

Atf4b 对斑马鱼三羧酸循环代谢和胚胎早期发育的调控作用*

夏伟意, 王 旋, 周慧慧, 麦康森, 何 艮, 刘成栋**

(海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003)

摘 要: 激活转录因子 4(Activating transcription factor 4, ATF4)是参与机体应激调控的重要转录因子,对细胞代谢有关键调控作用。斑马鱼基因组包含 *atf4a* 和 *atf4b* 两个亚型,目前已有关于 *Atf4a* 功能的研究报道,而 *Atf4b* 的功能尚未明确。通过序列比对,本文发现斑马鱼 *Atf4b* 的序列仅在亮氨酸拉链结构域和 DNA 结合结构域与哺乳动物 ATF4 序列保持相对一致。为探究 *Atf4b* 对斑马鱼生长发育及代谢功能的影响,作者通过 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼 *atf4b* 基因敲除品系。形态学研究表明,*atf4b* 基因敲除(*atf4b*^{-/-})胚胎无明显畸形,但显著减少斑马鱼胚胎体长。代谢组学分析发现,突变体的三羧酸循环中柠檬酸含量升高,而下游代谢物(α -酮戊二酸、苹果酸、琥珀酸)减少,ATP 生成显著降低。*Atf4b* 的缺失造成线粒体损伤,并且显著降低酸胁迫下的存活率。本研究证实 *Atf4b* 在斑马鱼生长发育及能量代谢过程中发挥重要作用,研究结果为深入研究斑马鱼的发育、代谢和应激调控耦合机制提供了新视角。

关键词: 激活转录因子 4b; 三羧酸循环; 斑马鱼; CRISPR/Cas9

中图法分类号: Q95

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2026)07-043-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20250133

引用格式: 夏伟意,王旋,周慧慧,等. *Atf4b* 对斑马鱼三羧酸循环代谢和胚胎早期发育的调控作用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2026, 56(7): 43-52.

Xia Weiyi, Wang Xuan, Zhou Huihui, et al. *Atf4b* regulates tricarboxylic acid cycle and early embryonic development in zebrafish[J]. Periodical of Ocean University of China, 2026, 56(7): 43-52.

激活转录因子 4(Activating transcription factor 4, ATF4)是一个重要的转录因子,属于 ATF/CREB 家族。ATF4 被认为是激活综合应激反应(Integrated stress response, ISR)信号通路的关键蛋白。ISR 信号通路是真核生物在应对一系列生理变化和不同的病理条件时,被激活的一种高度协调的细胞应激调节机制,其最终目的是恢复细胞稳态^[1]。ISR 信号通路通过整合多种胁迫信号(如氨基酸缺乏、氧化应激、低氧、内质网应激等^[2-6])引起 eIF2 α 的磷酸化。eIF2 α 是蛋白质翻译起始的重要调控蛋白,其磷酸化会抑制大部分 mRNA 的翻译,但一类应激相关的 mRNA 因其 5'-UTR 中含有上游开放阅读框而被启动翻译,进而调节代谢稳态和细胞存活,以适应环境变化并维持生理功能。其中,ATF4 是最主要的应激调控因子,能够调控大量参与氨基酸摄取或合成的基因的表达^[7],并有助于自噬、凋亡、生长等相关基因的表达^[8]。

ATF4 在应激反应中的表达不仅依赖于转录激活,

还涉及到转录后的翻译调控^[9-10]。ATF4 的表达不仅能够帮助细胞维持氨基酸的合成,例如通过调控天冬酰胺合成酶的表达维持氨基酸合成^[11];还可以通过调节与代谢相关的基因表达,帮助细胞适应营养不足的环境^[12]。同时研究表明^[13-15],内质网应激能够通过 ATF4 上调骨钙素、骨涎蛋白等成骨基因表达,促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化;而 ATF4 缺失则导致成骨分化受阻。在代谢层面,ATF4 通过调控氨基酸转运蛋白(如 SLC2A5、ALDOB^[16])及糖异生相关蛋白(如 PEPCK、G6Pase^[17])表达,维持细胞在营养匮乏条件下的代谢稳态。在胶质瘤中^[18],ATF4 依赖的果糖代谢通路为葡萄糖缺乏的肿瘤细胞提供替代能量来源,支持其恶性增殖。这些研究提示,ATF4 不仅是应激适应的关键因子,也是代谢需求与生长发育的重要桥梁。

三羧酸(Tricarboxylic acid, TCA)循环作为细胞能量代谢枢纽,通过氧化乙酰辅酶 A 生成 ATP、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(32002365);国家现代农业产业技术体系项目(CARS-47-G10)资助

Supported by the National Natural Science Foundation of China(32002365); the China Agriculture Research System(CARS-47-G10)

收稿日期:2025-04-14; 修订日期:2025-12-26

作者简介:夏伟意(1999—),男,硕士生,研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: 804114256@qq.com

** 通信作者:刘成栋,男,博士,副教授。E-mail: liuchengdong@ouc.edu.cn

NADH 及 FADH_2 , 同时为氨基酸、脂肪酸合成提供碳骨架。TCA 循环中间产物(如 α -酮戊二酸、琥珀酰辅酶 A)参与血红素、嘌呤等生物大分子合成,其稳态对细胞生长至关重要。在胚胎发育阶段,TCA 循环为细胞分裂、分化及器官形成提供能量和代谢中间产物。研究表明,BCKDK 蛋白通过磷酸化丙酮酸脱氢酶复合体的活性,从而影响 TCA 循环的功能,确保细胞代谢平衡,使得小鼠胚胎在 PDK 家族缺失条件下能正常发育。这一机制揭示了 TCA 循环对胚胎发育的不可替代性^[19]。同时,TCA 循环功能障碍可能导致严重发育缺陷,氧化磷酸化障碍,导致神经管闭合不全、骨骼畸形及多器官功能衰竭^[20-23]。

在过去的研究中,已经广泛使用 ATF4 敲除模型进行 ATF4 的体内功能的研究。例如小鼠肝脏 ATF4 的缺失导致氧化应激增加、胆固醇稳态破坏和细胞死亡率升高^[24]。ATF4 敲除还会增加能量消耗,减少脂肪生成^[25]。此外,ATF4 的缺失能够保护小鼠,使其免于因高碳水化合物饮食诱发肝脏脂肪堆积、葡萄糖不耐受和胰岛素抵抗^[26]。ATF4 的敲除引起小鼠早期发育严重贫血和肝脏受损^[27]。斑马鱼由于基因组加倍事件导致存在 *atf4a* 和 *atf4b* 两个亚型,目前已发现过表达 *atf4a* 引起脂代谢失调导致肝脏变性^[28],Atf4a 蛋白也参与到内质网应激和线粒体应激中^[29-30],但斑马鱼 Atf4b 蛋白的功能报道较少。因此,本研究利用成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9) 的基因编辑技术构建了斑马鱼 Atf4b 敲除品系,初步分析了 Atf4b 缺失对斑马鱼生长发育及代谢功能的影响,为在体内揭示 Atf4b 介导的生长发育与代谢调控机制提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的野生型 Tübingen 品系斑马鱼购自国家斑马鱼资源中心。所有斑马鱼饲养于 28 °C 恒温循环水系统中,每天的光周期保持为 14 h 的光照和 10 h 的黑暗,每天 9:00 和 17:00 各饲喂 1 次新鲜孵育的卤虫,实验所需的斑马鱼胚胎是通过亲鱼的自然产卵获得,受精卵收集后置于胚胎培养液 (Embryo rearing solution, ERS, 含 5 mmol/L NaCl、0.33 mmol/L MgSO_4 、0.33 mmol/L CaCl_2 、0.17 mmol/L KCl, pH=7.2) 中,并放置于 28.5 °C 培养箱内发育。实验所用动物的使用均遵循中国海洋大学动物保护与使用委员会制定的伦理准则。

1.2 突变体斑马鱼的筛选和测序

参考文献[31]方法,本实验中的 *atf4b*^{-/-} 斑马鱼

由课题组成员通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对野生型斑马鱼 *atf4b* 基因进行编辑并获得 F₀ 代,将 F₀ 代与野生型一一配对进行繁殖从而筛选得到杂合的 F₁ 代,随后对 F₁ 代进行配对、筛选和测序,从而对可能存在的三种基因型(野生型、基因敲除纯合体、杂合体)斑马鱼进行筛选,保证后续用鱼遗传背景清晰。最终获得了一个突变品系,相比野生型其 *atf4b* 等位基因缺失 20 个碱基(*atf4b* ^{$\Delta 20/\Delta 20$})。

1.3 序列分析

使用 ClustalW 软件对人 ATF4、小鼠 ATF4 和斑马鱼 Atf4a、Atf4b 的氨基酸序列进行比对,得到这四者的氨基酸序列的对齐情况。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)

本研究取受精后 72 h (Hours post-fertilization, hpf) 的野生型和 *atf4b* ^{$\Delta 20/\Delta 20$} 的斑马鱼幼鱼,使用 RNAeasyTM 动物 RNA 提取试剂盒(碧云天, CAS No.: R0027)提取斑马鱼胚胎总 RNA, M-MLV 逆转录酶(Takara, CAS No.: 2641A)合成 cDNA。以 TB Green Premix Taq(Takara, CAS No.: RR420A)为反应试剂,于 CFX96TM 实时定量系统(Bio-Rad, USA)进行扩增。定量数据采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法进行分析。以 β -actin 的 mRNA 水平作为内参基因,计算各基因的相对表达量。

atf4b 引物序列如下:F:GGTGTCTCTGCCCTGGTTAC;R:ACAAAAACAATGCGGGTCGG。 β -actin 引物序列如下:F:GATGGTCCAGACTCATCGTACTC;R:ATTGCTGACAGGATGCAGAAG。*aco1* 引物序列如下:F:TCTTAAAGATGGTGACTGGATTGA;R:GCACACTCTTATACTTCCCGTTG。*aco2* 引物序列如下:F:CGTCATCATGGTTTCGTCCA;R:CCACCTCCAAACACCATGAGAT。*slc13a5a* 引物序列如下:F:CTGAGAGCCCCGGTGGTACT;R:TACACACGCACAGGGTCAG。

1.5 斑马鱼幼鱼的体长记录

本研究收取 24、48 和 72 hpf 的野生型(Wild type, wt)和 *atf4b* ^{$\Delta 20/\Delta 20$} 斑马鱼幼鱼在体式镜下进行拍照,其中,24 hpf 斑马鱼在拍照前使用 1×Pronase 溶液对其进行浸泡处理 15 min,从而剥除卵膜。实验所需斑马鱼放置于 3% 甲基纤维素凝胶状液体上,使用针头将幼鱼摆正位置后进行拍摄,拍摄获得的照片使用 Fiji 软件对两组斑马鱼幼鱼体长进行测量、比较。体长的定义如下:从胚胎前端开始沿眼睛中心、内耳中心、躯干中心至尾部的曲线长度。

1.6 代谢组学分析

收集 30 枚斑马鱼胚胎,加入 200 μL 含内标(C^{13} -葡萄糖)的甲醇:乙腈:水=2:2:1(体积比)混合提

取液,于 4 °C 条件下进行磨样均质化处理,随后超声处理 30 min(4 °C)。样本在 -20 °C 静置 2 h 完成蛋白沉淀后,于 4 °C 条件下以 14 500g 离心 15 min,收集的上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后,进行 LC-MS/MS 检测。沉淀组分经 SDT 裂解液(4% SDS,100 mmol/L Tris-HCl,pH=7.6)重悬并均质化处理,采用 BCA 法(碧云天,CAS No.: P0009)进行蛋白质定量分析。应用 SCIEX OS 软件进行色谱峰识别与积分分析,应用 MetaboAnalyst 6.0 软件分析数据,代谢物相对丰度以峰面积与总蛋白浓度比值进行归一化处理。

1.7 线粒体 DNA 拷贝数测定

收集 20 枚斑马鱼胚胎,使用含 100 μ g/mL 蛋白酶 K 的 SZL 缓冲液(50 mmol/L KCl,2.5 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L Tris(pH=8.3),0.45% NP40,0.45% Tween-20)进行消化(60 °C 孵育 2 h,随后 95 °C 处理 15 min)。随后,将样本涡旋振荡,并在 4 °C 条件下以 16 000g 离心 10 min。提取的 DNA 浓度被调整至 200 ng/ μ L,并作为 PCR 模板。采用实时荧光定量 PCR 方法对 DNA 进行定量分析。相对线粒体 DNA(mtDNA)水平的计算方法与 mRNA 相对表达水平的计算方法一致。线粒体 DNA 标志引物序列如下:F:CAAACACAAGCCTCGCCTGTTTAC;R:CACTGACTTGATGGGGGAGACAGT。细胞核标志引物序列如下:F:ATGGGCTGGGCGATAAAATTGG;R:AC-ATGTGCATGTCGCTCCCAA。

1.8 酸度胁迫实验

将 24 hpf 的斑马鱼胚胎放置于 12 孔板中,加入使用 HCl 或 NaOH 调整 pH 到 3.5 的胚胎培养液,培养至 96 hpf。在此期间,每天更换新鲜配制的胁迫培养液。每个处理设 10 个胚胎、3 个重复,每 12 h 记录斑马鱼生存率。

1.9 统计分析

所有相关实验至少重复 3 次。数据以均值 $\pm$ 标准误差(Mean $\pm$ SEM)表示,组间比较采用 Tukey 多重检验和 Log-rank 检验方式,应用 GraphPad Prism 8 软件分析数据, $P<0.05$ 被视为具有统计学意义。

2 结果

2.1 斑马鱼 *atf4a* 和 *atf4b* 基因的序列特征

斑马鱼 *atf4a* 和 *atf4b* 基因中编码蛋白质的 DNA 序列(Coding DNA sequence, CDS)的长度分别为 1 019 和 1 277 bp,编码 339 个和 425 个氨基酸组成的蛋白质。为评估斑马鱼 Atf4a、Atf4b 和人、小鼠的 ATF4 的相似性,我们使用 ClustalW 软件对其氨基酸序列进行全局比对,发现斑马鱼 Atf4a 和 Atf4b 序列的比对总得分为 49;和人 ATF4 序列的比对总得分为

35;和鼠 ATF4 序列的比对总得分为 31。斑马鱼 Atf4b 序列和人 ATF4 序列的比对总得分为 28;和鼠 ATF4 序列的比对总得分为 28。人 ATF4 序列和鼠 ATF4 序列的比对总得分为 86(见图 1A、B)。在结构域保守性中,N 端结构域、氧依赖性降解结构域、 β -TrCP 识别元件保守性较差,但 DNA 结合结构域和亮氨酸拉链结构域保守性较高。

2.2 *atf4b* 基因敲除的斑马鱼品系的构建

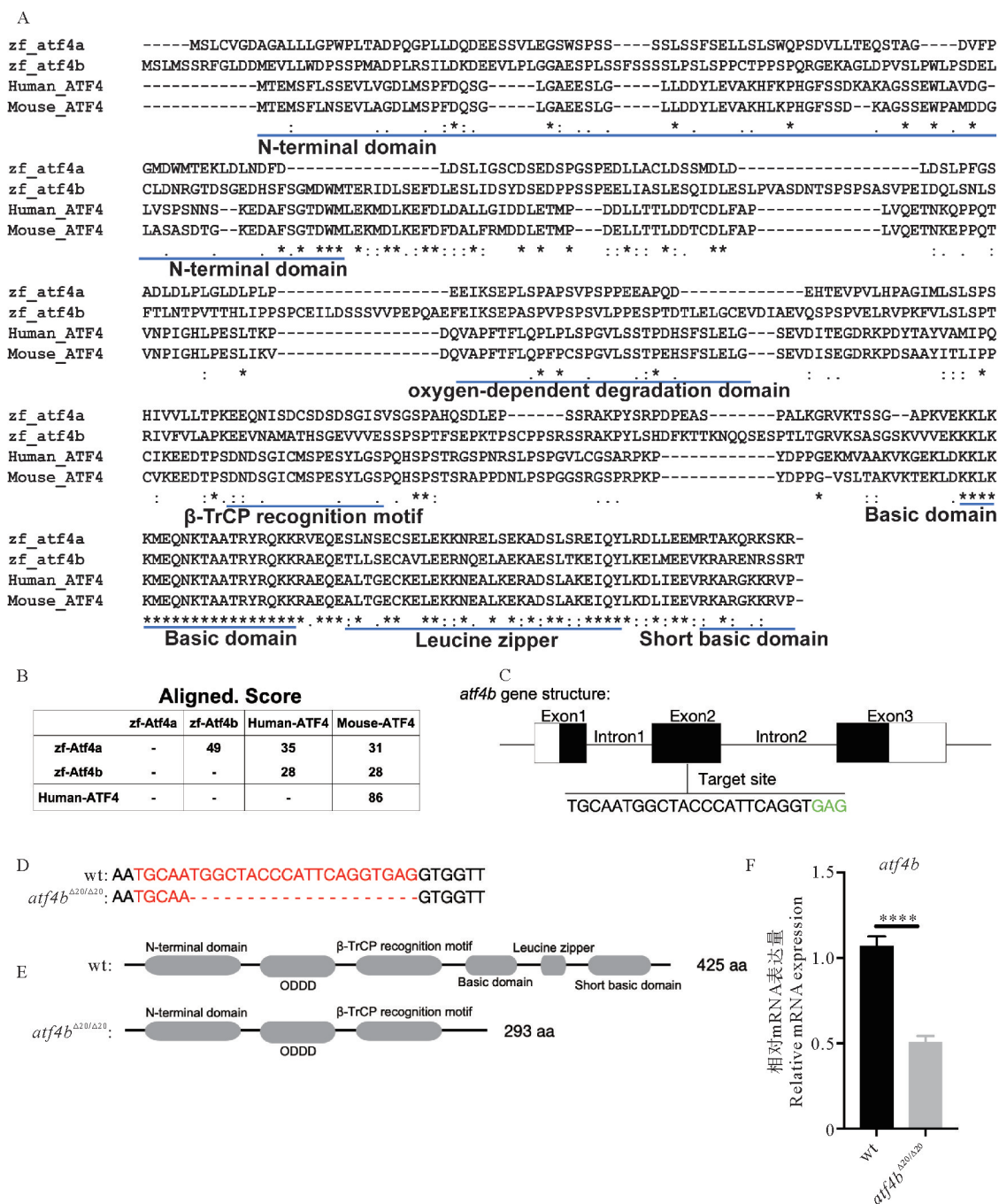
根据 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,本研究针对斑马鱼 *atf4b* 基因的第二个外显子设计并筛选出特异性 sgRNA 靶序列 5'-TGCAATGGCTACCCATTCAG-GTGAG-3'(见图 1C),并由此成功构建了缺失 20 个碱基的 *atf4b* 纯合突变体斑马鱼模型(*atf4b* ^{Δ 20/ Δ 20})。通过 SnapGene 软件分析突变体的 *atf4b* 基因的碱基序列,发现由于突变体的 *atf4b* 基因缺失了 20 个碱基,因此造成了终止密码子的提前出现(见图 1D),进而使 *atf4b* 突变品系只表达 293 个氨基酸的多肽,少于野生型的 425 个氨基酸(见图 1E)。CRISPR-Cas9 基因编辑引起的移码突变常引起 RNA 降解^[32],通过分析野生型和突变体斑马鱼中 *atf4b* 的 mRNA 水平发现,突变体斑马鱼的 *atf4b* 的 mRNA 表达水平显著低于野生型(见图 1F)。因此证明,通过 CRISPR/Cas9 介导的靶向基因编辑技术,成功建立了 *atf4b* 基因敲除的斑马鱼模型。

2.3 *atf4b* 基因敲除对斑马鱼早期发育的影响

利用 *atf4b* 基因敲除的斑马鱼品系,分析 *atf4b* 基因对斑马鱼早期发育的影响。发现 *atf4b* 突变体斑马鱼未表现出显著的身体畸形,但其体型小于野生型斑马鱼,因此选取 24、48 和 72 hpf 的野生型和 *atf4b* 突变体斑马鱼进行体长测定,结果发现突变体体长均显著短于野生型(见图 2A、B)。结果显示,*atf4b* 基因的敲除会影响斑马鱼生长发育进程,导致斑马鱼早期发育受阻。

2.4 *atf4b* 基因敲除对斑马鱼代谢功能的影响

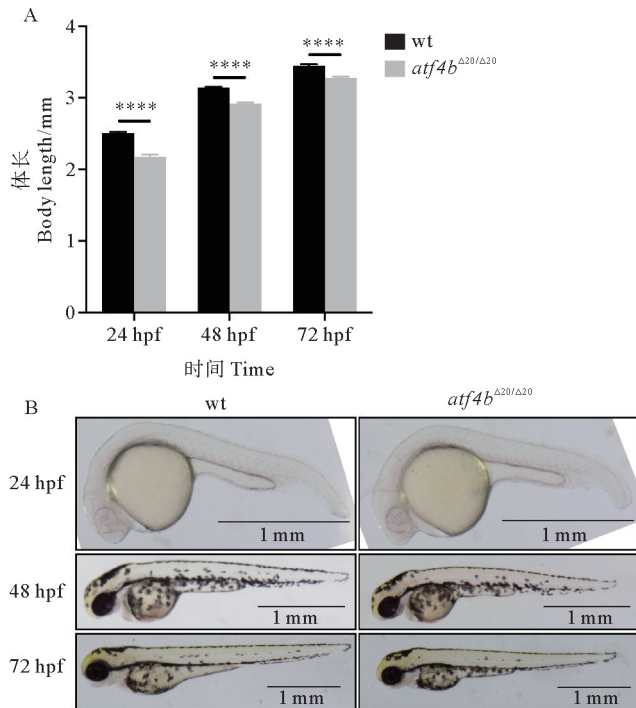
由于 ATF4 在代谢调控中发挥重要作用,故对野生型和 *atf4b* 突变体斑马鱼进行了代谢组学的分析,进而评估 *atf4b* 基因对斑马鱼代谢功能的影响。通过对 LC-MS/MS 系统得到的关键代谢物进行 PCA 分析,野生型组样品和 *atf4b* ^{Δ 20/ Δ 20} 组样品在图 3A 中明显分开,组间的置信椭圆几乎没有重叠,说明两组样品的关键代谢物含量水平存在显著差异。同时 PC1 和 PC2 的解释方差分别为 35.1% 和 20.9%,即这两个主成分共同解释了 56.0% 的数据变异,进一步表明了它们在 PCA 空间中存在显著性差异(见图 3A)。进而,对野生型与 *atf4b* ^{Δ 20/ Δ 20} 斑马鱼间的差异代谢物进行 KEGG 通路富集分析。结果显示,显著富集的通路包



(A. 斑马鱼 Atf4a、Atf4b 和人 ATF4、小鼠 ATF4 的氨基酸序列对比。下划线标注人 ATF4 的功能结构域。N-terminal domain: N 端结构域(1~85 aa), oxygen-dependent degradation domain: 氧依赖性降解结构域(154~183 aa), β-TrCP recognition motif: β-TrCP 识别元件(218~224 aa), Basic domain: 碱性结构域(280~299 aa), Leucine zipper: 亮氨酸拉链(305~333 aa), Short basic domain: 短碱性结构域(342~351 aa)。B. 斑马鱼 Atf4a、Atf4b 和人 ATF4、小鼠 ATF4 的氨基酸序列的匹配分值。C. 斑马鱼 *atf4b* 基因结构示意图及基因编辑靶点, Cas9 靶点序列在斑马鱼的第二外显子中。黑框: 开放阅读框(ORF), 白框: 非翻译区(UTR)。PAM 序列以绿色标注; D. 野生型和 $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ 斑马鱼的 *atf4b* 基因碱基序列, 红色标记为靶向序列。E. 野生型和 $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ 斑马鱼的 Atf4b 蛋白序列; F. 野生型和 $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ 斑马鱼的 *atf4b* mRNA 表达水平。数值以平均值±标准差表示, 每个实验均为 3 次重复, 每次重复每组处理使用 20 尾幼鱼。***: $P < 0.0001$ 。A. Alignment of amino acid sequences of zebrafish Atf4a, Atf4b, human ATF4, and murine ATF4 structure. The functional domains of human ATF4 are underlined. N-terminal domain: 1~85 aa, oxygen-dependent degradation domain: 154~183 aa, β-TrCP recognition motif: 218~224 aa, Basic domain: 280~299 aa, Leucine zipper: 305~333 aa, Short basic domain: 342~351 aa. B. The aligned score of zebrafish Atf4a, Atf4b, human ATF4, and murine ATF4 structure. C. Schematic diagram of the zebrafish *atf4b* gene structure and gene editing target sites. The Cas9 target sequence is located in the second exon of the zebrafish. Black boxes represent the open reading frame (ORF), and white boxes represent the untranslated regions (UTRs). The PAM sequence is highlighted in green. D. Nucleotide base sequences of the *atf4b* gene in wt and $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ zebrafish. The red word is the target site. E. The predicted Atf4b protein domains in wt and $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ zebrafish. F. Relative expression levels of *atf4b* mRNA in wt and $atf4b^{\Delta 20/\Delta 20}$ zebrafish. Data shown are mean±SEM, each experiment was performed in triplicate, with 20 larvae per treatment group in each replication. ***: $P < 0.0001$.)

图 1 利用 CRISPR/Cas9 技术对斑马鱼 *atf4b* 基因的敲除

Fig. 1 The knockout of the zebrafish *atf4b* gene using CRISPR/Cas9 technology



(A. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼在 24、48 和 72 hpf 的体长。B. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼在 24、48 和 72 hpf 的侧视图。数值以平均值±标准差表示, 每个实验均为 3 次重复, 每次重复每组使用 15 尾幼鱼。****: $P < 0.0001$ 。A. Body length of wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} at 24, 48 and 72 hpf. B. The profile view of wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} at 24, 48 and 72 hpf. Data shown are mean±SEM, each experiment was performed in triplicate, with 15 larvae per treatment group in each replication. ****: $P < 0.0001$.)

图 2 敲除 *atf4b* 基因对斑马鱼早期发育的影响

Fig. 2 The effects of *atf4b* knockout on the early development of zebrafish

括“三羧酸循环”、“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路”、“乙醛酸和二羧酸代谢通路”、“磷酸戊糖途径”、“丙酮酸代谢通路”、“嘌呤代谢通路”和“丁酸代

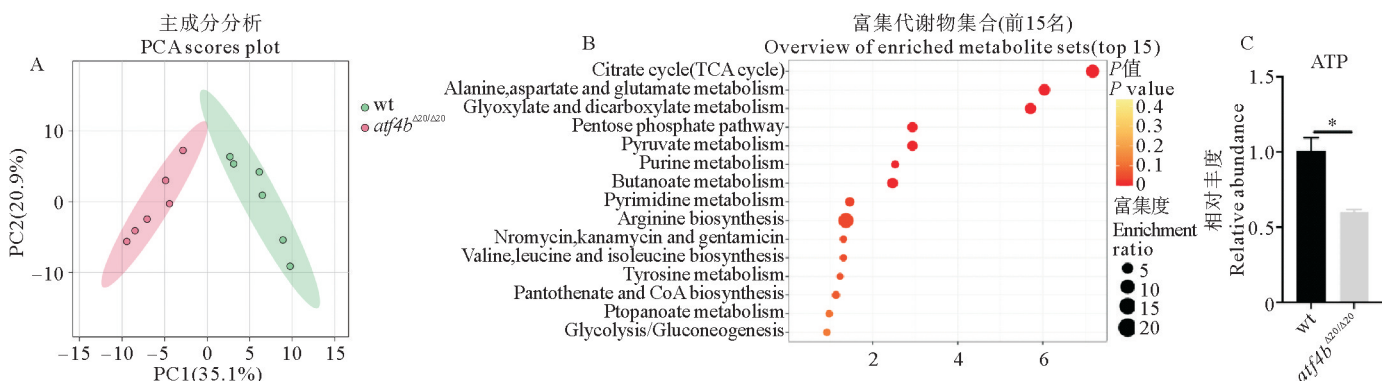
谢通路”(见图 3B)。这些结果提示 *atf4b* 突变体能量代谢可能存在缺陷。对此, 检测了 ATP 水平, 发现突变体中 ATP 含量显著低于野生型(见图 3C)。

2.5 *atf4b* 基因敲除对斑马鱼三羧酸循环代谢的影响

atf4b^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的差异代谢物被显著富集于三羧酸循环及其相关代谢通路中, 由此对三羧酸循环中的关键代谢物进行了靶向分析, 这些代谢物包括柠檬酸、异柠檬酸、丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酸、苹果酸和草酰乙酸。结果发现, *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼中的柠檬酸相对含量显著高于野生型, 其余 6 种中间产物均显著低于野生型斑马鱼(见图 4A—G)。*atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的顺乌头酸合酶基因 *aco1*、*aco2* 和柠檬酸转运通道蛋白基因 *slc13a5a* 的相对表达量也显著低于野生型(见图 4H—J)。这些结果表明, 三羧酸循环代谢通路受阻, 导致柠檬酸异常积累。

2.6 *atf4b* 基因敲除对斑马鱼线粒体稳态和酸胁迫耐受性的影响

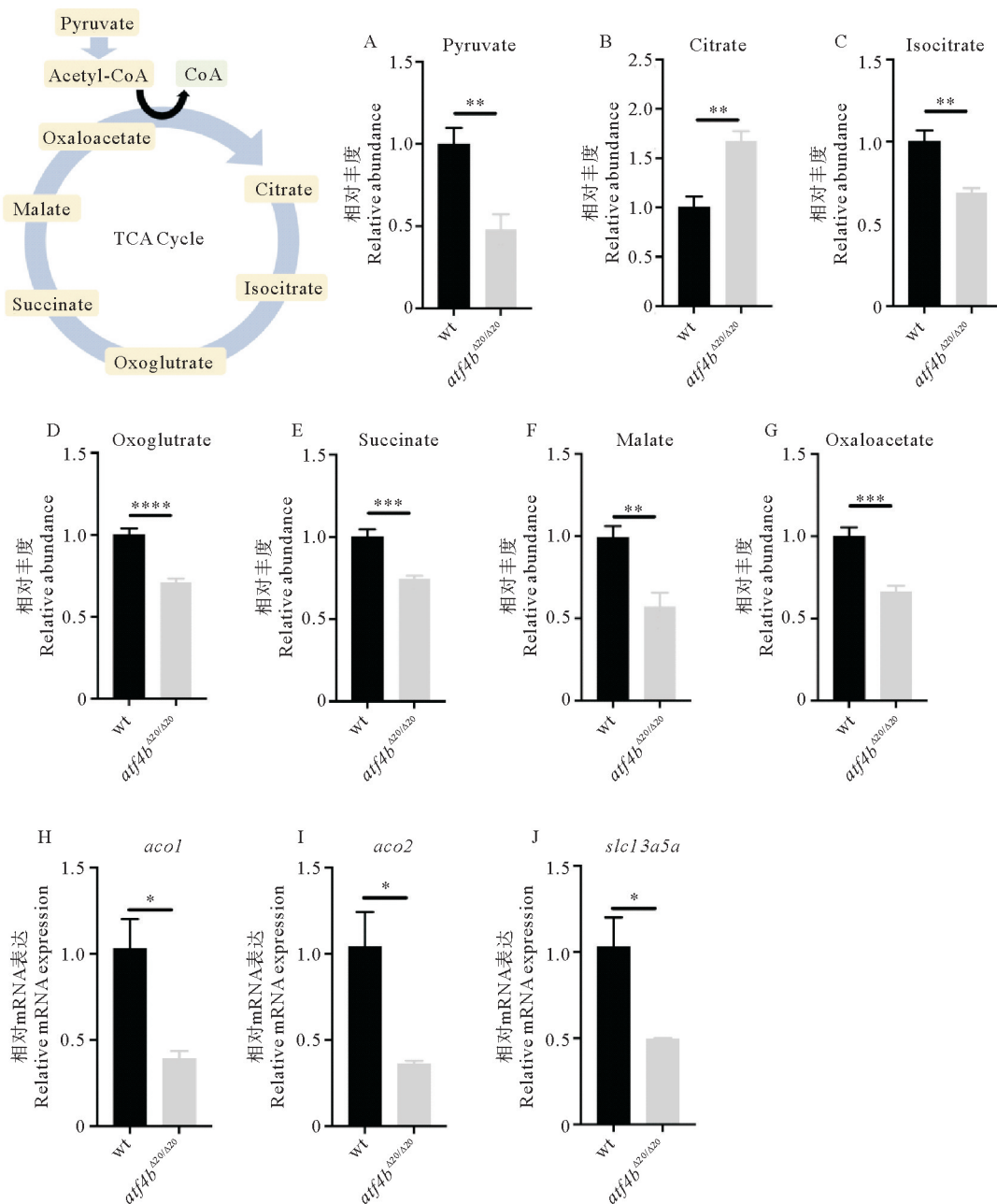
鉴于线粒体是三羧酸循环的关键场所, 推测 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的线粒体稳态可能失衡。为验证此推测, 对野生型和 *atf4b* 突变体斑马鱼进行了线粒体 DNA 水平检测, 发现 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的线粒体 DNA 水平显著高于野生型斑马鱼(见图 5A)。由于 *atf4b* 突变体的能量代谢功能受损, 而充足的能量供应是应对胁迫的关键, 因此推测其胁迫耐受能力可能降低。水质的酸化(包括淡水因酸雨及环境引起的酸化和海洋酸化现象)严重影响了水生动物的健康, 为探究野生型和突变体的酸度耐受能力的差异, 进行了酸度胁迫存活实验, 结果表明, *atf4b* 突变体在酸环境下的存活率显著低于野生型组($P = 0.0489$)(见图 5B)。



(A. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的主成分分析。绿色: 野生型, 红色: *atf4b*^{Δ20/Δ20}。B. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼关键代谢物的代谢通路富集图。C. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼 ATP 的相对含量。数值以标准值±标准差表示, 每个实验均为 3 次重复, 每次重复每组使用 20 尾幼鱼。*: $P < 0.05$ 。A. Principal component analysis (PCA) of wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. Green: wt, Red: *atf4b*^{Δ20/Δ20}. B. KEGG pathway enrichment analysis of differentially abundant metabolites in wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. C. Relative abundance of ATP in wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. Data shown are mean±SEM, each experiment was performed in triplicate, with 20 larvae per treatment group in each replication. *: $P < 0.05$.)

图 3 敲除 *atf4b* 基因对斑马鱼代谢功能的影响

Fig. 3 The effects of *atf4b* gene knockout on metabolic function in zebrafish



(A—G. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼三羧酸循环关键代谢产物的相对含量,分别为丙酮酸、柠檬酸、异柠檬酸、α-酮戊二酸、琥珀酸、苹果酸和草酰乙酸。H—J. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼的 *aco1*, *aco2* 和 *slc13a5a* 基因的 mRNA 表达水平。数值以平均值±标准差表示,每个实验均为 3 次重复,每次重复每组使用 20 尾幼鱼。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$ 。A—G. Relative abundance of key TCA cycle metabolites, including pyruvate; citrate; isocitrate; oxoglutarate; succinate; malate and oxaloacetate in wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. H—J. Relative expression levels of *aco1*, *aco2* and *slc13a5a* mRNA in wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. Data shown are mean±SEM, each experiment was performed in triplicate, with 20 larvae per treatment group in each replication. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.)

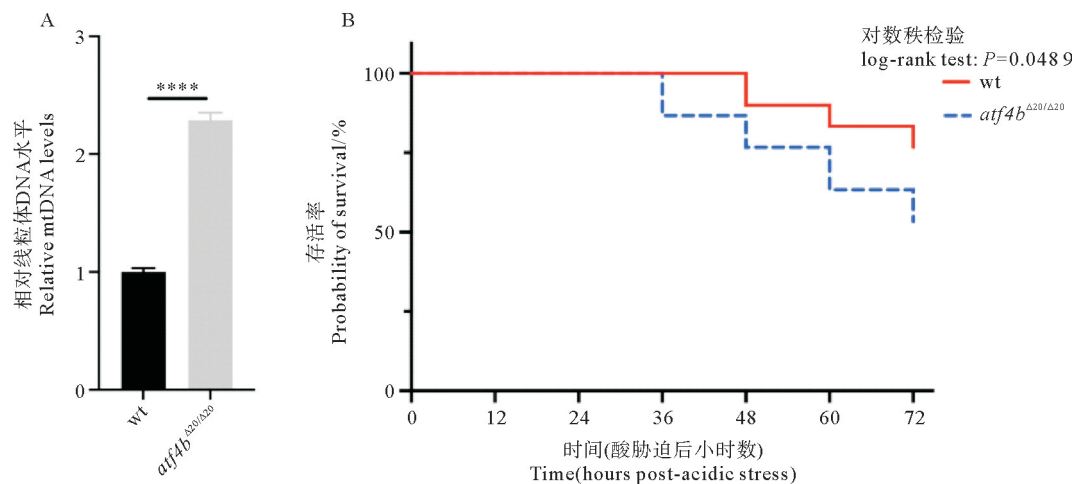
图 4 敲除 *atf4b* 基因对斑马鱼三羧酸循环功能的影响

Fig. 4 The effect of *atf4b* gene knockout on the function of the tricarboxylic acid (TCA) cycle in zebrafish

3 分析与讨论

ATF4 作为综合应激反应信号通路中的核心转录因子,通过调控代谢重编程、蛋白质合成和氧化还原平衡,广泛参与细胞增殖、骨骼发育、眼睛发育和造血过程^[33],在生物生长发育过程中发挥着关键作用。本研究构建了 *atf4b* 基因敲除的斑马鱼模型,通过研究

atf4b 的敲除对斑马鱼发育和代谢功能的影响,揭示了 Atf4b 在斑马鱼早期生长发育及能量代谢中发挥关键作用。我们构建的 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 突变体所编码的蛋白,其氨基酸序列与人类 ATF4 相比,仅保留了 3 个保守结构域,分别为 N 端结构域、氧依赖性降解结构域和 β-TrCP 识别元件。但缺失了碱性亮氨酸拉链(Basic leucine zipper, bZIP)结构域部分。bZIP 结构域是



(A. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼线粒体 DNA 的相对水平。B. 野生型和 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 斑马鱼在 pH=3.5 的酸度胁迫环境下的存活率。数值以平均值±标准差表示,每个实验均为 3 次重复,每次重复每组使用 20 尾幼鱼。****: $P < 0.0001$ 。A. Relative mtDNA levels in wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish. B. Viability of wt and *atf4b*^{Δ20/Δ20} zebrafish under acidic stress conditions (pH=3.5). Data shown are mean±SEM, each experiment was performed in triplicate, with 20 larvae per treatment group in each replication. ****: $P < 0.0001$.)

图 5 敲除 *atf4b* 基因对斑马鱼的线粒体稳态及酸胁迫耐受性的影响

Fig. 5 The effect of *atf4b* gene knockout on mitochondrial homeostasis and acid stress tolerance in zebrafish

ATF4 的核心功能区域,其通过 DNA 结合、二聚体形成及转录调控等机制,在细胞应激响应、代谢调节及疾病发生中发挥关键作用。在过去的研究发现 bZIP 结构域通过亮氨酸拉链与 PHD1/PHD3 蛋白结合,形成复合物以稳定 ATF4 蛋白^[34]。同时 ATF4 的 bZIP 结构域通过异源二聚化(如与 HIF-1 α 结合)调控缺氧响应基因,从而形成细胞应激反应的核心调控网络^[35],因此 bZIP 结构域的缺失会导致功能丧失,进而影响细胞在应激条件下的适应和存活。此外,由于突变体蛋白仍保留了蛋白结合结构域,我们无法排除 Atf4b 突变体蛋白是否会影响其他结合蛋白的功能,这需要进行进一步的研究。我们发现 Atf4b 的缺失会导致突变体斑马鱼在其早期生长发育中均显著慢于野生型,在过去的报道中,Margaret 等^[36]曾经对小鼠胚胎成纤维细胞和人类癌细胞系进行了相关研究,发现 ATF4 是 mTORC1 的代谢效应器,会参与到 IGF-mTOR 信号通路的促进蛋白质合成。同时,ATF4 的敲除使得 mTORC1 介导的 SLC7A11 表达量下降,从而导致小鼠胚胎成纤维细胞的半胱氨酸的摄取减少,进而影响细胞和机体的生长。因此,未来有必要对斑马鱼 Atf4b 与 mTORC1 信号通路的调控关系进行更深一步的研究。

我们发现 TCA 循环代谢失衡也是生长发育迟滞的驱动因素之一。TCA 循环作为细胞能量代谢与生物合成的核心枢纽,其通量直接影响胚胎发育的速率和效率。在 *atf4b*^{Δ20/Δ20} 突变体中,其线粒体 DNA 拷贝数显著上升,线粒体 DNA 拷贝数是线粒体功能的重要生物标志物^[37],其水平与能量代谢、氧化应激和线粒体膜电位的变化直接相关^[38]。据报道,内源性的基因突变

可能会导致线粒体 DNA 突变并损害线粒体 DNA 复制的调节,造成异常的线粒体 DNA 拷贝数,进而影响线粒体正常功能^[39],例如氧化磷酸化,线粒体活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生与消除,信号传导,细胞凋亡和细胞生长等生理机制^[40-41]。因此,*atf4b*^{Δ20/Δ20} 突变体的线粒体 DNA 拷贝数的异常升高,证明其线粒体可能存在损伤情况,进而阻碍 TCA 循环的正常进行,特别是柠檬酸的异常积累与下游代谢物(α -酮戊二酸、苹果酸、琥珀酸等)的同步减少,表明 Atf4b 的缺失会导致斑马鱼能量代谢流在柠檬酸节点发生阻滞。这一现象可能由线粒体柠檬酸转运受阻^[42]或顺乌头酸合酶活性被抑制^[43-44]引起的。因此,我们对柠檬酸转运蛋白基因 *slc13a5a* 和顺乌头酸合酶基因 *aco1* 和 *aco2* 进行了荧光定量分析,结果发现突变体的相对表达量均显著低于野生型。柠檬酸需通过线粒体内膜载体(如 SLC25A1^[45])或 Na⁺/柠檬酸共转运物(SLC13A5^[46])转运至胞质,参与脂肪酸合成或氧化分解。如果 TCA 循环转运效率降低,线粒体内柠檬酸堆积可能会通过反馈调节机制而导致柠檬酸合酶的生成受到抑制,进一步限制乙酰辅酶 A 的利用,形成代谢阻碍。同时柠檬酸转化为异柠檬酸需顺乌头酸合酶的催化,顺乌头酸合酶的表达量的下降会严重阻碍该流程^[47],这与我们的结果一致。近期研究表明,氧化应激或铁硫簇合成缺陷可抑制该酶活性^[48]。值得注意的是代谢流的阻滞会直接导致 TCA 循环的 ATP 生成减少和生物合成前体匮乏,并且我们在研究过程中证实了 *atf4b* 突变体的 ATP 水平显著低于野生型斑马鱼。TCA 循环的下游代谢物的减少会导致 NADH 和 FADH₂ 合成量不足,线粒体氧化磷酸化效率下降,无

法满足胚胎快速分裂的能量需求。并且 TCA 循环中的关键中间产物如 α -酮戊二酸和草酰乙酸是氨基酸(如谷氨酸、天冬氨酸)和核苷酸合成的关键前体。其水平降低可能限制蛋白质与核酸的生物合成,从而抑制细胞增殖,进而影响生物体的正常生长发育。在小鼠研究中发现,细胞缺氧处理后 IDH1 和 IDH2 的表达水平下降而导致 TCA 循环受到抑制,进而引起脂质合成功能受损,最终抑制了细胞生长和血管生成能力^[49],这与本文结果都证明了 TCA 循环对动物胚胎生长发育的重要性。

TCA 循环不仅为生长提供能量和原料,其代谢物还可作为信号分子直接调控发育相关通路。柠檬酸可通过激活 ATP-柠檬酸裂解酶生成乙酰辅酶 A^[50-51],乙酰辅酶 A 作为乙酰化供体修饰 mTORC1 复合体,对 mTORC1 活性进行正向调节,促进其激酶活性^[52]。本研究中柠檬酸的异常积累可能引发乙酰辅酶 A 的时空分布紊乱,进而导致 mTORC1 信号异常激活或抑制,从而干扰蛋白质合成与细胞周期进程。值得注意的是, Akt 作为 IGF-mTOR 通路的上游激酶,其活性受细胞内 ATP/ADP 比率调控^[53], TCA 循环功能损伤也会导致体内存在严重的能量应激,从而可能通过 AMPK 激活抑制 Akt 磷酸化^[54-55],进而影响生物的正常生长发育。

此外,本文发现 *atf4b* ^{$\Delta 20/\Delta 20$} 突变体在酸性胁迫条件下其存活率显著低于野生型。大量研究表明^[56-58],酸性胁迫是造成内质网应激的重要原因之一。酸性环境可以激活 PERK,进而磷酸化 eIF2 α ,上调 ATF4 的转录与翻译,以抑制全局蛋白翻译,维持细胞稳态,从而帮助肿瘤细胞适应酸性压力^[59-60]。同时,ATF4 也是线粒体胁迫的核心调控因子。酸性条件引发的线粒体损伤^[61]可激活 ATF4。鉴于线粒体是 ROS 的主要来源,ATF4 可通过上调 xCT、NRF2 等抗氧化基因的表达^[62],帮助细胞清除 ROS、维持氧化还原稳态,并调控相关代谢。因此 *Atf4b* 的缺失会导致突变体在酸度胁迫条件下,无法有效应对内质网应激和线粒体应激等,从而导致突变体死亡率升高。

4 结语

本研究以斑马鱼幼鱼为研究对象,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得了 *atf4b* 基因敲除的斑马鱼品系,探究了 *atf4b* 基因对斑马鱼生长发育和代谢功能的影响。初步阐明了斑马鱼 *Atf4b* 通过维持 TCA 循环代谢流平衡,从而在胚胎早期生长中发挥关键的作用。*Atf4b* 的缺失会造成斑马鱼线粒体损伤,从而导致三羧酸循环受阻,进而损伤斑马鱼正常生长发育功能,且显著降低酸胁迫下的存活率。本研究表明,*Atf4b* 在

斑马鱼生长发育及代谢功能方面发挥着重要作用,本研究为进一步研究斑马鱼的发育、代谢和应激调控机制提供了新视角。

参考文献:

- [1] Lu H J, Koju N, Sheng R. Mammalian integrated stress responses in stressed organelles and their functions[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2024, 45: 1095-1114.
- [2] Ameri K, Harris A L. Activating transcription factor 4[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008, 40: 14-21.
- [3] hang N, Zhang S, Dong X. Plant-derived bioactive compounds and their novel role in central nervous system disorder treatment via ATF4 targeting: A systematic literature review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116811.
- [4] Xiao Y, Xie X, Chen Z, et al. Advances in the roles of ATF4 in osteoporosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115864.
- [5] Li M, Tang S, Velkov T, et al. Copper exposure induces mitochondrial dysfunction and hepatotoxicity via the induction of oxidative stress and PERK/ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Environmental Pollution*, 2024, 352: 124145.
- [6] Takahashi M, Okamoto Y, Kato Y, et al. Activating mutations in EGFR and PI3K promote ATF4 induction for NSCLC cell survival during amino acid deprivation[J]. *Heliyon*, 2023, 9: e14799.
- [7] Kilberg M S, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2009, 20: 436-443.
- [8] B'Chir W, Maurin A C, Carraro V, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: 7683-7699.
- [9] Harding H P, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells[J]. *Molecular Cell*, 2000, 6: 1099-1108.
- [10] Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA[J]. *Nature*, 2002, 415: 92-96.
- [11] Jousse C, Deval C, Maurin A C, et al. TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282: 15851-15861.
- [12] Ye J, Kumanova M, Hart L S, et al. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29: 2082-2096.
- [13] Long F. Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 13: 27-38.
- [14] Salaroglio I C, Panada E, Moiso E, et al. PERK induces resistance to cell death elicited by endoplasmic reticulum stress and chemotherapy[J]. *Molecular Cancer*, 2017, 16: 91.
- [15] Jeon W J, Kim K M, Kim E J, et al. Costunolide increases osteoblast differentiation via ATF4-dependent HO-1 expression in C3H10T1/2 cells[J]. *Life Sciences*, 2017, 178: 94-99.
- [16] Chen D, Fan Z, Rauh M, et al. ATF4 promotes angiogenesis and

- neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner[J]. *Oncogene*, 2017, 36: 5593-5608.
- [17] Cui A, Ding D, Li Y. Regulation of hepatic metabolism and cell growth by the ATF/CREB family of transcription factors[J]. *Diabetes*, 2021, 70: 653-664.
- [18] Chen C, Zhang Z, Liu C, et al. ATF4-dependent fructolysis fuels growth of glioblastoma multiforme[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 6108.
- [19] Heinemann-Yerushalmi L, Bentovim L, Felsenthal N, et al. BCKDK regulates the TCA cycle through PDC in the absence of PDK family during embryonic development[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56: 1182-1194.
- [20] Kang W, Suzuki M, Saito T, et al. Emerging role of TCA cycle-related enzymes in human diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 313057.
- [21] Martínez-Reyes I, Chandel N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 102.
- [22] Martínez-Reyes I, Diebold L P, Kong H, et al. TCA cycle and mitochondrial membrane potential are necessary for diverse biological functions[J]. *Molecular Cell*, 2016, 61: 199-209.
- [23] Brière J J, Favier J, Gimenez-Roqueplo A P, et al. Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation[J]. *American Journal of Physiology*, 2006, 291: 1114-1120.
- [24] Fusakio M E, Willy J A, Wang Y, et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2016, 27: 1536-1551.
- [25] Wang C, Huang Z, Du Y, et al. ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis[J]. *Cell Research*, 2010, 20: 174-184.
- [26] Li H, Meng Q, Xiao F, et al. ATF4 deficiency protects mice from high-carbohydrate-diet-induced liver steatosis[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 438: 283-289.
- [27] Masuoka H C, Townes T M. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice[J]. *Blood*, 2002, 99: 736-745.
- [28] Yeh K Y, Lai C Y, Lin C Y, et al. ATF4 overexpression induces early onset of hyperlipidaemia and hepatic steatosis and enhances adipogenesis in zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16362.
- [29] Petel Légaré V, Rampal C J, Gurberg T J N, et al. Loss of mitochondrial Chchd10 or Chchd2 in zebrafish leads to an ALS-like phenotype and complex I deficiency independent of the mitochondrial integrated stress response[J]. *Developmental Neurobiology*, 2023, 83: 54-69.
- [30] Doll L, Welte K, Skokowa J, et al. A JAGN1-associated severe congenital neutropenia zebrafish model revealed an altered G-CSF-R signaling and UPR activation[J]. *Blood Advances*, 2024, 8: 4050-4065.
- [31] Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 227-229.
- [32] Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, et al. CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4056.
- [33] Zhang Q, Yu J, Liu B, et al. Central activating transcription factor 4 (ATF4) regulates hepatic insulin resistance in mice via S6K1 signaling and the vagus nerve[J]. *Diabetes*, 2013, 62: 2230-2239.
- [34] Hiwatashi Y, Kanno K, Takasaki C, et al. PHD1 interacts with ATF4 and negatively regulates its transcriptional activity without prolyl hydroxylation[J]. *Experimental Cell Research*, 2011, 317: 2789-2799.
- [35] Neill G, Masson G R. A stay of execution: ATF4 regulation and potential outcomes for the integrated stress response[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2023, 16: 1112253.
- [36] Torrence M E, MacArthur M R, Hosios A M, et al. The mTORC1-mediated activation of ATF4 promotes protein and glutathione synthesis downstream of growth signals[J]. *Elife*, 2021, 10: e63326.
- [37] Castellani C A, Longchamps R J, Sun J, et al. Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease[J]. *Mitochondrion*, 2020, 53: 214-223.
- [38] Guha M, Avadhani N G. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics[J]. *Mitochondrion*, 2013, 13: 577-591.
- [39] Abd Radzak S M, Mohd Khair S Z N, Ahmad F, et al. Insights regarding mitochondrial DNA copy number alterations in human cancer (Review)[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2022, 50: 104.
- [40] Hu L, Yao X, Shen Y. Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: evidence from an updated meta-analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35859.
- [41] Lee H, Lee J H, Kim D C, et al. Is mitochondrial DNA copy number associated with clinical characteristics and prognosis in gastric cancer? [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2015, 16: 87-90.
- [42] Palmieri F, Pierri C L. Mitochondrial metabolite transport[J]. *Essays in Biochemistry*, 2010, 47: 37-52.
- [43] Ternette N, Yang M, Laroyia M, et al. Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency[J]. *Cell Reports*, 2013, 3: 689-700.
- [44] Lushchak O V, Piroddi M, Galli F, et al. Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species[J]. *Redox Report*, 2014, 19: 8-15.
- [45] Fernandez H R, Gadre S M, Tan M, et al. The mitochondrial citrate carrier, SLC25A1, drives stemness and therapy resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25: 1239-1258.
- [46] Li Z, Wang H. Molecular mechanisms of the SLC13A5 gene transcription[J]. *Metabolites*, 2021, 11: 706.
- [47] Hallan S, Afkarian M, Zelnick L R, et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric acid (TCA) cycle in non-diabetic CKD patients[J]. *eBioMedicine*, 2017, 26: 68-77.
- [48] Volz K. The functional duality of iron regulatory protein 1[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, 18: 106-111.
- [49] He Q, Yu T, Chen J, et al. Enhancement of de novo lipogenesis by the IDH1 and IDH2-dependent reverse TCA cycle maintains

- the growth and angiogenic capacity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells under hypoxia[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2024, 213: 327-342.
- [50] Feng X, Zhang L, Xu S, et al. ATP-citrate lyase (ACLY) in lipid metabolism and atherosclerosis: An updated review[J]. *Progress in Lipid Research*, 2020, 77: 101006.
- [51] Verschueren K H G, Blanchet C, Felix J, et al. Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle[J]. *Nature*, 2019, 568: 571-575.
- [52] Son S M, Park S J, Lee H, et al. Leucine signals to mTORC1 via its metabolite acetyl-coenzyme A[J]. *Cell Metabolism*, 2019, 29: 192-201.
- [53] Lu S, Deng R, Jiang H, et al. The mechanism of ATP-Dependent allosteric protection of akt kinase phosphorylation[J]. *Structure*, 2015, 23: 1725-1734.
- [54] Cai Z, Li C F, Han F, et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK drives TCA cycle to promote cancer metastasis[J]. *Molecular Cell*, 2020, 80: 263-278.
- [55] Cai Z, Peng D, Lin H K. AMPK maintains TCA cycle through sequential phosphorylation of PDHA to promote tumor metastasis[J]. *Cell Stress*, 2020, 4: 273-277.
- [56] Tang X, Lucas J E, Chen J L, et al. Functional interaction between responses to lactic acidosis and hypoxia regulates genomic transcriptional outputs[J]. *Cancer Research*, 2012, 72: 491-502.
- [57] Johno H, Ogata R, Nakajima S, et al. Acidic stress-ER stress axis for blunted activation of NF- κ B in mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis fluid[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012, 27: 4053-4060.
- [58] Aoyama K, Burns D M, Suh S W, et al. Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2005, 25: 358-370.
- [59] Williams C H, Neitzel L R, Cornell J, et al. GPR68-ATF4 signaling is a novel prosurvival pathway in glioblastoma activated by acidic extracellular microenvironment[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2024, 13: 13.
- [60] McQuiston A, Diehl J A. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum[J]. *Fl000Research*, 2017, 6: 1897.
- [61] Khacho M, Tarabay M, Patten D, et al. Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3550.
- [62] Kreß J K C, Jessen C, Hufnagel A, et al. The integrated stress response effector ATF4 is an obligatory metabolic activator of NRF2[J]. *Cell Reports*, 2023, 42: 112724.

Atf4b Regulates Tricarboxylic Acid Cycle and Early Embryonic Development in Zebrafish

Xia Weiye, Wang Xuan, Zhou Huihui, Mai Kangsen, He Gen, Liu Chengdong
(Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: Activating transcription factor 4 (ATF4) is a critical transcription factor involved in stress response. It exerts essential regulatory effects on cellular metabolism. Zebrafish genome contains two ATF4 paralogs, *atf4a* and *atf4b*. The function of Atf4a has been documented previously while that of Atf4b remains elusive. To investigate the impact of Atf4b on zebrafish development and metabolism, we generated an *atf4b* knockout zebrafish using CRISPR/Cas9. Sequence alignment revealed that zebrafish Atf4b shares conserved domains only in the leucine zipper and DNA-binding regions with mammalian ATF4. Morphological examination showed no apparent deformities in *atf4b*^{-/-} embryos while body length was significantly reduced. Metabolomic profiling demonstrated the elevated citrate level accompanied by reduced downstream metabolites like oxoglutarate, malate and succinate in the tricarboxylic acid (TCA) cycle with a marked decrease in ATP production. Atf4b deficiency induced mitochondrial damage and significantly compromised survival under acidic stress conditions. These findings evidenced the crucial role of Atf4b in zebrafish growth, energy metabolism and stress adaptation, and provided novel insights into the integrated mechanism coupling developmental processes, metabolic homeostasis and stress response.

Key words: activating transcription factor 4b; tricarboxylic acid cycle; zebrafish; CRISPR/Cas9