度达到 80% 左右时,进行传代培养或用肌分化诱导培养基 (DMEM+2% 马血清+2% 双抗) 诱导分化培养。根据 Lipofectamine™ 3000 转染试剂的说明书,将阳性对照 (Si) 和阴性对照 (NC) 转染到成肌细胞中。转染后 24 h 测量干扰或过表达效率。

### 1.2.2 载体构建与干扰片段合成

JunD 基因的过表达载体以及干扰 RNA 片段均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1),经质检合格后进行后续试验。

表1 JunD 的 siRNA 序列

基因	引物序列 (5'→3')
JunD-354	F: GCUCAUUUAAGCUUGUGUTT
	R: ACACAAGCUUAAAUGAGCCT
JunD-408	F: CCAGAAGAAAGGCUGUCUUTT
	R: AAGACAGCCUUUCUUCUGCCT
NC	F: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	R: ACGUGACACGUUCGGAGAATT

### 1.2.3 RNA 提取、cDNA 合成及 RT-qPCR 检测

用 TRIzol 法提取细胞中的总 RNA,并用 NanoDrop 2000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量。通过使用艾科瑞生物反转录试剂盒将提取的总 RNA 反转录为 cDNA。之后,通过 RT-qPCR 对 cDNA 进行检测。PCR 反应体系(10  $\mu$ L): 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 6  $\mu$ L, 正向引物 0.2  $\mu$ L, 反向引物 0.2  $\mu$ L, 1  $\mu$ L cDNA, 3.6  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。每组包含 3 个生物学重复,每个生物学重复均包含 3 个技术重复。使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>方法对 mRNA 的表达水平进行定量分析,  $\beta$ -actin 作为内参基因。引物信息见表 2。

表2 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')
Bcl2	F: ATGACCCGAGTACCTGAAC
	R: CATAAGCTCCACAAAAGG
Caspase9	F: TGCTGGTCATCCTGTCTC
	R: TAACTCCTGGCCAAACCACC
BAX	F: GAGATGAATTGGACAGTAACA
	R: CATCCATCTGTGCCATAAAC
$\beta$ -actin	F: CTTCGAGCAGGAGATGGC
	R: CCGTGTGGCGTAGAGGT
JunD	F: AGGGGACACTGGAGGATGAA
	R: CCTTAATGCGCTCTTGCCTG

### 1.2.4 细胞免疫荧光染色试验

针对细胞培养与诱导的过程,选取处于对数生长期的细胞,将其精确接种于 48 孔板内,确保每个特

定处理下均配置了 3 个独立的重复孔。每孔加入 200  $\mu$ L 的完全培养基,并分别将 Si-NC, Si-JunD, pcDNA-3.1 和 pcDNA-3.1-JunD 转染至牛成肌细胞。当细胞融合度达到 80%时,更换为含 2% 马血清的培养基进行诱导分化。3 d 后,细胞形成肌管。每孔加入 200  $\mu$ L 4% 多聚甲醛溶液,室温固定 30 min。固定完成后,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入 0.5% Triton X-100,室温孵育 10 min,随后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入 5% BSA 封闭液,室温封闭 30 min。按 1:200 的比例稀释一抗(anti-MyHC),每孔加 200  $\mu$ L 稀释后的一抗。将孔板置于 4  $^{\circ}$ C 摇床,孵育 7 d。孵育结束后,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。按 1:400 的比例稀释荧光二抗(Alexa Fluor 594),每孔加入 200  $\mu$ L 稀释后的二抗。室温避光孵育 2 h 后, PBS 清洗 3 次,每次 5 min。使用 100 $\times$ Hoechst 染色剂,按说明书稀释后,每孔加入 200  $\mu$ L 稀释后的染色剂,室温避光核染色 10 min。染色结束后, PBS 清洗 3 次,每次 5 min。在倒置荧光显微镜下观察细胞,拍摄图像并保存。

### 1.2.5 流式细胞术试验

使用 AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒检测牦牛成肌细胞的凋亡情况。根据说明书的要求用 PBS 缓冲液调整为合适的细胞浓度 100  $\mu$ L,并避光在常温下用 5  $\mu$ L AnnexinV-FITC/PI 染色 15 min,然后加入结合缓冲液 500  $\mu$ L 后尽快上机检测。

### 1.2.6 Western blot 试验

取待测细胞或组织,加入含 1% 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min 取上清液,测定蛋白浓度。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离(80 V 浓缩胶,120 V 分离胶),之后转移至聚偏二氟乙烯膜(300 mA,冰浴,转膜时间依分子量而定)。5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入相应一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水(TBST)洗涤 3 次,加入 HRP 标记二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次,增强型化学发光(ECL)化学发光法显影,成像系统采集图像。以目的蛋白与内参  $\beta$ -actin 灰度值比值表示相对表达水平。

### 1.2.7 生物信息学分析

利用在线的生物信息学分析工具(表3)对牦牛 JunD 基因(登录号:XM\_070373321.1)进行生物信息学分析。

### 1.3 数据统计与分析

利用 SPSS 26.0 软件对数据进行分析。利用独立样本 *t* 检验对 2 组数据进行比较分析,利用单因素方差分析对多组样本数据进行比较分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。数据以“平均值 $\pm$ 标准误”的

形式表示。

表 3 生物信息学在线分析工具

软件	网址	功能预测
ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>	理化性质
ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>	亲/疏水性分析
TMHMM-2.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>	跨膜区域
SignalP 5.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/</a>	信号肽
PSORT II	<a href="https://psort.hgc.jp/form2.html">https://psort.hgc.jp/form2.html</a>	亚细胞定位
NetPhos 3.1	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/</a>	磷酸化位点
PSIPRED	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>	二级结构
SWISS-MODEL	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>	三级结构
STRING 12.0	<a href="https://cn.string-db.org/">https://cn.string-db.org/</a>	蛋白互作

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

#### 2.1.1 理化性质及亲/疏水性分析

牦牛 JunD 基因编码的蛋白质分子式为 C1556H2507N433O487S6，分子质量约为 32 kDa，由 346 个氨基酸残基组成。氨基酸组成分析显示，丙氨酸 (Ala) 占比最高，达 15.6%。该蛋白含 32 个带负电荷的酸性氨基酸，如天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸

(Glu) 以及带正电荷的碱性氨基酸精氨酸 (Arg)、赖氨酸 (Lys)，理论等电点 (pI) 为 6.86 (表 4)。不稳定指数 (instability index) 为 53.89，表明该蛋白属于不稳定蛋白。此外，平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.255，表明其整体呈亲水性。通过 ProtScale 软件分析 JunD 蛋白的亲/疏水性，发现其局部亲水性评分范围在 -2.589 (强亲水) 到 1.656 (弱疏水) 之间，且亲水区域占比显著高于疏水区域 (图 1)，进一步证实了其亲水性特征。

表 4 牦牛 JunD 蛋白核苷酸组成

氨基酸	数量/个	频率/%	氨基酸	数量/个	频率/%
丙氨酸 (Ala, A)	54	15.6	赖氨酸 (Lys, K)	18	5.2
精氨酸 (Arg, R)	14	4.0	甲硫氨酸 (Met, M)	4	1.2
天冬酰胺 (Asn, N)	6	1.7	苯丙氨酸 (Phe, F)	9	2.6
天冬氨酸 (Asp, D)	9	2.6	脯氨酸 (Pro, P)	42	12.1
半胱氨酸 (Cys, C)	2	0.6	丝氨酸 (Ser, S)	30	8.7
谷氨酰胺 (Gln, Q)	15	4.3	苏氨酸 (Thr, T)	20	5.8
谷氨酸 (Glu, E)	23	6.6	色氨酸 (Trp, W)	0	0.0
甘氨酸 (Gly, G)	34	9.8	酪氨酸 (Tyr, Y)	5	1.4
组氨酸 (His, H)	3	0.9	缬氨酸 (Val, V)	14	4.0
异亮氨酸 (Ile, I)	6	1.7	吡咯赖氨酸 (Pyl, O)	0	0.0
亮氨酸 (Leu, L)	38	11.0	硒代半胱氨酸 (Sec, U)	0	0.0

#### 2.1.2 跨膜区域、信号肽、亚细胞定位预测

TMHMM-2.0 工具的跨膜结构域预测表明，牦牛 JunD 蛋白不存在典型跨膜螺旋结构，其跨膜螺旋残基期望值仅为 0.021 7 (图 2)，提示其可能不具有跨膜功能。通过 PSORT II 软件的亚细胞定位预测分析，JunD 蛋白主要分布于细胞核 (78.3%)，其次为线粒体 (13.0%)、细胞质 (4.3%) 和细胞骨架

(4.3%)。SignalP 5.0 软件的信号肽分析进一步显示，JunD 蛋白 N 端不存在信号肽切割位点 (图 3)。

#### 2.1.3 磷酸化位点预测

通过 NetPhos 3.1 在线软件预测，牦牛 JunD 蛋白包括 35 个潜在磷酸化位点，其中 Ser 位点 22 个，Thr 位点 11 个，酪蛋白位点 2 个 (图 4)，涉及包括与细胞分化相关的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38

MAPK) 及与细胞周期相关的 CK II、cdc2 等多种关键蛋白激酶磷酸化位点 (表 5)。

表 5 牦牛 JunD 蛋白磷酸化位点位置及激酶

磷酸化位点		激酶 (得分)
位置	氨基酸	
6	Y	unsp (0.890)、SRC (0.507)
12	S	unsp (0.602)、cdc2 (0.585)
19	S	unsp (0.564)
20	S	cdc2 (0.505)、CKI (0.509)
21	S	unsp (0.773)、cdc2 (0.564)
26	S	cdc2 (0.556)、PKC (0.581)
29	S	unsp (0.908)、cdk5 (0.577)、p38 MAPK (0.539)
40	T	PKG (0.538)
45	S	unsp (0.741)、cdc2 (0.521)、PKC (0.564)
53	T	PKC (0.535)
55	S	unsp (0.943)、DNAPK (0.509)
57	S	cdc2 (0.555)
92	S	unsp (0.736)、p38 MAPK (0.550)
102	S	unsp (0.925)、p38 MAPK (0.523)
112	S	PKA (0.719)
119	T	unsp (0.817)、cdk5 (0.558)、p38 MAPK (0.554)
121	T	PKC (0.564)
122	S	unsp (0.775)
123	T	DNAPK (0.528)
133	S	unsp (0.992)、CKII (0.528)
180	S	cdc2 (0.533)
188	T	unsp (0.876)、cdk5 (0.516)
194	Y	unsp (0.951)
204	T	PKC (0.744)
230	T	unsp (0.738)、GSK3 (0.500)
245	T	unsp (0.887)
251	S	unsp (0.878)、CKI (0.543)
255	S	unsp (0.690)、cdk5 (0.682)、GSK3 (0.549)、p38 MAPK (0.538)
259	S	unsp (0.998)、cdk5 (0.595)、GSK3 (0.546)、CKI (0.515)
265	T	ATM (0.577)
283	S	PKC (0.856)、unsp (0.638)、cdc2 (0.543)
294	S	PKA (0.678)、unsp (0.996)、cdc2 (0.549)、CK II (0.541)
302	T	PKC (0.712)、unsp (0.571)
315	S	cdc2 (0.532)
330	S	unsp (0.971)

注: PKA, 蛋白激酶 A; PKC, 蛋白激酶 C; CK I, 酪蛋白激酶 I; CK II, 酪蛋白激酶 II; GSK3, 糖原合成酶激酶 3; CDK1, 周期蛋白依赖性激酶; cdc2, 细胞分裂周期蛋白 2; CDK5, 周期蛋白依赖性激酶 5; SRC, 酪氨酸蛋白激酶; p38 MAPK, p38 丝裂原活化蛋白激酶; DNAPK, DNA 依赖性蛋白激酶; ATM, 共济失调毛细血管扩张突变激酶; unsp, 非特异性激酶。

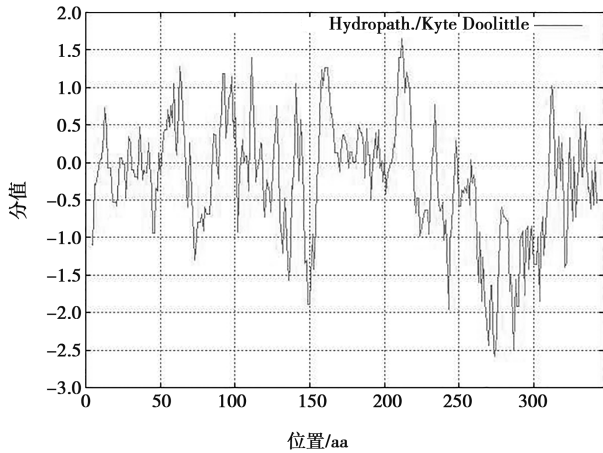


图 1 牦牛 JunD 蛋白亲/疏水性分析

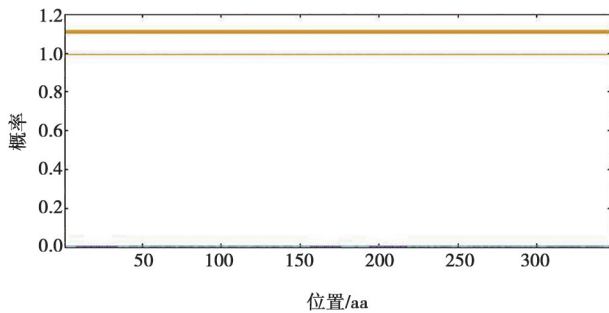


图 2 牦牛 JunD 蛋白跨膜结构域预测

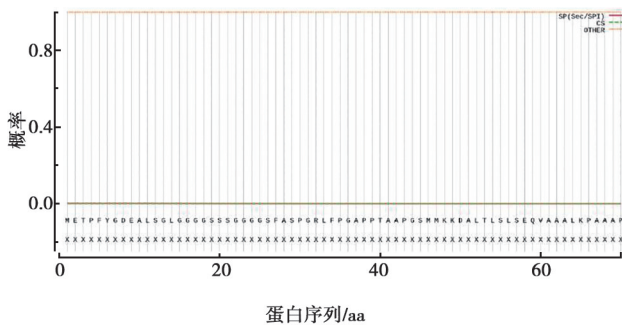


图 3 牦牛 JunD 蛋白信号肽预测

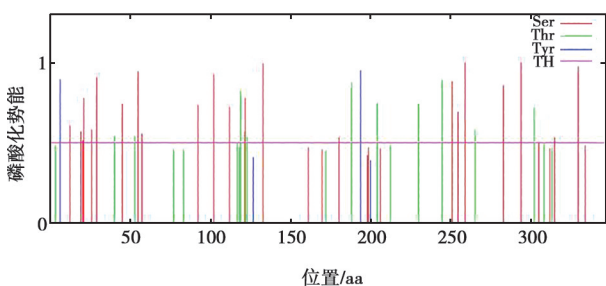


图 4 牦牛 JunD 蛋白磷酸化位点预测

### 2.1.4 二级结构和三级结构预测

SWISS-MODEL 预测显示，牦牛 JunD 蛋白的二级结构以  $\alpha$ -螺旋和无规卷曲为主（图 5）。 $\alpha$ -螺旋作为典型的刚性结构元件，可能参与维持蛋白核心构象稳定性或形成功能性结构域；而无规卷曲的高占比

表明该蛋白具有显著的构象灵活性，暗示其可能通过动态结构变化参与配体结合、信号转导或翻译后修饰调控等生物学过程。牦牛 JunD 蛋白三级结构预测见图 6。

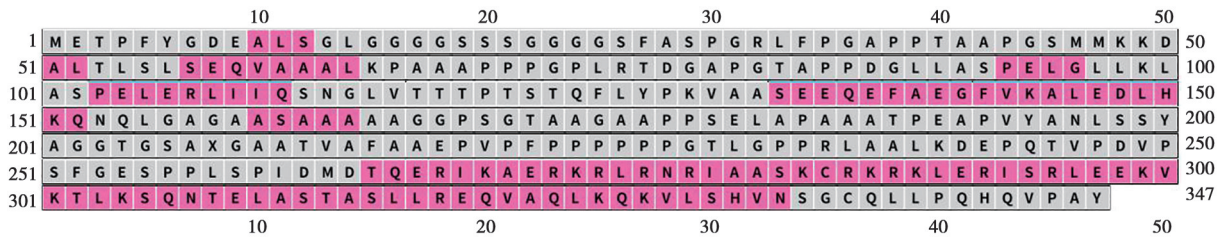


图 5 牦牛 JunD 蛋白二级结构预测

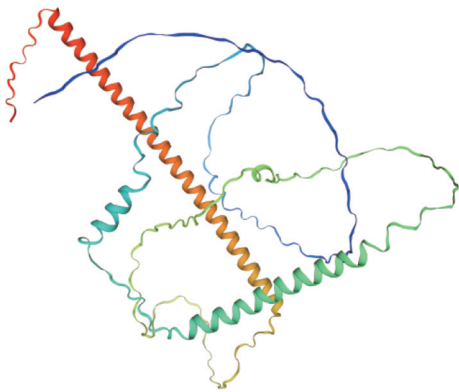


图 6 牦牛 JunD 蛋白三级结构预测

### 2.1.5 蛋白质互作预测

图 7 展示的蛋白质互作网络涵盖了 JunB 蛋白、丝裂原活化蛋白激酶 10 (MAPK10)、活化转录因子 3 (ATF3)、FOS 蛋白、FOS 样抗原 1 (FOSL1) 和人类 T 细胞白血病病毒 1 型编码的碱性亮氨酸拉链因子 (HBZ) 等关键蛋白，他们可能通过相互作用形成一个复杂的功能网络。这一网络可能在 RNA 代谢、核糖体生物合成以及细胞周期调控等关键细胞生物学过程中发挥重要作用。此外，网络中的大多数基因与肌肉生长发育密切相关，而 JunD 作为该网络的重要组成部分，可能通过与其他蛋白的相互作用参与肌肉的生长发育过程。

培养分离出的细胞。通过免疫荧光染色对分离出的细胞进行鉴定。

由图 8 可知， $\beta$ -actin 蛋白经荧光标记后经激发呈现绿色，细胞核经 DAPI 染色后经激发呈现蓝色。观察从牦牛成肌细胞的免疫荧光鉴定，结果显示细胞纯度达 90% 以上。

### 2.2 免疫荧光鉴定牦牛成肌细胞

采用 II 型胶原酶和胰酶混合液对胎牛后肢肌肉进行消化处理。将收集到的混合细胞悬液通过滤网过滤，依次为 100 目、200 目和 400 目，随后以 1 500 r/min 离心 5 min。弃上清液后细胞沉淀用生长培养基重悬浮，再将其接种于 60 mm 直径培养皿中。采用差速贴壁方法对细胞液进行纯化，随后在培养箱中

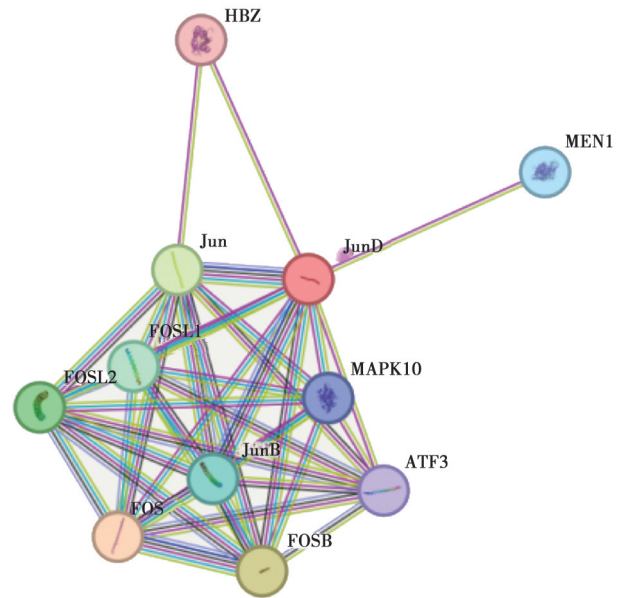


图 7 牦牛 JunD 蛋白互作分析

### 2.3 干扰 JunD 基因促进成肌细胞凋亡

为了最大化 JunD 基因的干扰效率，在牦牛成肌细胞中分别转染干扰片段 408 (Si-4)、干扰片段 354 (Si-3) 以及同时转染 2 种干扰片段 (Si-4+3)。结果表明，3 种方式都能有效降低 JunD 基因的表达，其中干扰片段 408 (Si-4) 的转染效果最佳 ( $P < 0.05$ ) (图 9A)。因此，后续试验选择 Si-4 干扰片段进行转染，并将其命名为 Si-JunD。进一步验证表

明, Si-JunD 组的 JunD 基因表达显著低于对照组 (P<0.05) (图 9B), 干扰效率较高, 满足后续试验

的要求。

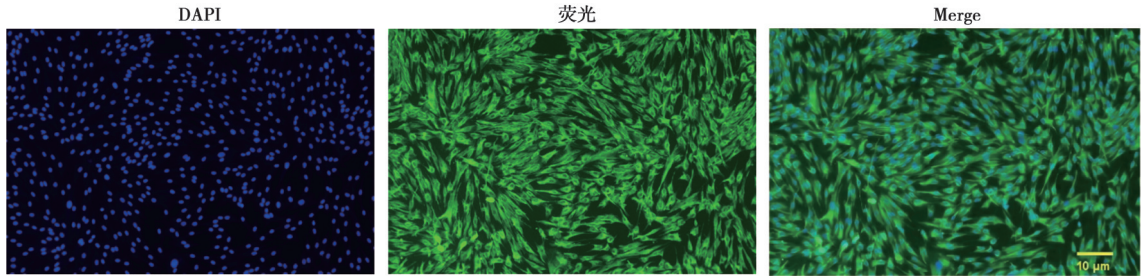
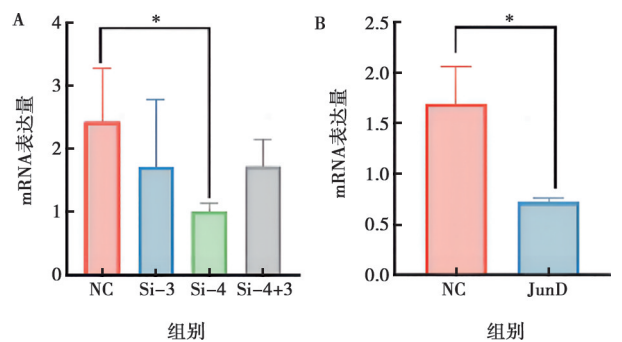


图 8 牦牛成肌细胞免疫荧光染色

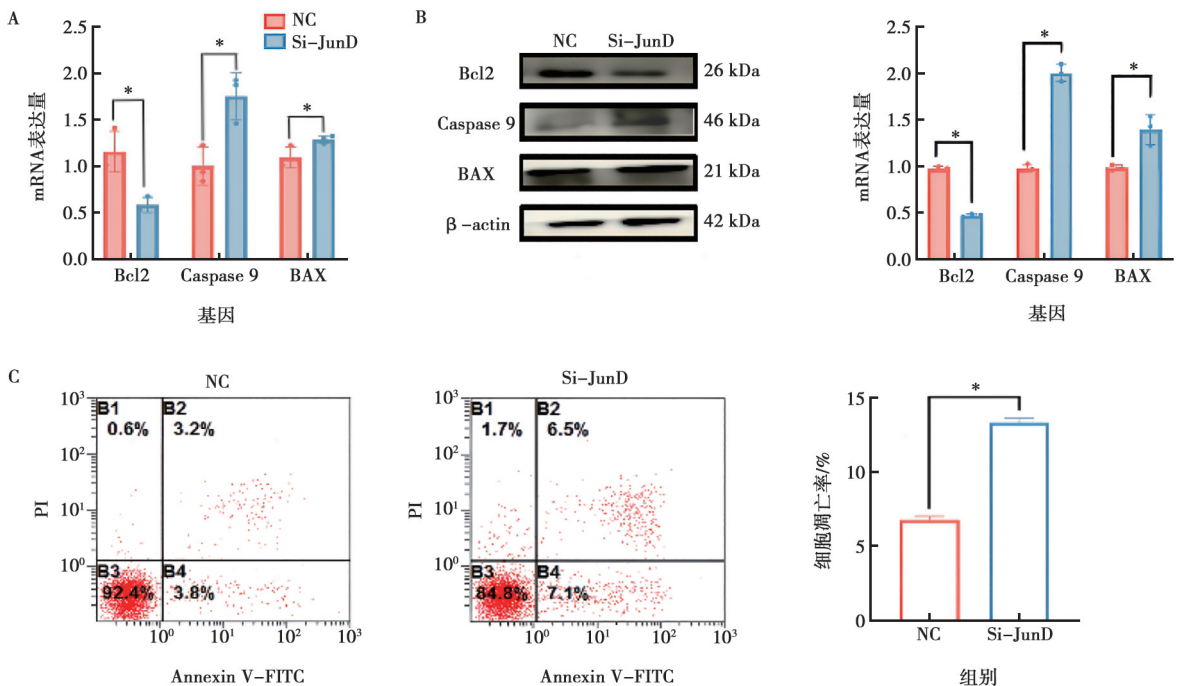
为明确 JunD 在牦牛成肌细胞凋亡中的功能, 通过 RNA 干扰技术敲低 JunD 表达, 并检测凋亡相关分子标志变化。将对照组命名为 NC, 干扰组命名为 Si-JunD。RT-qPCR 结果显示, 敲低 JunD 显著上调促凋亡基因 Bax 和 Caspase 9 的 mRNA 表达水平 (P<0.05), 同时下调了抗凋亡基因 Bcl2 基因水平 (P<0.05) (图 10A)。Western blot 分析进一步验证, Bax 蛋白表达量升高 (P<0.05), 而 Bcl2 蛋白水平呈剂量依赖性降低 (图 10B)。此外, 流式细胞术检测表明, 对照组 (NC) 和敲低组 (Si-JunD) 的晚期凋亡率 (B2) 相近, 而 Si-JunD 组的早期凋亡率 (B4) 明显高于 NC 组。对 Si-JunD 和对照组 NC 细胞凋亡率 (B2+B4) 进行统计学分析, 结果显示, Si-JunD 组的细胞凋亡率显著高于 NC 组 (P<0.05), 表明干

扰 JunD 促进了细胞的凋亡 (图 10C)。



A. 干扰片段的筛选; B. 干扰效果的检测。\* 表示 P<0.05, 下同。

图 9 JunD 基因干扰效率检测



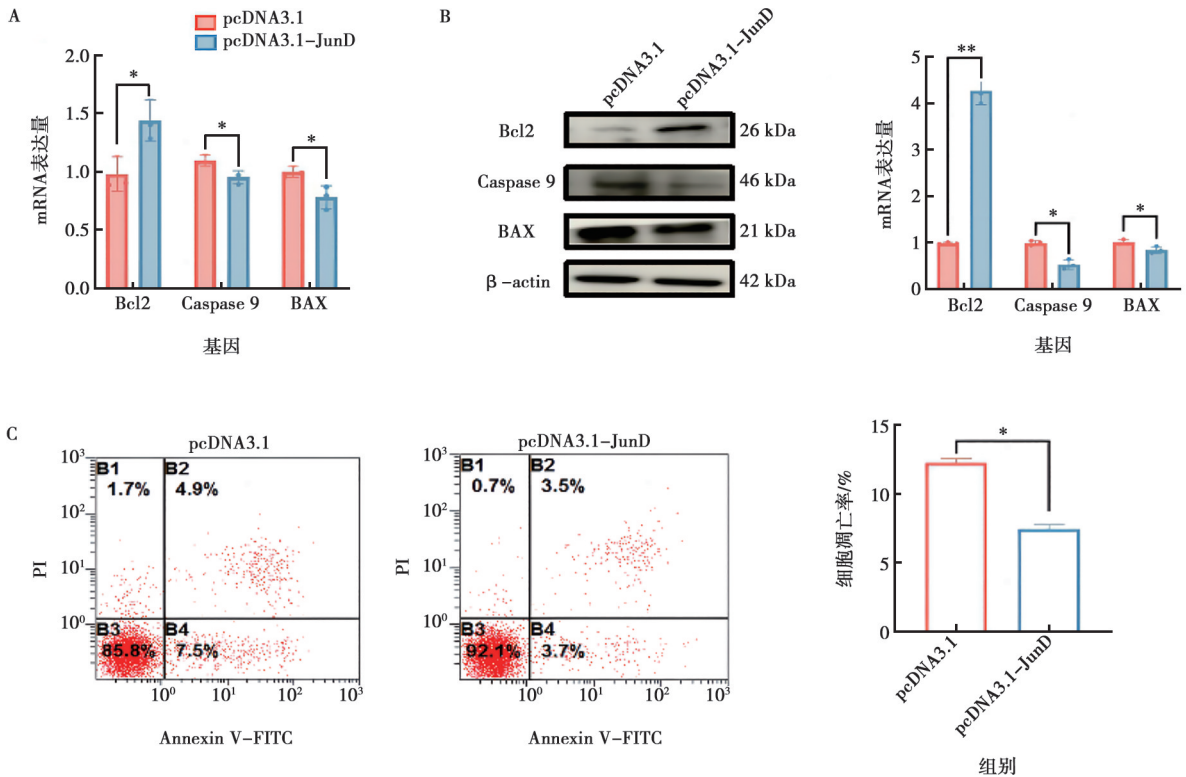
A. RT-qPCR 检测; B. Western blot 检测; C. 流式细胞术分析。

图 10 干扰 JunD 基因促进成肌细胞凋亡 (n=3)

### 2.4 过表达 JunD 基因抑制成肌细胞凋亡

为了进一步验证 JunD 对牦牛成肌细胞凋亡的负调控功能，构建了 pcDNA3.1-JunD 过表达载体。结果表明，过表达 JunD 后，Bcl2 的 mRNA 表达水平显著上调 ( $P < 0.05$ )，而 BAX 和 Caspase 9 的 mRNA 表达水平显著下调，呈现与 Bcl2 相反的趋势 (图 11A)。在蛋白质水平上，Bcl2 的表达水平极显著上升 ( $P < 0.01$ )，而 BAX 和 Caspase 9 的表达水平显著下降，与干扰 JunD 后的变化趋势相反 (图 11B)。以

上结果表明，JunD 能抑制牦牛成肌细胞的凋亡。此外，通过流式细胞术检测过表达 JunD 对凋亡的影响，结果显示，对照组 (pcDNA3.1) 和过表达组 (pcDNA3.1-JunD) 组的晚期凋亡率 (B2) 相近，而过表达组的早期凋亡率 (B3) 明显低于对照组。对 2 组细胞凋亡率进行统计学分析，结果显示，过表达 JunD 的细胞凋亡率显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )，进一步证实了 JunD 的抗凋亡作用 (图 11C)。



A. RT-qPCR 检测; B. Western blot 检测; C. 流式细胞术分析。\* \* 表示  $P < 0.01$ 。

图 11 过表达 JunD 基因抑制成肌细胞凋亡

### 3 讨论

家畜骨骼肌的发育状态与其胴体重和肉质品质等关键经济性状密切相关。家畜的肌肉生长与发育不仅受到外部环境条件和饲养管理的影响，更依赖于复杂的遗传机制与特定基因的调控作用<sup>[13]</sup>。骨骼肌的形成，即肌发生，是胚胎早期发育的一个多阶段的生物学过程。特别是在胚胎阶段，肌纤维的形成尤为关键，成肌细胞的增殖与分化能力决定了肌肉的生长潜力<sup>[14]</sup>。在这个过程中，中胚层的间充质干细胞在受到特定信号分子的诱导后分化为肌肉细胞。JunD 作为 AP-1 转录因子家族成员，主要负责调控靶基因的转录，帮助细胞响应环境信号。它可在氧化应激、细胞分化和

增殖等过程中发挥转录抑制或激活作用，对细胞的增殖、分化和凋亡起着关键作用<sup>[15]</sup>。有研究表明，缺乏 JunD 的小鼠死亡率增加，心肌细胞凋亡和纤维化加剧，表明 JunD 能够限制心肌细胞肥大并保护心脏免受压力超负荷引起的损伤<sup>[16]</sup>。此外，JunD 基因表达的精细调控及其蛋白质-蛋白质之间的相互作用可调节细胞增殖、分化和凋亡等过程。JunD 蛋白质活性异常可能导致肿瘤、代谢及病毒类疾病的发生<sup>[17]</sup>。

生物信息学分析结果显示牦牛 JunD 基因编码 346 个氨基酸，不含信号肽，无跨膜结构域，属于亲水性不稳定蛋白，这可能影响其结构稳定性与功能调控，与此前研究一致<sup>[2]</sup>。主要定位于细胞核中，它有 35 个潜在的磷酸化修饰位点，其中包括 cdc2、

CK II、PKC 等多个与细胞周期相关的磷酸化酶,表明 JunD 基因参与细胞周期调控。此外,这些翻译后修饰可能在细胞信号传导和代谢调控中起关键作用。蛋白质互作分析显示,JunD 与 JunB、MAPK10、ATF3、FOS、FOSL1 和 HBZ 等蛋白相互作用形成一个复杂的功能网络,涉及白细胞介素-17 (IL-17)、MAPK 等信号通路,参与 RNA 代谢、核糖体生物合成以及细胞周期调控等关键的细胞生物学过程。MAPK10 是肌肉代谢的关键基因<sup>[18]</sup>,JunB 可以调节肌细胞蛋白质合成<sup>[19]</sup>,ATF3 能抑制小鼠成肌细胞增殖分化<sup>[20]</sup>,FOS 也会影响小鼠成肌细胞增殖与分化<sup>[21]</sup>。陈亦民等<sup>[22]</sup>在骨骼肌损伤修复中的研究发现,JunD 与 MAPK10 等蛋白的互作可能通过 IL-17 信号通路调控细胞凋亡,抑制 MAPK 信号通路可以影响炎症因子的释放,进而减轻骨骼肌细胞损伤、抑制炎症介质释放、促进骨骼肌修复。总之,JunD 蛋白互作蛋白及其信号通路大多与肌肉生长发育相关。这些分析结果为理解 JunD 基因在牦牛肌肉发育中的潜在作用提供了重要线索,也为进一步研究该基因的功能及其在细胞生物学过程中的调控机制奠定了基础。

本研究采用实时荧光定量 PCR、Western blot、流式细胞术、免疫荧光染色等技术深入探究了 JunD 基因对牦牛成肌细胞凋亡的影响。结果显示,JunD 敲低可导致 Bax 与 Caspase9 表达上调,Bcl2 表达下调,提示其可能通过调控线粒体通路促进细胞凋亡。这与 Wang 等<sup>[12]</sup>在胰岛  $\beta$  细胞中发现的 JunD 抗凋亡功能一致。此外,Ruiz 等<sup>[23]</sup>指出 JunD 在肺癌细胞中也参与凋亡与增殖的调控。这些研究提示 JunD 在调节细胞凋亡方面具有普遍的保守性,可能通过调控转录靶基因或影响氧化还原稳态,参与肌肉发育早期的细胞凋亡程序调控。综上所述,JunD 基因在抑制牦牛成肌细胞凋亡方面发挥了关键作用,对牦牛肌肉发育具有重要意义,为牦牛肌肉发育的深入研究提供了重要参考。

综上所述,本研究通过对牦牛 JunD 基因的生物信息学分析,发现牦牛 JunD 属于不稳定亲水性蛋白,无跨膜螺旋结构,不含信号肽,主要定位在细胞核中。此外,JunD 具有多个磷酸化位点,这些位点可能参与调控细胞增殖与分化。干扰 JunD 基因可促进成肌细胞的凋亡,而过表达 JunD 基因后则抑制了成肌细胞的凋亡。本研究结果为阐明 JunD 在肌肉生长发育中发挥的功能提供理论依据,同时也为高原家畜肌肉性状的遗传改良提供了潜在靶点。

## 参考文献:

- [1] 钟金城,王会,柴志欣,等.牦牛种质资源挖掘与创新利用[J].中国畜禽种业,2022,18(10):22-29.
- [2] 施红梅,何洋,杜彦丽,等.畜禽骨骼肌纤维特性及其发育机制研究进展[J].中国畜牧兽医,2021,48(9):3191-3199.
- [3] ENDO T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion [J]. Bone, 2015, 80: 2-13.
- [4] 聂庆华,徐海平,张敏.非编码 RNAs 调控家禽骨骼肌生长发育的表观遗传机制研究进展[J].华南农业大学学报,2019,40(5):111-118.
- [5] SHI H, HE Y, LI X, et al. Regulation of non-coding RNA in the growth and development of skeletal muscle in domestic chickens [J]. Genes, 2022, 13(6): 1033.
- [6] DE ALMEIDA SANTANA M H, JUNIOR G A O, CESAR A S M, et al. Copy number variations and genome-wide associations reveal putative genes and metabolic pathways involved with the feed conversion ratio in beef cattle [J]. J Appl Genet, 2016, 57(4): 495-504.
- [7] LEI S, CAO W, ZENG Z, et al. JUND/linc00976 promotes cholangiocarcinoma progression and metastasis, inhibits ferroptosis by regulating the miR-3202/GPX4 axis [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(11): 967.
- [8] COSTANTINO S, AKHMEDOV A, MELINA G, et al. Obesity-induced activation of JunD promotes myocardial lipid accumulation and metabolic cardiomyopathy [J]. Eur Heart J, 2019, 40(12): 997-1008.
- [9] YAZGAN O, PFARR C M. Differential binding of the Menin tumor suppressor protein to JunD isoforms [J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 916-920.
- [10] PERFIELD J W 2nd, LEE Y, SHULMAN G I, et al. Tumor progression locus 2 (TPL2) regulates obesity-associated inflammation and insulin resistance [J]. Diabetes, 2011, 60(4): 1168-1176.
- [11] PANENI F, OSTO E, COSTANTINO S, et al. Deletion of the activated protein-1 transcription factor JunD induces oxidative stress and accelerates age-related endothelial dysfunction [J]. Circulation, 2013, 127(11): 1229-1240, e1-21.
- [12] WANG K, CUI Y, LIN P, et al. JunD regulates pancreatic  $\beta$ -cells function by altering lipid accumulation [J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 689845.
- [13] LEE S, DONG H H. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism [J]. J Endocrinol, 2017, 233(2): R67-R79.
- [14] 贺喜,宋泽和,常凌.肉鸡肌纤维性状形成机制及调控的研究进展[J].动物营养学报,2022,34(10):6298-6305.
- [15] PENG Y, CHEN Y, CHEN S, et al. JUND-dependent up-regulation of HMOX1 is associated with cisplatin resistance in muscle-invasive bladder cancer [J]. J Biochem, 2020, 168(1): 73-82.
- [16] HADJIARGYROU M. Mustn1: a developmentally regulated pan-musculoskeletal cell marker and regulatory gene [J]. Int J Mol Sci,

2018, 19 (1): 206.

[17] 杨德青. 转录因子 JunD 调控香烟诱导慢阻肺气道炎症和氧化应激的作用与机制研究 [D]. 成都: 四川大学, 2021.

[18] 谷大海. 基于大围山微型鸡-白洛克肉鸡 F<sub>2</sub> 资源群体的肌肉代谢物沉积分子机理研究 [D]. 昆明: 云南农业大学, 2024.

[19] 罗培. 转录因子 JunB 调控肌细胞蛋白质合成机制的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.

[20] 镐影雪. ATF3 抑制成肌细胞 C2C12 的增殖与分化 [D]. 苏州: 苏州大学, 2023.

[21] 祝淋慧. miR-501-3p 靶向 FOS 调控 C2C12 细胞增殖分化及机理初探 [D]. 广州: 华南农业大学, 2019.

[22] 陈亦民, 穆盼盼, 段苗苗, 等. 基于 MAPK 信号通路探究推拿对骨骼肌过劳性损伤大鼠的影响研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47 (12): 1769-1776.

[23] RUIZ E J, LAN L, DIEFENBACHER M E, et al. JunD, not c-Jun, is the AP-1 transcription factor required for Ras-induced lung cancer [J]. JCI Insight, 2021, 6 (13): e124985.

· 信息 ·

