

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322130

· 耳科疾病专栏 ·

Perrault 综合征 *HARS2* 基因 c. 349G > A 和 c. 908T > C 突变对细胞线粒体功能的影响

宋妮洁, 费静, 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** 探讨 *HARS2* 基因 c. 349G > A 和 c. 908T > C 两个位点的突变对细胞和线粒体功能的影响, 以期揭示 *HARS2* 新突变位点的致病机制。**方法** 构建含野生型、c. 349G > A 突变型、c. 908T > C 突变型 *HARS2* 基因的重组表达载体, 使用慢病毒包装系统将质粒转染至 HEK 293T 细胞中, 通过嘌呤霉素筛选获得稳定转染野生型、突变型 *HARS2* 基因的细胞系, 同时建立稳定转染空病毒载体的细胞系作为对照, 对野生组、c. 349G > A 突变组、c. 908T > C 突变组和对照组细胞的线粒体功能和细胞增殖能力进行研究。**结果** 重组质粒在预期位点发生了突变, 重组载体携带的绿色荧光蛋白(EGFP)稳定表达; 两突变组细胞增殖活力较野生组下降, 72 h 吸光度有显著性差异 ($P < 0.05$); c. 349G > A 突变组 $MTCO_2$ 蛋白表达量较对照组和野生组均有下降 ($P < 0.05$); c. 349G > A 突变组和 c. 908T > C 突变组的线粒体 ATP 相对细胞总 ATP 产率较对照组均有降低 ($P < 0.05$); c. 349G > A 突变组线粒体活性氧自由基(ROS)水平较对照组明显增加 ($P < 0.05$); 两突变组线粒体膜电位(MMP)较野生组下降 ($P < 0.01$)。**结论** *HARS2* 基因 c. 349G > A、c. 908T > C 突变细胞的线粒体存在一定的呼吸功能缺陷, 突变细胞增殖能力下降, 可能是 *HARS2* 基因突变致 Perrault 综合征的细胞学机制。

关键词: Perrault 综合征; *HARS2*; 基因突变; 线粒体

中图分类号: R764.3

Effects of c. 349G > A and c. 908T > C mutations in *HARS2* gene of Perrault syndrome on mitochondrial function

SONG Lijie, FEI Jing, 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 investigate the effects of c. 349G > A and c. 908T > C mutations in *HARS2* gene on mitochondrial and cell function so as to reveal the pathogenic mechanism of *HARS2* mutation in Perrault syndrome.

Methods Recombinant expression vectors containing wild-type, c. 349G > A mutant and c. 908T > C mutant *HARS2* were constructed. The plasmid was transfected into HEK 293T cells using lentivirus packaging system. Stably transfected cell lines were screened using puromycin. Meanwhile, the cell line transfected with empty virus vector was established as the control. The mitochondrial function and cell proliferation of HEK 293T cell lines in the wild group, two mutant groups and the control group were studied. **Results** The recombinant plasmid was mutated at the desired site, and the EGFP protein carried by the recombinant vector was expressed stably. The cell proliferation activities of the two mutant groups were lower than that of the wild group, and the absorbance at 72 h was significantly different ($P < 0.05$). $MTCO_2$ protein expression in c. 349G > A mutant group was lower than those in the control and wild groups ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mitochondrial ATP relative to total cellular ATP production was decreased in both mutation groups ($P < 0.05$). The level of mitochondrial reactive oxygen species in the c. 349G > A mutant group was increased compared with the control group ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential of the two mutation groups was lower than that of the wild group ($P < 0.01$). **Conclusion** The mitochondria of *HARS2* c. 349G > A and c. 908T > C mutant cells have certain respiratory

基金项目: 泸州市科技计划面上项目(2021-SYF-30)。

第一作者简介: 宋妮洁, 女, 在读硕士研究生。

通信作者: 李雷激, Email: lileiji0301@163.com

defects and the proliferation ability of the mutant cells is reduced, which may be the cytological mechanism of Perrault syndrome induced by HARS2 mutation.

Keywords: Perrault syndrome; HARS2; Gene mutation; Mitochondria

Perrault 综合征是一种罕见的常染色体隐性遗传性疾病,其表征受性别影响,通常表现为双耳轻度-极重度感音神经性听力损失,女性常伴有卵巢功能障碍、性腺发育不全、原发性闭经、不孕症等,男性常表现出正常的青春发育和生育能力^[1]。HARS2 基因位于常染色体 5q31.3,编码高度保守的含 506 个氨基酸的线粒体组氨酰 tRNA 合成酶,该酶在线粒体基质中催化组氨酸活化并与同源 tRNA 结合,促进线粒体蛋白质合成^[2]。目前为止,已发现 HARS2 基因 16 种变异位点与 Perrault 综合征相关,其中只有 2 个突变位点进行了实验验证,其余仅限于临床发现^[2-8]。先前的研究首次在一个以耳聋为表现的中国汉族男性 Perrault 综合征家系中发现 HARS2 基因 c. 349G > A 和 c. 908T > C 复合杂合突变,分别导致 p. Asp117Asn 和 p. Leu303Pro^[9]。由于 Perrault 综合征低发病率和临床异质性,HARS2 基因突变致病机制和途径尚不明确。本实验旨在通过体外实验研究 HARS2 基因新突变对细胞线粒体功能的影响,探究其导致 Perrault 综合征的致病途径,为临床诊断提供理论依据和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、主要试剂与仪器

HEK 293T 细胞由西南医科大学中心实验室提供,重组表达载体由上海和元生物技术有限公司构建提供,无内毒素质粒大提试剂盒(DP117,北京天根),DH5 α 感受态细胞(北京天根),AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒(美国 Axygen 公司),慢病毒包装转染试剂(上海和元生物技术有限公司),MTCO₂ 兔多克隆抗体(55070-1-AP,美国 Proteintech),GAPDH 兔多克隆抗体(AP0063,美国 Bioworld),细胞线粒体分离试剂(C3602,上海碧云天),增强型 JC-1 线粒体膜电位检测试剂(C2003S,上海碧云天),增强型 ATP 检测试剂(S0027,上海碧云天),微量法 ATP 含量检测试剂(BC0305,北京索莱宝),ROS 检测试剂(E004-1-1,南京建成),CCK8 试剂(CK04,北京同仁化学研究所),荧光倒置显微镜(日本 Olympus),荧光分光光度计(Thermo Fisher),多功能酶标仪(德国 BMG),稳压稳流电泳仪、微型垂直电泳槽、转移

电泳槽、全自动化学发光成像分析系统(天能)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞构建与培养 委托上海和元生物技术有限公司构建真核表达载体,以 pSLenti-SFH-EGFP-P2A-Puro-CMV-HARS2-3xFLAG-WPRE 为载体,构建野生型、c. 349G > A 突变型、c. 908T > C 突变型 HARS2 基因重组载体,同时构建空病毒载体,载体携带 EGFP、Flag 标签,重组载体经测序验证。

将重组质粒转化感受态细胞,接种于 LB(A+) 固体培养基上,挑选单克隆菌落,根据 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒说明书提取质粒行测序验证,测序由上海和元生物技术有限公司完成,对测序鉴定成功的菌液进行培养,根据无内毒素质粒大提试剂盒说明书进行质粒大提取,-20℃ 保存。取出 HEK 293T 细胞,37℃ 水浴转移至离心管中,离心后弃上清,完全培养基重悬后加入到培养皿中继续培养。待细胞融合度达 80% 时,吸除旧培养基,加入 Opti-MEM,将表达质粒(突变型 HARS2 重组质粒、野生型 HARS2 重组质粒、空载质粒)与慢病毒包装质粒混合,转染 HEK 293T 细胞 48~72 h,收集病毒上清液。将 HEK 293T 细胞接种到 96 孔板中,按梯度加入病毒上清液观察转染效率测定慢病毒滴度。将 HEK 293T 细胞接种到 6 孔板中,加入慢病毒和 polybrene 转染细胞 12~20 h,加入 DEME 培养基培养细胞 72 h,用含终浓度为 1 μ g/mL 嘌呤霉素的 DEME 培养基筛选 EGFP 阳性表达的稳转细胞株,荧光显微镜下观察转染效率。

1.2.2 细胞活力检测 采用 CCK8 定量比色法测定细胞活力。调整细胞密度为 2 000 个/mL,接种于 96 孔板,设置空白对照组,实验组和空白组均设 3 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。分别于 24、48、72 h 加入 10 μ L CCK8 试剂,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。

1.2.3 Western 印迹法检测线粒体呼吸链复合物亚基 MTCO₂ 蛋白 将 4 组生长良好的细胞取出,PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤 2 次,加入细胞裂解液,提取总蛋白,蛋白质定量试剂盒(BCA 法)测蛋白浓度。制胶,上样进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭,一抗孵

育,二抗孵育,TBST洗3次,每次10 min,滴加ECL发光液,成像仪中拍照并分析灰度值。实验独立重复3次,再进行统计学分析。

1.2.4 细胞 ATP 检测 PBS清洗细胞3次,加入ATP检测裂解液,冰上裂解细胞,用细胞刮子刮下细胞至离心管中,离心,吸取上清,加入不透光的白色96孔板中,每组3个复孔,按照增强型ATP检测试剂盒说明书操作测定细胞ATP含量,BCA法测样品蛋白浓度,根据以下公式计算细胞ATP含量:ATP含量=(样本吸光度值-空白吸光度值)÷(标准品吸光度值-空白吸光度值)×标准品浓度×样本稀释倍数÷样本蛋白浓度。

1.2.5 线粒体 ATP 检测 使用碧云天细胞线粒体分离试剂盒分离提取线粒体,线粒体储存液重悬获得线粒体悬液,取部分线粒体悬液加入裂解液裂解线粒体,离心,取上清,BCA法测定线粒体蛋白浓度,调节线粒体蛋白浓度为5 mg/mL,将样本加入96孔UV板中,每组3个复孔,按照微量法ATP检测试剂盒说明测定线粒体ATP含量。

1.2.6 线粒体活性氧自由基(ROS)检测 取步骤1.2.5中提取的线粒体,调节线粒体蛋白浓度为5 mg/mL,每组3瓶标本,加入HEPES缓冲液重悬,加入5 μmol/L二氯荧光素二酯(DCFH-DA),37℃作用10 min对ROS进行标记,荧光分光光度计检测荧光强度。

1.2.7 MMP水平检测 JC-1单染法检测MMP水平,消化、收集并重悬细胞,均匀接种于12孔板,每组3个复孔,孵箱孵育24 h,加入JC-1染色工作液,37℃下孵育20 min,JC-1染色缓冲液洗涤3次,弃上清,加入完全培养基,荧光显微镜下拍照,Image J分析JC-1聚合物平均荧光值。

1.3 统计学分析

使用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料均进行正态性检验和方差齐性检验,服从正态分布的数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异性比较,非正态分布则采用秩和检验,应用GraphPad Prism 8.0软件绘制统计图, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒构建和细胞转染结果

DNA测序结果表明,HARS2基因预期位点发生了突变,第349位碱基发生G→A突变,第908位碱

基发生T→C突变,见图1。慢病毒转染细胞经嘌呤霉素筛选2周后,在荧光显微镜明视野下见HEK 293T细胞呈片状贴壁生长,细胞融合率达80%以上,细胞纯度高,生长良好,荧光视野下EGFP绿色荧光稳定表达,见图2。

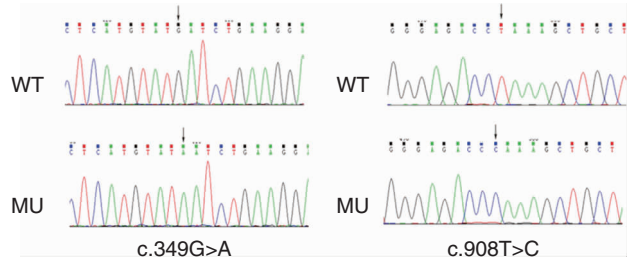


图1 DNA测序结果 注:WT(野生型序列);MU(定点突变型序列);箭头(突变位点)。

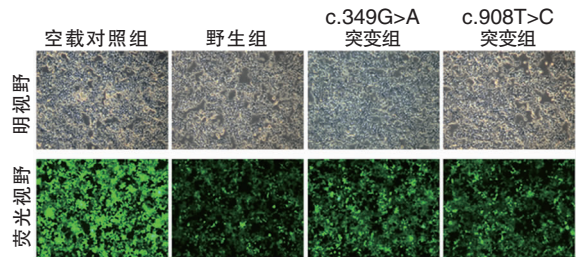


图2 嘌呤霉素筛选2周,转染细胞EGFP蛋白绿色荧光表达情况(×100)

2.2 CCK8 检测结果

HARS2基因c.349G>A和c.908T>C突变细胞组增殖较野生组和对对照组慢,与野生组相比,c.349G>A和c.908T>C突变组细胞在72 h的吸光度降低($P = 0.013$, $P = 0.012$)。结果表明HARS2基因新突变导致细胞增殖变缓,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图3。

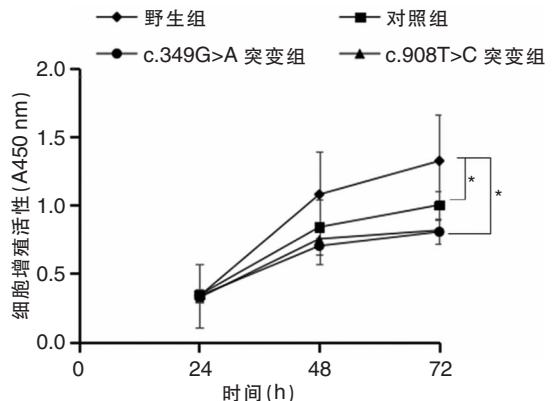


图3 HEK 293T细胞生长曲线 注:*与野生组细胞相比。

2.3 MTCO₂ 蛋白表达结果

MTCO₂ 是线粒体 DNA 编码的呼吸链复合物 IV 亚基,Western 印迹法检测野生组、突变组和对照组的 MTCO₂ 蛋白表达,结果显示 c.349G>A 突变组 MTCO₂ 蛋白表达量较野生组降低 31.07% ($P=0.015$),较对照组降低 29% ($P=0.020$),c.908T>C 突变组 MTCO₂ 蛋白表达量较野生组和对照组有所下降,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明 *HARS2* 基因 c.349G>A 突变降低线粒体蛋白 MTCO₂ 的合成,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4。

2.4 各组 ATP 检测结果

为探究突变对细胞线粒体产能能力的影响,采用萤火虫萤光素酶/萤光素法检测细胞 ATP 含量,微量法检测线粒体 ATP 含量,计算结果以对照组平均值为参照做标准化处理。实验结果显示各细胞系 ATP 合成量无明显差异,与对照组相比,c.349G>A 和 c.908T>C 突变组线粒体 ATP 相对细胞总 ATP 的产率分别降低了 22.46% ($P=0.031$)、28.99%

($P=0.01$),结果表明这两种突变均导致线粒体 ATP 合成效率下降,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),见图 5。

2.5 各组线粒体 ROS 含量检测结果

提取线粒体,采用荧光分光光度技术对转染野生型和突变型质粒的 HEK 293T 细胞进行线粒体 ROS 检测,以对照组平均值为参照做标准化处理。结果显示,与对照组相比,c.349G>A 突变组线粒体 ROS 水平增加了 77.72% ($P=0.039$)。结果表明,*HARS2* 基因 c.349G>A 突变促进线粒体 ROS 的产生,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),见图 6。

2.6 各组 MMP 比较

当 MMP 高时,JC-1 得以聚集在基质中,形成聚合物,产生红色荧光。实验结果显示,与野生组相比,c.349G>A 和 c.908T>C 突变组线粒体 JC-1 聚合物荧光值下降 ($P=0.003, P=0.004$)。实验结果表明 *HARS2* 基因新突变均导致 MMP 下降,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),见图 7。

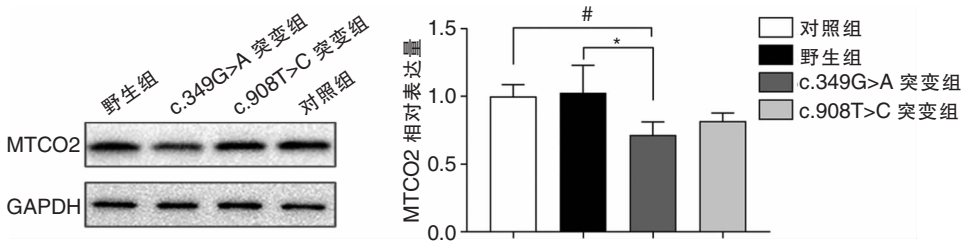


图 4 各组线粒体蛋白 MTCO₂ 表达量 注:与野生组相比,* $P<0.05$;与对照组相比,# $P<0.05$ 。

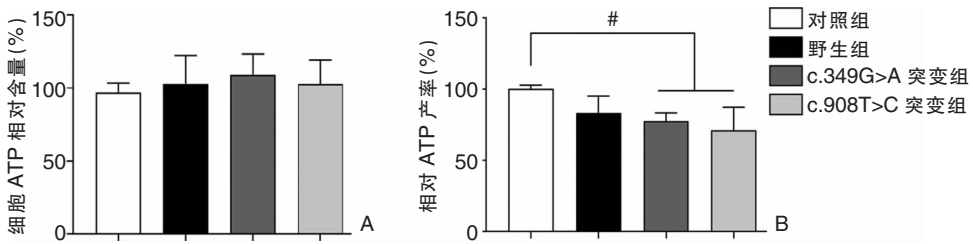


图 5 各组细胞总 ATP 测定(A)与线粒体 ATP 相对细胞总 ATP 产率(B)的柱状图 注:与对照组相比,# $P<0.05$ 。

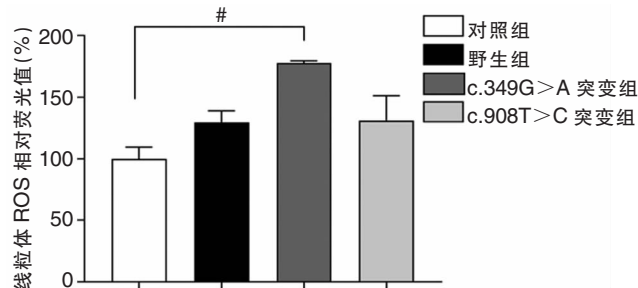


图 6 各组线粒体 ROS 相对荧光值柱状图 注:与对照组相比,# $P<0.05$;ROS(活性氧自由基)。

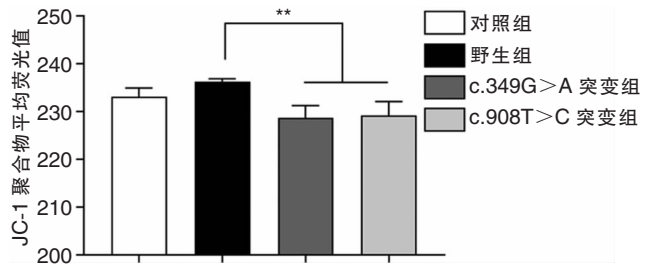


图 7 各组线粒体 JC-1 聚合物平均荧光值柱状图 注:与野生组相比,** $P<0.01$ 。

3 讨论

耳蜗毛细胞的顶端分布有专门的线粒体亚群,血管纹边缘细胞负载大量的线粒体,线粒体产能、 Ca^{2+} 缓冲、线粒体代谢等对于耳蜗发挥正常的听觉感受和听觉信号传递具有重要作用^[10]。线粒体功能紊乱是导致听觉障碍的重要病理过程^[11-12]。*HARS2* 基因编码的线粒体组氨酰 tRNA 合成酶是线粒体蛋白质合成反应及质量控制的关键酶之一,*HARS2* 突变通过抑制线粒体翻译,影响线粒体蛋白质合成,导致线粒体功能缺陷^[13]。小鼠实验研究表明 *HARS2* 基因于小鼠出生后在小鼠耳蜗,包括内毛细胞和外毛细胞中稳定表达,*HARS2* 对于毛细胞的生存和功能至关重要,敲除 *HARS2* 基因的小鼠耳蜗组织中线粒体明显受损,小鼠表现出类似于 Perrault 综合征的快速进行性听力损失^[14]。为探究 *HARS2* 基因新突变对线粒体功能的影响,用慢病毒包装携带野生型和突变型 *HARS2* 基因的质粒转染 HEK 293T 细胞,质粒测序验证质粒 DNA 发生 349G > A、908T > C 突变,EGFP 标签蛋白荧光表达表明携带野生型、突变型 *HARS2* 基因的重组质粒及空载质粒在 HEK 293T 细胞中稳定表达。

线粒体氧化磷酸化主要通过 5 个多亚基复合物完成,复合物 I-V 构成电子传递链,参与电子传输并产生质子电化学梯度,最终通过复合物 V 将 ADP 转化为 ATP。MTCO₂ 是由线粒体 DNA 编码的组成复合物 IV 活性中心的亚基,Western 印迹法检测发现 *HARS2* 基因 c. 349G > A 突变的细胞 MTCO₂ 的表达量下降,说明 *HARS2* 基因突变阻碍线粒体翻译过程和线粒体蛋白的表达,可能进一步抑制线粒体氧化磷酸化作用。ATP 检测结果表明突变细胞总 ATP 产生水平无变化,但两突变组线粒体 ATP 相对细胞总 ATP 产率降低,说明 *HARS2* 基因新突变不影响细胞总 ATP 合成,但突变引起的呼吸功能缺陷导致线粒体 ATP 合成效率降低。突变细胞线粒体 ATP 产量的减少可能是线粒体质子电化学电位梯度降低的结果^[15]。线粒体功能缺陷的细胞对增加的 ATP 需求特别敏感^[16],线粒体通过向糖酵解转化补偿线粒体氧化磷酸化受损造成的能量缺失,维持能量平衡。线粒体在进行有氧呼吸过程中,不断通过电子传递链泄漏出单电子还原氧分子,产生 ROS^[17]。生理情况下,机体氧化和抗氧化系统处于抗衡状态,若线粒体电子传递链受阻,会增加 ROS 的产生,启动机体

内源性氧化应激,造成细胞损伤^[18]。此次研究表明携带 *HARS2* 基因 c. 349G > A 突变的细胞相对对照组细胞的线粒体 ROS 含量明显升高,说明 *HARS2* 基因 c. 349G > A 突变可能通过损伤线粒体电子传递链促进线粒体 ROS 的产生。呼吸链复合物活性不足往往会改变 MMP,MMP 反映了电子链传递和氧化磷酸化过程中氢离子的跨膜运输,是细胞活力的一个关键指标^[19]。利用 JC-1 探针检测发现携带 *HARS2* 基因 c. 349G > A 和 c. 908T > C 突变的细胞 MMP 较野生型细胞下降。ROS 的积累会导致细胞和线粒体膜脂质过氧化,对 MMP 产生负效应,MMP 下降会促进 ROS 的产生,二者之间形成恶性循环,共同影响细胞活力^[20]。而耳蜗对 ROS 的增加以及细胞氧化还原状态的改变高度易感^[21-22],这或许是 *HARS2* 基因突变导致耳蜗功能障碍及听力损失的内在机制。

线粒体不仅能产生能量维持细胞生命活动,还能调控细胞内部氧化还原平衡,调节钙稳态和细胞存活,是细胞增殖的基石^[23]。*HARS2* 作为一种线粒体氨酰化反应酶蛋白,参与线粒体复合物亚基的合成,其细胞功能可能与线粒体氧化磷酸化密切相关。为进一步研究 *HARS2* 基因突变对细胞增殖的影响,采用 CCK8 法测得细胞增殖曲线,结果表明携带 *HARS2* 基因 c. 349G > A 和 c. 908T > C 突变的细胞增殖能力降低。*HARS2* 突变所致的线粒体翻译受抑制和呼吸功能障碍转化为整体细胞健康和生长缺陷。

综上,该研究通过构建携带野生型、突变型 *HARS2* 基因和空病毒载体的 HEK 293T 细胞研究突变对细胞线粒体功能的影响,研究结果表明 *HARS2* 基因 c. 349G > A 突变抑制线粒体蛋白 MTCO₂ 的表达,促进线粒体 ROS 的产生,c. 349G > A 和 c. 908T > C 突变降低线粒体 ATP 的合成效率,导致 MMP 下降,减弱细胞增殖能力。故此推测 *HARS2* 基因新突变位点所致的线粒体功能障碍和细胞增殖能力降低可能是 Perrault 综合征的发病机制,为临床诊断提供理论依据和实验基础。

参考文献:

- [1] Pan Z, Xu H, Tian Y, et al. Perrault syndrome: clinical report and retrospective analysis[J]. Mol Genet Genomic Med, 2020, 8(10): e1445.
- [2] Pierce SB, Chisholm KM, Lynch ED, et al. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase *HARS2* cause ovarian dysgene-

- sis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(16): 6543–6548.
- [3] Souissi A, Said BM, Frikha F, et al. Expanding the clinical and molecular spectrum of HARS2-Perrault syndrome: identification of a novel homozygous missense variant in the HARS2 gene [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2021, 25(8): 528–539.
- [4] Lerat J, Jonard L, Loundon N, et al. An application of NGS for molecular investigations in Perrault syndrome: study of 14 families and review of the literature [J]. Hum Mutat, 2016, 37(12): 1354–1362.
- [5] Karstensen HG, Rendtorff ND, Hindbaek LS, et al. Novel HARS2 missense variants identified in individuals with sensorineural hearing impairment and Perrault syndrome[J]. Eur J Med Genet, 2020, 63(3): 103733.
- [6] Demain LAM, Gerkes EH, Smith RJH, et al. A recurrent missense variant in HARS2 results in variable sensorineural hearing loss in three unrelated families[J]. J Hum Genet, 2020, 65(3): 305–311.
- [7] Zou S, Mei X, Yang W, et al. Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic and candidate variants in sporadic Chinese Han deaf patients[J]. Clin Genet, 2020, 97(2): 352–356.
- [8] Faridi R, Rea A, Fenollar-Ferrer C, et al. New insights into Perrault syndrome, a clinically and genetically heterogeneous disorder [J]. Hum Genet, 2022, 141(3–4): 805–819.
- [9] 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.
- [10] Lesus J, Arias K, Kulaga J, et al. Why study inner ear hair cell mitochondria? [J]. HNO, 2019, 67(6): 429–433.
- [11] Fujimoto C, Yamasoba T. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of hearing loss: a systematic review[J]. Antioxidants (Basel), 2019, 8(4):109.
- [12] Kullar PJ, Quail J, Lindsey P, et al. Both mitochondrial DNA and mitonuclear gene mutations cause hearing loss through cochlear dysfunction[J]. Brain,2016,139(Pt 6): e33.
- [13] Antonellis A, Green ED. The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008, 9: 87–107.
- [14] Xu P, Wang L, Peng H, et al. Disruption of Hars2 in cochlear hair cells causes progressive mitochondrial dysfunction and hearing loss in mice[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 804345.
- [15] James AM, Sheard PW, Wei YH, et al. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations[J]. Eur J Biochem, 1999, 259(1–2): 462–469.
- [16] Gong S, Peng Y, Jiang P, et al. A deafness-associated tRNA^{His} mutation alters the mitochondrial function, ROS production and membrane potential [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(12): 8039–8048.
- [17] Ryan J Mailloux. An update on methods and approaches for interrogating mitochondrial reactive oxygen species production [J]. Redox Biol, 2021, 45: 102044.
- [18] Kamogashira T, Fujimoto C, Yamasoba T. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss[J]. Biomed Res Int,2015,2015: 617207.
- [19] Szczepanowska J, Malinska D, Wieckowski MR, et al. Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics[J]. Biochim Biophys Acta,2012,1817(10): 1740–1746.
- [20] Böttger EC, Schacht J. The mitochondrion: a perpetrator of acquired hearing loss[J]. Hear Res, 2013, 303: 12–19.
- [21] Fu X, Wan P, Li P, et al. Mechanism and prevention of ototoxicity induced by aminoglycosides [J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 692762.
- [22] 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.
- [23] 化朝举,代斐,邓瑶,等. EF4 影响线粒体氧化磷酸化并调控膀胱癌细胞增殖及迁移[J]. 生物化学与生物物理进展,2021,48(3):317–327.

(收稿日期:2022-04-09)

本文引用格式:宋坭洁,费静,廖娜,等. Perrault 综合征 *HARS2* 基因 c.349G>A 和 c.908T>C 突变对细胞线粒体功能的影响[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2023,29(4):14–19. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322130

Cite this article as: SONG Lijie, FEI Jing, LIAO Na, et al. Effects of c.349G>A and c.908T>C mutations in *HARS2* gene of Perrault syndrome on mitochondrial function[J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2023, 29(4):14–19. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322130