

HARS2 基因突变致以耳聋为表现的 Perrault 综合征机制的研究

梁云红,陈曦,费静,余莉亚,廖娜,庄璐,杨婷钰,李雷激

(西南医科大学附属医院 耳鼻咽喉头颈外科,四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 研究耳聋家系 *HARS2* 基因突变位点对 *HARS2* 蛋白的影响,为研究 *HARS2* 基因突变致 Perrault 综合征的发病机制奠定基础。**方法** 检测并验证该家系成员样本 DNA 的 *HARS2* 基因。使用软件对蛋白质建模,分析预测 Asp117Asn 和 Leu303Pro 突变对 *HARS2* 蛋白结构稳定性的影响。转染含野生型 *HARS2* 基因和 *HARS2* 基因 Asp117Asn 突变、Leu303Pro 突变的慢病毒重组质粒以及空载体至 HEK 293T 细胞(人胚肾细胞)中,分别获得 WT 细胞组(转染野生型的 HEK293T 细胞)、Asp117Asn 细胞组(转染 Asp117Asn 突变的 HEK293T 细胞)、Leu303Pro 细胞组(转染 Leu303Pro 突变的 HEK293T 细胞)、NC 细胞组(转染空病毒载体的 HEK293T 细胞)。Northern blot 检测线粒体 tRNAHis 氨酰化水平;Western blot 检测 *HARS2* 蛋白的表达;免疫荧光测定 *HARS2* 蛋白表达部位。**结果** ①先证者及其哥哥为耳聋患者,为 *HARS2* c. 349G > A (p. Asp117Asn) 和 c. 908T > C (p. Leu303Pro) 复合杂合突变;其父亲为 *HARS2* c. 908T > C (p. Leu303Pro) 杂合突变;其外婆、母亲、舅舅为 *HARS2* 349G > A (p. Asp117Asn) 杂合突变;②突变可能导致 *HARS2* 蛋白稳定性下降;③WT 细胞组线粒体 tRNAHis 氨酰化水平高于其余 3 组 ($P < 0.05$);Asp117Asn 细胞组较 Leu303Pro 细胞组线粒体 tRNAHis 氨酰化水平高 ($P = 0.016$);④*HARS2* 蛋白均于线粒体表达;⑤*HARS2* 蛋白在 NC 细胞组中无明显表达;WT 细胞组 *HARS2* 蛋白表达与 Asp117Asn 细胞组无明显差异 ($P = 0.356$),高于 Leu303Pro 细胞组 ($P = 0.000$)。**结论** ①明确了 *HARS2* 基因 2 个新突变位点 c. 349G > A 和 c. 908T > C;②该突变可能通过降低 *HARS2* 蛋白氨酰化能力和/或表达,导致线粒体 tRNAHis 氨酰化能力降低,进而出现线粒体功能障碍,从而导致听力损失。

关键词: 耳聋;HARS2;基因突变;Perrault 综合征;氨酰化水平
中图分类号: R764. 43

Preliminary study on the pathogenesis of Perrault syndrome with deafness due to mutation of *HARS2* gene

LIANG Yunhong, CHEN Xi, FEI Jing, YU Liya, LIAO Na, ZHUANG Lu, YANG Tingyu, LI Leiji
(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract: **Objective** To study the pathogenesis of Perrault syndrome (PRLTS) caused by mutations in *HARS2* gene by investigating the effect of mutated loci of the *HARS2* gene on *HARS2* protein in a deaf family. **Methods** The *HARS2* gene in the DNA samples from members of this family line was detected and validated. Protein modeling was analyzed using software to predict the effect of Asp117Asn and Leu303Pro mutations on the structural stability of *HARS2* protein. Lentiviral recombinant plasmids containing Leu303Pro mutation and Asp117Asn mutation of *HARS2* gene, wild-type (WT) *HARS2* gene and empty vector were transfected into HEK 293T cells (human embryonic kidney cells) to obtain WT cell group, Asp117Asn cell group, Leu303Pro cell group and normal control (NC) cell group. Northern blot was adopted for mitochondrial tRNAHis aminoacylation level, Western blot for *HARS2* protein expression and immunofluorescence for *HARS2* protein expression site. **Results** ①The preexisting patient and his brother were deaf and had a compound heterozygous mutation of *HARS2* 349G > A (p. Asp117Asn) and 908T > C (p. Leu303Pro). His father had a heterozygous mutation of *HARS2* c. 908T > C (p. Leu303Pro). His grandmother, mother, and uncle had a

基金项目:泸州市科技计划项目(2021-SYF-30)。
第一作者简介:梁云红,男,在读硕士研究生。
通信作者:李雷激,Email:lileiji0301@163.com

heterozygous mutation of HARS2 349G > A (p. Asp117Asn). ②Mutations might affect HARS2 protein stability. ③The mitochondrial tRNAHis aminoacylation level in WT cell group was higher than those in the remaining three groups ($P < 0.05$). Asp117Asn cell group had higher level of mitochondrial tRNAHis aminoacylation than Leu303Pro cell group ($P = 0.016$). ④HARS2 proteins were all expressed in mitochondria. ⑤HARS2 protein was not significantly expressed in the NC cell group. HARS2 protein expression in WT cell group was not significantly different from Asp117Asn cell group ($P = 0.356$) and higher than that in Leu303Pro cell group ($P = 0.000$). **Conclusion** Two new mutant loci c. 349G > A and c. 908T > C of the HARS2 gene are identified in this family. The mutation may lead to reduced mitochondrial tRNAHis aminoacylation capacity through reducing HARS2 protein aminoacylation capacity and/or expression, which in turn leads to mitochondrial dysfunction and thus hearing loss.

Keywords: Deafness; HARS2; Genetic mutations; Perrault syndrome; Aminoacylation level

耳聋是临床常见疾病,它严重影响人们的生活及工作。临床上将耳聋分为非综合征型耳聋(仅有听力下降表现)和综合征型耳聋(伴有除听力下降以外症状或体征),约 30% 为综合征型耳聋^[1],目前发现的综合征型耳聋有 400 余种^[2]。60% 的耳聋是由于遗传所致,其余常见病因有细菌病毒感染、耳毒性药物及环境因素等。

Perrault 综合征临床表现为双侧感音神经性听力损失,女性患者伴有卵巢功能不全、障碍,部分患者可合并神经系统功能障碍^[3]。研究表明 Perrault 综合征与 HARS2^[4]、HSD17B4^[5]、ERAL1^[6]、LARS2^[7]、CLPP^[8]、TWINKLE^[9] 6 个基因突变有关。目前 Perrault 综合征的报道较少,但实际可能并不少见,临床中,部分男性患者仅表现为听力下降,可能被诊断为非综合征型耳聋。本实验通过检测 1 个耳聋家系基因,发现 HARS2 基因 2 个新突变位点,并进一步行体外实验,探讨该突变位点对 HARS2 蛋白的影响及其在 Perrault 综合征发生过程中的致病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

包含三代 10 人,其中 2 例耳聋患者(图 1)。先证者(Ⅲ-1),男,出生时听力筛查未通过,2 岁诊断为双侧感音神经性听力下降,佩戴助听器效果差;10 岁听力检查提示双侧感音神经性听觉丧失(图 2)。

先证者哥哥(Ⅲ-2),3 岁时家属发现患儿听力障碍,检查为双侧极重度感音神经性听力下降,佩戴助听器效果差。2 例患者均于我院行右侧人工耳蜗(cochlear implant, CI)植入术。此 2 例患者查体、智力无异常,无外伤史、耳毒性药物使用史,相关检查(影像学、彩超)均无异常。其余家系成员听力正常,且无遗传病史,先证者父母否认近亲结婚。本研究前期^[10]检测先证者外周血 DNA,结果显示 HARS2 基因有 2 个新突变位点:c. 349G > A (p. Asp117Asn) 和 c. 908T > C (p. Leu303Pro),分析可能为致病突变,在签署知情同意后,抽取该家系 10 人静脉血进行相关验证分析。本研究经西南医科大学附属医院伦理委员会审批后实施。

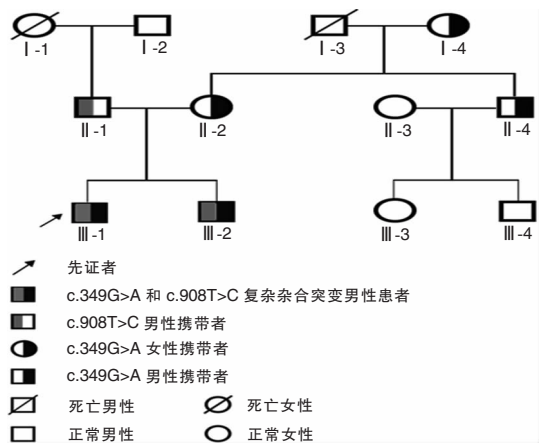


图 1 Perrault 综合征家系图谱

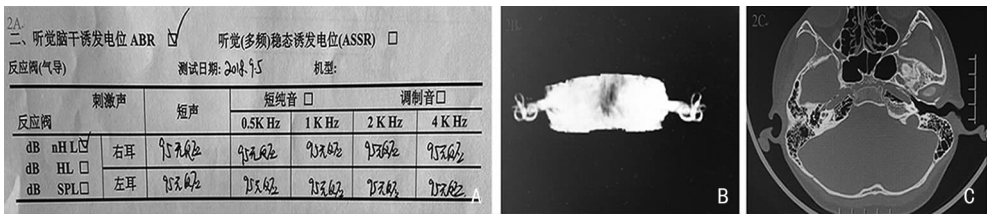


图 2 先证者听觉脑干诱发电位结果及影像资料 A:客观听力检查提示极重度感音神经性听力损失; B、C:影像学检查示内耳无畸形

1.2 方法

1.2.1 主要实验材料 HEK293T 细胞(本实验室),野生型 HARS2 慢病毒重组质粒、突变型 HARS2(Asp117Asn 和 Leu303Pro)慢病毒重组质粒、慢病毒空载质粒、慢病毒包装转染试剂(上海和元生物),DH5α 感受态细胞、血液 DNA 提取试剂盒(DP304)(北京天根),HARS2 兔克隆抗体(11301-1-AP)(Proteintech 公司),山羊抗小鼠 IgG 抗体(A0216)、抗兔 IgG 抗体(A0208)(上海碧云天),Flag 鼠克隆抗体(F1804)(Sigma 公司),GAPDH 兔克隆抗体(AP0063)(Bioworld 公司)。

1.2.2 实验分组 ①突变型:Asp117Asn 细胞组(转染 Asp117Asn 突变的 HEK293T 细胞)、Leu303Pro 细胞组(转染 Leu303Pro 突变的 HEK293T 细胞);②野生型:WT 细胞组(转染野生型的 HEK293T 细胞);③NC 细胞组(转染空病毒载体的 HEK293T 细胞)。

1.2.3 外周血 DNA 提取、测序 根据 DNA 提取试剂盒的操作流程,提取先证者及家系成员外周血标本 DNA,进行基因测序(北京迈基诺公司)。

1.2.4 蛋白质功能域和稳定性分析 SWISS-MODE 对蛋白质建模,Swiss-PdbViewer 4.1 选定突变位点位置,分别用 I-Mutant、DUET、CUPSAT、mC-SM 预测突变蛋白质稳定性变化。

1.2.5 构建稳定转染细胞 选用真核细胞表达载体(GL120,上海和元生物构建),携带增强型绿色荧光蛋白(EGFP)及 Flag 标签。DH5α 菌接种在 LB 培养基中,制备感受态细胞,将质粒加入感受态细胞中,质粒感受转化态细胞。抽取质粒并进行测序验证,对测序鉴定成功的菌液培养,再次抽取质粒,并保存于-20℃冰箱。复苏 HEK293T 细胞,进行培养及传代,将该细胞接种到 6 孔板,后加入慢病毒包装质粒(HARS2 突变型、HARS2 野生型、空载体),混匀后培养。3d 后加入 DEME 培养基(含嘌呤霉素)培养,筛选 EGFP 阳性表达的细胞株。

1.2.6 检测方法 Western blot 检测:提取 Asp117Asn 细胞组、Leu303Pro 细胞组、WT 细胞组和 NC 细胞组蛋白。配置蛋白标准液及各孔中标准液加样,加入 30 μg 待测蛋白至各孔,进行电泳、转膜、封闭。加入稀释的一抗 4℃过夜,TBST 洗膜,加入二抗孵育 2 h。孵育结束后用 TBST 洗膜。ECLA 液 A、B 试剂混匀显影后采图并保存。

免疫荧光检测:接种细胞,培养过夜,Mito-Tracker Red 染色液孵育 0.5 h。加入 4%多聚甲醛

固定 10 min,PBS 清洗,封闭。加入稀释好的一抗,4℃孵育过夜。然后加入封闭液稀释后的二抗,室温避光孵育 1 h。加入 DAPI 染色液复染细胞核,封片。拍照并保存。

Northern blot 杂交:制胶(10% PAG 凝胶)、电泳完成后将 RNA 转移至尼龙膜用 SSC 漂洗 1 min。将膜置于滤纸上,放入紫外交联仪中交联。将膜放入杂交管,55℃预杂交 2 h。取 30 pmol 探针置入杂交管,过夜,收集杂交液,洗涤 2 次。High stringency wash,洗涤 2 次。将尼龙膜转移至 DIG washing buffer 溶液中,室温漂洗,转移至 Blocking solution 中,室温封闭 30 min。置于 Antibody solution,孵育 30 min。转移至 DIG,洗涤 2 次。转移至 Detection buffer 中处理 5 min。最后将尼龙膜置于杂交袋,加入 CDP-star,放置 5 min,拍照。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行数据统计分析,采用单因素方差分析方法,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HARS2 基因检测结果

该家系 HARS2 基因测序结果见表 1 和图 3。

表 1 家系 HARS2 测序结果

家系成员	基因型	类型
I-2	WT	WT
I-4	c.349G > A	Het
II-1	c.908T > C	Het
II-2	c.349G > A	Het
II-3	WT	WT
II-4	c.349G > A	Het
III-1	c.349G > A、c.908T > C	Het
III-2	c.349G > A、c.908T > C	Het
III-3	WT	WT
III-4	WT	WT

注:WT 为野生型;Het 为杂合突变。

2.2 蛋白质功能域和稳定性分析

HARS2 蛋白 117 位氨基酸和 303 位氨基酸均位于催化核心区域,突变可能影响组氨酰 tRNA 合成酶的催化活性,p. Asp117Asn 还位于蛋白质二聚化界面,该突变还可能影响 HARS2 蛋白的二聚化作用。正确的蛋白质一级结构是蛋白质正确折叠保持构象稳定性的前提。通过 Swiss-Model 建立 HARS2 三维结构模型并标注两个突变在模型上的位点,发

现 117Asn 位于 β 折叠结构上,Leu303 位于 α 螺旋结构上,HARS2 蛋白 Asp117Asn 和 Leu303Pro 变异可能导致蛋白质结构改变,进而影响蛋白质稳定性。由于氨基酸排列顺序决定蛋白质空间构象,且蛋白质三维结构为最低自由能状态。而蛋白质解折叠自由能是评估蛋白质热动力学稳定性的一个重要指标,因此可通过计算野生型和突变型蛋白质解折叠自由能差值($\Delta\Delta G$)可以预测突变对蛋白质热稳定性的影响。在 I-Mutant、I-Mutant、CUPSAT 及 mCSM 中预测突变型蛋白解折叠自由能较野生型蛋白解折叠自由能高, HARS2 蛋白 p. Asp117Asn 与 p. Leu303Pro 变异均可能导致蛋白质热稳定性下降。见图 4、5。

2.3 转染 HEK293T 细胞结果

野生型和突变型(c. 349G > A 和 c. 908T > C) HARS2 的重组质粒(上海和元生物构建)测序结果见图 6。转染 3 d 后,结果显示:除 HEK293T 空细胞外,余各细胞组均出现绿色荧光。见图 7。

2.4 HARS2 蛋白表达

本研究将 Flag 标签加入 HARS2 基因 N 端,并通过检测 3 × Flag + HARS2 来检测 HARS2 蛋白表达情况。结果显示:Asp117Asn 细胞组与 WT 细胞组比较,3 × Flag + HARS2 蛋白表达无明显差异($P=0.356$);Leu303Pro 细胞组与 WT 细胞组比较,3 × Flag + HARS2 蛋白表达较低($P=0.000$)。见图 8。

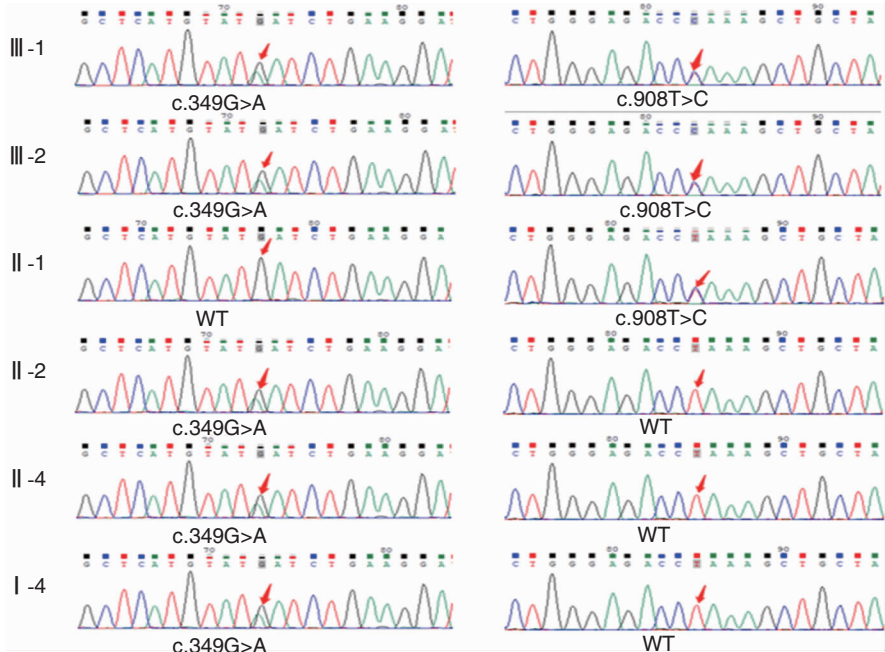


图 3 部分家系成员 HARS2 349G > A 和 908T > C 位点测序图

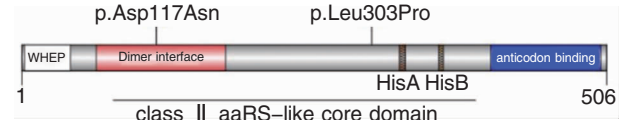


图 4 HARS2 蛋白功能域示意图 注:N 端 WHEP 结构域(amino acid, aa3 - 43); anticodon binding: C 端反密码子结合域(aa406 - 501); II 类 aaRS 核心结构域(aa80 - 393); Dimer interface:二聚化界面(aa65 - 177); HisA:组氨酸识别位点(aa327 - 332); HisB:组氨酸结合位点(aa361 - 365)。

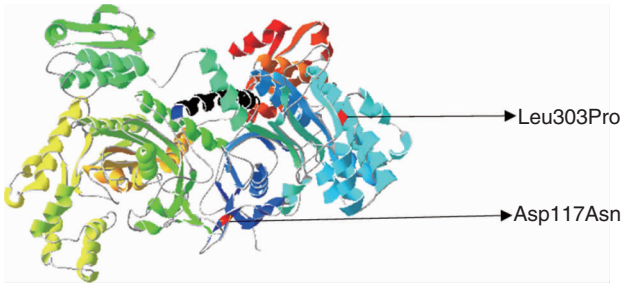


图 5 HARS2 蛋白模型构建(PDB ID:4phc),图中箭头所对应标红的地方为突变位点

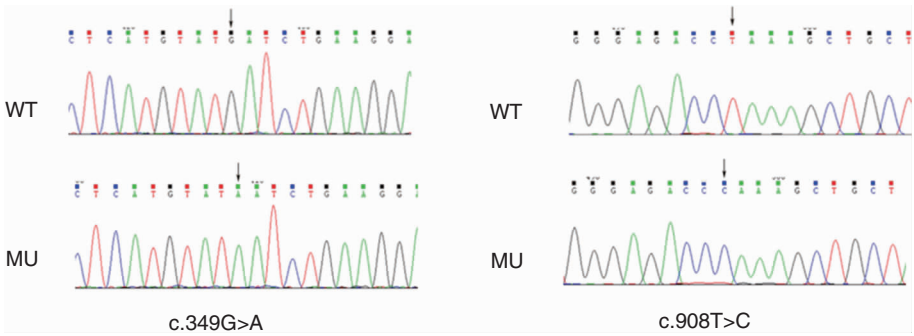


图 6 质粒部分测序图 注:WT 表示野生型质粒;MU 表示点突变质粒(箭头指示突变位点)。

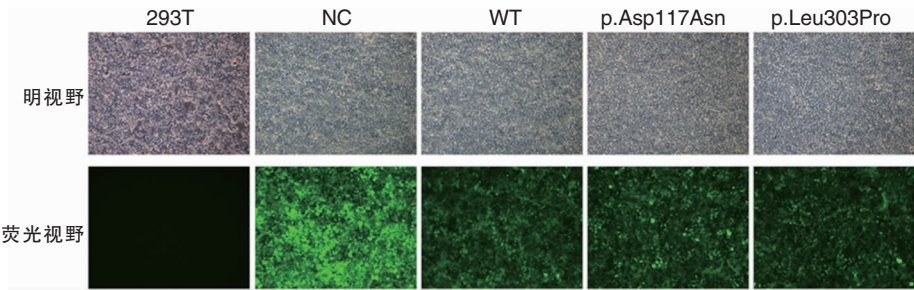


图 7 HEK293T 细胞转染 3 d 后表达情况 (免疫荧光 ×100)

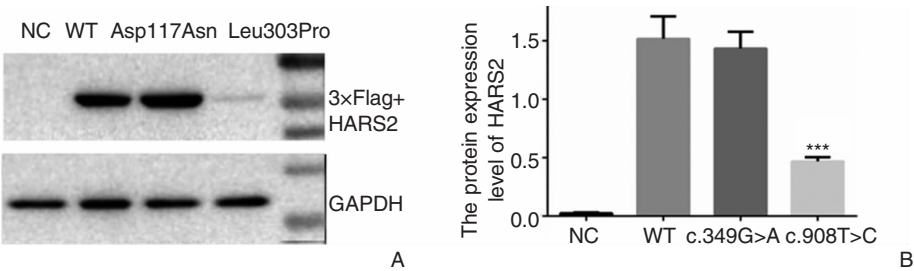


图 8 各细胞组 3 × Flag + HARS2 蛋白的 Western blot 检测结果 A:各细胞组中 3 × Flag + HARS2 蛋白的 Western blot 条带,GAPDH 为内参; B:各细胞组中 3 × Flag + HARS2 蛋白的相对表达

2.5 免疫荧光检测细胞内 HARS2 蛋白分布

将 *EGFP* 基因(绿色荧光蛋白)融合至 *HARS2* 基因中,同时应用红色荧光试剂(Mito-Tracker Red CMXRos)对细胞线粒体进行染色。NC 细胞组中的绿色荧光均匀的在细胞内分布。各组细胞绿色荧光与红色荧光重合,表明 *HARS2* 蛋白均分布于线粒体。见图 9。

2.6 Northern bolt 分析线粒体 tRNAHis 氨酰化水平

线粒体 tRNAHis 氨酰化水平 NC 细胞组低于 WT 细胞组($P=0.010$);WT 细胞组高于 Asp117Asn 细胞组和 Leu303Pro 细胞组($P=0.000$, $P=0.000$);Leu303Pro 细胞组低于 Asp117Asn 细胞组($P=0.016$)。见图 10。

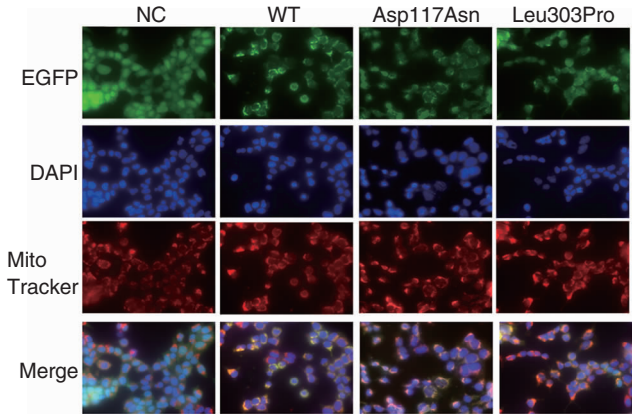


图 9 各细胞组免疫荧光检测结果 (×600)

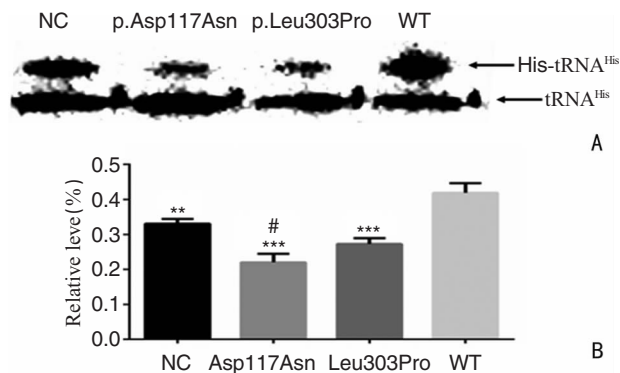


图10 各细胞组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化结果 A:各组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化水平 Northern blot 条带; B:各组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化水平百分比 注:与 Leu303Pro 细胞组相比, # $P < 0.05$;与 WT 细胞组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3 讨论

在本研究前期^[10-11],对该家系2例患者行 *GJB2*、*SLC26A4*、*mtDNA12SrRNA* 基因筛查,检测结果为阴性,进一步检测先证者及其哥哥 *HARS2*、*ABHD12* 等139个耳聋基因和 m. C1494T、m. A1555G 等6个药物性聋位点,结果显示:先证者及其哥哥为 *HARS2* c. 349G > A 和 c. 908T > C 复杂杂合突变。完善该家系 sanger 测序验证,发现母亲(Ⅱ-2)、舅舅(Ⅱ-4)、外婆(Ⅰ-4)为 *HARS2* c. 349G > A 杂合突变,其父亲(Ⅱ-1)为 *HARS2* c. 908T > C 杂合突变,考虑该家系患者突变基因来自其母亲和父亲。以上两个突变位点在 PROVEAN 和 MutationTaster 软件致病性预测中显示为有害^[12],因此我们推断该家系患者耳聋病因为 *HARS2* c. 349G > A 和 c. 908T > C。在仅有男性患者的家系中,可能表现为单纯性耳聋,可能诊断为非综合征性耳聋,若仅依靠表型,无法判断患者是相关基因突变引起 PRLTS 而导致耳聋,还是非综合征性耳聋。*HARS2* 基因突变在 PRLTS 的发病中有重要作用,相关报道表明大多数由 *HARS2* 突变导致的 PRLTS,其突变为复合杂合突变。在本文中,2例患者为男性,且年幼,目前仅有听力下降表现,可能神经系统功能障碍尚未表现出来,结合其基因检测结果,考虑这2例患者很可能是由于上述基因突变引起 PRLTS,从而表现出非综合征性耳聋,我们将持续追踪该2例患者病情变化情况。

HARS2 位于 5q31,编码产物为线粒体组氨酰-tRNA 合成酶,在细胞质翻译后进入线粒体发挥作用:连接组氨酸与 tRNA,参与线粒体翻译过程。Yu

等^[13]使用软件预测 *HARS2* p. Asp117Asn 和 p. Leu303Pro 致病性表明为有害突变,且同源建模表明以上突变可以改变(形成或缺失)蛋白质中氢键,在本研究 *HARS2* 蛋白结构模型分析中,*HARS2* p. Asp117Asn 和 p. Leu303Pro 均位于线粒体组氨酰-tRNA 合成酶的催化核心区域,突变可能导致其热稳定性下降,因此 *HARS2* p. Asp117Asn 和 p. Leu303Pro 突变可能影响 *HARS2* 蛋白三维结构,进而影响蛋白质功能。

本研究表明,与 WT 组相比,*HARS2* p. Leu303Pro 突变会使 *HARS2* 蛋白的表达下降,而 Yu 等^[13]研究显示 *HARS2* p. Leu303Pro 突变后,*HARS2* 蛋白的表达无明显下降,可能是由于本文与其 Yu 等检测时机不同,本文为转染后 72 h,而 Yu 等为转染后 48h。这可能表明 *HARS2* p. Leu303Pro 突变后,早期不影响蛋白表达,随着时间的延长,畸形 *HARS2* 蛋白产物增加,其负反馈抑制转录和/或翻译过程,进而影响蛋白表达,这需要我们进一步探讨。*HARS2* p. Asp117Asn 突变后,*HARS2* 蛋白表达与 WT 组相比无明显差异。有学者^[14]研究大肠杆菌中 HIS1 蛋白表达发现:线粒体功能障碍与 HIS1 蛋白表达降低有关。线粒体氨酰-tRNA 合成酶发挥功能的前提是进入线粒体,这与其 N 端线粒体靶向信号有关^[15-16]。免疫荧光结果显示 *HARS2* 蛋白均定位于线粒体。Pierce 等^[5]分析 *HARS2* 野生型和突变型细胞 *HARS2* 蛋白的表达亦表明突变不影响 *HARS2* 蛋白的定位。

本研究表明,Asp117Asn 细胞组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化水平和 Leu303Pro 细胞组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化水平明显低于 WT 细胞组。有文献报道,部分线粒体氨酰-tRNA 合成酶基因突变所致疾病,与其氨基酰化水平下降有关^[17]。Li 等^[18]研究指出过表达 *LARS2* 不影响野生型细胞氨基酰化水平,却提高突变细胞氨基酰化水平。在本研究,NC 细胞组 tRNA^{His} 乙酰化水平低于 WT 细胞组,这可能是因为 NC 细胞组线粒体 tRNA^{His} 乙酰化水平没有达到最大阈值。Gong 等^[19]研究发现线粒体中 tRNA^{His} 50% 的氨基酰化水平可能是维持细胞正常功能的最大阈值水平。Asp117Asn 细胞组 tRNA^{His} 乙酰化水平明显低于 WT 组,但其 *HARS2* 蛋白表达较 WT 组无明显变化,这表明该突变对蛋白表达无影响,但能使其活性降低,进而使氨基酰化水平降低^[5]。Asp117Asn 细胞组 tRNA^{His} 乙酰化水平高于 Leu303Pro 细胞组,其中一个原因可能是蛋白表达

差异,研究发现突变位点不同,氨酰化水平变化也不相同^[20-21],线粒体亮氨酸 tRNA 合成酶 p. Thr522Asn 突变的催化效率降低了 9 倍,而 p. Ala430Val 突变的催化效率降低了 18 倍^[22]。Yu 等^[13] 研究表明 HARS2 p. Asp117Asn 和 p. Leu303Pro 突变后,细胞内活性氧产生增加,这可能是由于突变后,线粒体中 tRNA 氨酰化水平异常,进而导致线粒体呼吸功能障碍,出现线粒体自噬加快、ATP 产生减少、活性氧增加^[23]。耳蜗对能量变化极其敏感,线粒体呼吸功能障碍早期就可导致耳蜗退行性改变^[24-26]。Blocquel 等^[27] 研究表明,腓骨肌萎缩症的严重程度与患者细胞中突变引起的组氨酰-tRNA 合成酶的开放构象程度关系密切,为研究 HARS 突变相关疾病有了新方向。多个实验发现线粒体 tRNA 氨酰化降低会抑制线粒体呼吸功能,蛋白质翻译减少。本研究表明,以上 2 个 HARS2 基因突变位点会降低线粒体 tRNAHis 氨酰化水平,但其对线粒体相关功能有无作用则需我们进一步研究。

本研究筛查、验证了一个家系的 HARS2 基因 2 个新突变位点,并进一步探讨以上两种突变对 HARS2 蛋白结构稳定性、表达含量及部位、线粒体氨酰化水平的影响,有助于对 HARS2 突变所致 PRLTS 机制进一步的研究。

参考文献:

- [1] Zhou Y, Li C, Li M, et al. Mutation analysis of common deafness genes among 1,201 patients with non-syndromic hearing loss in Shanxi Province [J]. *Mol Genet Genom Med*, 2019, 7(3): e537.
- [2] 刘梦婷,张天虹. 综合征性耳聋的诊断与治疗策略[J]. *临床耳鼻喉头颈外科杂志*, 2021, 35(3): 285-288.
- [3] Roberts LM, Carnivale B. Perrault syndrome diagnosis in a patient presenting to her primary care provider with secondary amenorrhea [J]. *Case Rep Obstet Gynecol*, 2019, 2019:9865281.
- [4] Pierce SB, Chisholm KM, Lynch ED, et al. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome[J]. *P Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(16): 6543-6548.
- [5] Pierce SB, Walsh T, Chisholm KM, et al. Mutations in the DBP-deficiency protein HSD17B4 cause ovarian dysgenesis, hearing loss, and ataxia of Perrault syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(2): 282-288.
- [6] Theunissen TEJ, Szklarczyk R, Gerards M, et al. Specific MRI abnormalities reveal severe Perrault syndrome due to CLPP defects [J]. *Front Neurol*, 2016, 7: 203.
- [7] Jenkinson EM, Rehman AU, Walsh T, et al. Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(4): 605-613.
- [8] Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, et al. Mutations in LARS2, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome [J]. *Am J Hum Genet*, 2013, 92(4): 614-620.
- [9] Morino H, Pierce SB, Matsuda Y, et al. Mutations in Twinkle primase-helicase cause Perrault syndrome with neurologic features [J]. *Neurology*, 2014, 83(22): 2054-2061.
- [10] 余莉亚. 43 例人工耳蜗植入患者耳聋基因检测与疗效相关性分析及耳聋家系研究[D]. 泸州:西南医科大学,2020.
- [11] 余莉亚,费静,郑红弟,等. 43 例人工耳蜗植入患者基因检测及术后康复效果分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2019, 25(5): 470-475.
- [12] 陈曦. HARS2 基因突变致以耳聋为表现的 Perrault 综合征的致病机制研究[D]. 泸州:西南医科大学,2021.
- [13] Yu J, Jiang W, Cao L, et al. Two novel likely pathogenic variants of HARS2 identified in a Chinese family with sensorineural hearing loss [J]. *Hereditas*, 2020, 157(1): 47.
- [14] Chiu MI, Mason TL, Fink GR. HTS1 encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidyl-tRNA synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*: mutations alter the specificity of compartmentation [J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 987-1001.
- [15] Garin S, Levi O, Cohen B, et al. Localization and RNA binding of mitochondrial aminoacyl tRNA synthetases [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(10): 1185.
- [16] Boczonadi V, Müller JS, Horvath R. Mitochondrial translation deficiencies//*Mitochondrial diseases* [M]. Springer; Cham, 2021: 95-117.
- [17] González-Serrano LE, Chihade JW, Sissler M. When a common biological role does not imply common disease outcomes: Disparate pathology linked to human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(14): 5309-5320.
- [18] Li R, Guan MX. Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu} (UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(9): 2147-2154.
- [19] Gong S, Wang X, Meng F, et al. Overexpression of mitochondrial histidyl-tRNA synthetase restores mitochondrial dysfunction caused by a deafness-associated tRNA^{His} mutation [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(4): 940-954.
- [20] 吴腾辉,彭镜,张慈柳,等. 氨酰基-tRNA 合成酶基因变异 10 例分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(6): 595-601.
- [21] Levi O, Arava Y. mRNA association by aminoacyl tRNA synthetase occurs at a putative anticodon mimic and autoregulates translation in response to tRNA levels [J]. *Plos Biol*, 2019, 17(5): e3000274.
- [22] Riley LG, Rudinger-Thirion J, Schmitz-Abe K, et al. LARS2 variants associated with hydrops, lactic acidosis, sideroblastic anemia, and multisystem failure [J]. *JIMD Rep*, 2016, 28: 49-57.

[23] Gong S, Peng Y, Jiang P, et al. A deafness-associated tRNAHis mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (12): 8039 – 8048.

[24] 邹文进, 黄文捷, 袁伟. 高原作业环境对听力的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2021, 27(5): 611 – 614.

[25] Kim YR, Baek JI, Kim SH, et al. Therapeutic potential of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in mitochondrial-ROS induced sensorineural hearing loss caused by Idh2 deficiency[J]. Redox Biol, 2019, 20: 544 – 555.

[26] Bazard P, Pineros J, Frisina RD, et al. Cochlear inflammaging in relation to Ion channels and mitochondrial functions[J]. Cells, 2021, 10(10): 2761.

[27] Blocquel D, Sun L, Matuszek Z, et al. CMT disease severity correlates with mutation-induced open conformation of histidyl-tRNA

synthetase, not aminoacylation loss, in patient cells[J]. P Natl Acad Sci USA, 2019, 116(39): 19440 – 19448.

(收稿日期: 2022 – 08 – 16)

本文引用格式:梁云红, 陈曦, 费静, 等. *HARS2* 基因突变致以耳聋为表现的 Perrault 综合征机制的研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2022, 28 (6): 19 – 26. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202222245

Cite this article as:LIANG Yunhong, CHEN Xi, FEI Jing, et al. Preliminary study on the pathogenesis of Perrault syndrome with deafness due to mutation of *HARS2* gene[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2022, 28 (6): 19 – 26. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 – 1520. 202222245