

## circ-ITGA7 上调 ASXL1 抑制结直肠癌细胞的增殖

杨光谱<sup>1</sup>, 叶锦宁<sup>1</sup>, 陈剑辉<sup>1</sup>, 陈斯乐<sup>1</sup>, 叶志君<sup>1</sup>, 许开武<sup>1</sup>, 王昭<sup>1</sup>, 陈创奇<sup>1</sup>, 蔡世荣<sup>1</sup>, 马晋平<sup>1</sup>(1.中山大学附属第一医院胃肠外科中心, 广东 广州 510800)

**【摘要】** **目的** 探讨 circ-ITGA7 是否通过上调 ASXL1 抑制结直肠癌细胞增殖。**方法** 采用 RT-qPCR 检测结直肠癌及癌旁组织中 circ-ITGA7 和 ASXL1 mRNA 表达水平, 并用皮尔森相关性分析检测其相关性。RT-qPCR 检测结直肠癌细胞株与正常肠道粘膜细胞株 circ-ITGA7 表达差异。采用质粒转染法在 HCT116 细胞中过表达 circ-ITGA7, 以 RT-qPCR 和 western blot 检测 ASXL1 的 mRNA 与蛋白表达水平。Cck-8 对比 circ-ITGA7 过表达与否的 HCT116 细胞 7 天内的增殖活性。通过转染 siRNA 与质粒, 以 HCT116 细胞集落形成实验对比过表达 circ-ITGA7 和沉默 ASXL1 对 HCT116 细胞集落形成数量的影响。**结果** RT-qPCR 结果显示, circ-ITGA7 在结直肠癌组织与细胞株中表达显著低于癌旁组织和正常肠道粘膜组织细胞株, 且其在结直肠癌组织中与 ASXL1 的表达呈正相关性。过表达 circ-ITGA7 组的 ASXL1 蛋白及 mRNA 的表达水平显著高于对照组。Cck-8 检测示, 过表达 circ-ITGA7 组的吸光度于第 5、6、7 天显著低于对照组。细胞集落形成实验示, 过表达 circ-ITGA7 组 HCT116 细胞的集落形成数量显著低于对照组, circ-ITGA7 过表达且 si-ASXL1 沉默组与对照组差异无统计学意义。**结论** Circ-ITGA7 通过上调 ASXL1 抑制结直肠癌细胞增殖。

**【关键词】** Circ-ITGA7; ASXL1; 结直肠癌

**Circ-ITGA7 inhibits HCT116 proliferation by upregulating ASXL1** YANG Guang-pu<sup>1</sup>, YE Jin-ning<sup>1</sup>, CHEN Jian-hui<sup>1</sup>, CHEN Si-le<sup>1</sup>, YE Zhi-jun<sup>1</sup>, XU Kai-wu<sup>1</sup>, WANG Zhao<sup>1</sup>, CHEN Chuang-qi<sup>1</sup>, CAI Shi-rong<sup>1</sup>, MA Jin-ping<sup>1</sup> (1. Centre of gastrointestinal surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangdong Province, Guangzhou, 510800)

Corresponding author: Ma Jin-ping, Email: dr\_lancetty@163.com

**【Abstract】** **Objective** This study aims to verify if circ-ITGA7 inhibits proliferation of HCT116 cells via upregulating ASXL1. **Methods** RT-qPCR was employed to compare the RNA expression level of circ-ITGA7 and ASXL1 in colorectal cancer and para-cancerous tissue. Pearson's Correlation Test was used to assess their correlation. RT-qPCR was used to test the circ-ITGA7 expression levels in HCT116、HT29、DLD1、SW480 and NCM460 cells. circ-ITGA7 vectors were transfected to build over-expressed HCT116 cells. Protein and mRNA expression were tested by RT-qPCR and western blot. The effect of circ-ITGA7 on proliferation in HCT116 cells was tested by cck-8 kit. Colonies formation assay was employed to assess the effect of circ-ITGA7 over-expression and ASXL1 silence on the colony formation of HCT116 cells. **Results** Compared with para-cancerous tissue and NCM460 cells, the expression of circ-ITGA7 is significantly lower in colorectal cancer and in in-vitro colorectal cancer cell lines respectively. Circ-ITGA7 is positively correlated with the mRNA expression of ASXL1. Overexpression of circ-ITGA7 statistically generates more ASXL1 mRNA and protein than blank group. Overexpression of circ-ITGA7 generates significantly more OD on 5 th, 6 th and 7 th day than control group. The number of colonies formatted by the circ-ITGA7 over-expressed cells was significantly lower than control group. Co-transfection of circ-ITGA7 and si-ASXL1 makes more colonies than transfection of circ-ITGA7 only. **Conclusion** circ-ITGA7 inhibits HCT116 pro-

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81702878); 广州市科协科普经费计划项目(K2018070201005)

作者简介: 杨光谱, 硕士研究生, E-mail: yanggp522@163.com;

通讯作者: 马晋平, 主任医师, 教授, E-mail: dr\_lancetty@163.com

liferation via upregulating ASXL1.

**【Key words】** circ-ITGA7; ASXL1; Colorectal cancer

环状 RNA 是一类不具有 5' 至 3' 端线性结构, 而以共价形式结合成三维环状结构的基因表达产物, 它们在细胞核内外发挥着结合微小 RNA 及 RNA 结合蛋白、mRNA 剪切的功能, 极少数具有翻译蛋白质的可能<sup>[1, 2]</sup>。结直肠癌的发生、发展机制包括基因突变, 染色体不稳定、DNA 修复缺陷、微卫星不稳定、CpG 岛甲基化表型变化等, 它们在结直肠癌的发展过程中扮演着举足轻重的角色<sup>[3-5]</sup>。近年来, 环状 RNA 在肿瘤形成和进展中的重要功能亦引起了学者重视。一些环状 RNA 已被证实对于结直肠癌细胞增殖、侵袭具有重要影响, 它们包括 ciRS7、hsa\_circ\_0020397、hsa\_circ\_0071589、circ\_HIPK3、circ\_0026344、circ\_001569、hsa\_circ\_000984<sup>[6-12]</sup>。然而, 更多与结直肠癌发生与发展有关的环状 RNA 的表达谱及功能仍亟待探索和研究。ITGA7 基因位于人类染色体 12q13, 该基因低表达与恶性胸膜间皮瘤的发生具有相关性<sup>[13]</sup>, 本文依据前期对部分结直肠癌组织的二代基因测序结果, 推测 circ-ITGA7 在结直肠癌组织与正常肠道粘膜组织中的表达之间存在差异, 而有关 circ-ITGA7 在结直肠癌中的功能报道较少。人类 ASXL1 基因同源于果蝇 *Asx* 基因, 生理状态下对细胞分裂与增殖过程发挥双向调控作用<sup>[14]</sup>, 但其上游调控机制尚不清楚。本文通过探索 circ-ITGA 在结直肠癌组织、结直肠癌细胞株中的表达及其对细胞增殖功能的作用, 探究 circ-ITGA7 是否通过调控 ASXL-1 影响结直肠癌细胞的增殖, 为进一步寻找结直肠癌的早期诊断新指标及治疗新靶点提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养及转染** 本研究使用的 SW480、DLD1、HT29、HCT116、NCM460 细胞株购自美国种质包藏中心(ATCC), 并按照 ATCC 推荐条件及方法培养。对于 SW480 细胞, 基本培养基采用 Leibovitz's L-15 培养基; 对于 HCT116、HT29 则采用改良 McCoy's 5 a 培养基; DLD-1 与 NCM460 培养于 RPMI-1640 培养基中。完全培养基由各基本培养基混合 10% 胎牛血清(Gibco, 美国)制成; 传代采用每孔 1 ml 0.25% (w/v) 胰酶-0.53 mM EDTA

溶液, 在 37℃ 条件下消化细胞 2~4 分钟, 以 10 ml 完全培养基终止消化, 1500 转离心细胞悬浮液, 弃去上清液后加入完全培养基重悬细胞, 使用血球计数板计数后接种细胞。在 6 孔板中培养增殖至占据培养板底面积 60~70% 时, 使用 Lipofectamine 2000 试剂盒(赛默飞世尔, 美国), 将 siRNA 序列(锐博, 中国)以 10 ng:1 μL stem reagent 的比例溶解于 50 倍体积的基本培养基中, 室温静置 10 min 后以 50 μL/孔加入各组细胞共同培养。质粒转染采用 Lipofectamine 3000 试剂盒(赛默飞世尔, 美国), 根据操作说明, 将 2 μg/μL 过表达质粒 DNA(锐博, 中国), 4 uL/μL stem reagent 溶于基本培养基中室温培育 15 分钟后, 以 250 μL/孔加入各孔, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养。本研究使用的 siRNA 序列为: Si-ASXL1(1): GCTGATGCTGAATTACTCAT; si-ASXL1(2): GCTTCTGTAAGTATGCTCTAT。

**1.2 标本收集** 研究使用的结直肠癌与癌旁正常肠道粘膜组织标本, 来自于 2018 年 3 月到 5 月内连续收治于中山大学附属第一医院胃肠外科中心, 病理诊断为结直肠癌的 20 例患者。在标本离体 30 min 内, 将肿瘤组织及癌旁组织用流水冲洗干净, 剪下 0.5 cm<sup>3</sup> 标本浸入 RNAlater 中(赛默飞世尔, 美国), 保存液体积不小于标本体积的 5 倍, 浸入后立刻置于冰上运输, 30 分钟内转移到-80℃ 冰箱保存。获取肿瘤组织时应避开组织中心坏死、机化部分, 获取的癌旁组织应为距离肿瘤组织 5 cm 以上的正常肠道粘膜组织<sup>[15]</sup>。

**1.3 实时荧光定量 RCR** 采用 TRIzol(Invitrogen, 美国)、TriPure Isolation Reagent 试剂盒(罗氏, 美国)和 GeneJET RNA 提纯试剂盒(Invitrogen)分别收集细胞和组织 RNA。使用 KAPA SYBR<sup>®</sup> FAST qPCR Master Mix(Kapa Biosystems, 美国)及 CFX96(波导, 美国)实时定量 PCR 检测扩增荧光强度, 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算基因表达水平。对于环状 RNA 和 mRNA, 研究采用 GAPDH 水平作为内参。本研究使用的引物有:

ASXL-1 引物序列为 F: TCAGAGCAATGTTACAGGCCA, R: CTGTTCTCGGCAT TTGCCTT;

circ-ITGA7 的引物序列为 F: GTGTGCACAGG

TCCTTCCAA, R: TGGAAGTTCTGTGAGGGACG。

**1.4 Western Blot** 将细胞以每孔 100  $\mu$ l RIPA 裂解液置于冰上裂解 30 min, 以细胞刮刀将细胞刮下并离心保存。BCA 法测定样品蛋白浓度。跑胶前 100 $^{\circ}$ C 蛋白变性, 以每孔 50  $\mu$ g 蛋白上样, 120V 恒压电泳至 Marker 分离, 冰浴横流 395 mA 横流转膜 180 分钟, 5% 脱脂牛奶封闭后以抗 ASXL1 多克隆抗体 (Cell Signaling Technology, 美国, 1:1000) 或抗 GAPDH 单克隆抗体 (碧云天, 中国, 1:1000) 4 $^{\circ}$ C 摇动孵育过夜, 羊抗兔荧光标记抗体 (碧云天, 中国, 1:500) 孵育 2 h, 浸于发光液中 2 min, 发光仪室内曝光拍照。

**1.5 细胞增殖功能实验** CCK-8 检测依照 cck-8 试剂盒 (东仁, 日本) 执行, 将细胞以 5000/cm<sup>2</sup> 接种到 96 孔细胞培养板 (康宁, 美国), 分别在培养 1、2、3、4、5、6、7 天后加入 10  $\mu$ l CCK-8 工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 小时后, 在酶标仪中 (BioTek, 美国) 于 450 nm 波长处测得吸光度 OD 值。细胞集落形成实验中, 细胞以 500 个/孔的密度种植于 6 孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 14 天, 以 0.5 ml/孔甲醇固定 20 min, 0.5% 结晶紫溶液 (碧云天, 中国) 染色 15 min 后镜下观察记录。

**1.6 统计** 采用 SPSS 软件 (Version 20.0, SPSS Inc, 美国) 计算, 两组间连续变量比较采用 *t* 检验检测, 多组连续变量比较采取单因素方差分析法检测, 两组连续变量相关性采用皮尔森相关性分析法检测, 结果均以平均值 $\pm$ 标准差形式报道,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 circ-ITGA7 在结直肠癌组织及细胞株中低表达, 且与 ASXL1 的表达具有正相关性** 采用 RT-qPCR 对比 20 对癌组织及癌旁组织中 circ-ITGA7

的表达水平, 结果示癌组织中 circ-ITGA7 的表达水平低于癌旁组织, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1A)。体外培养 HCT116、HT29、DLD1、SW480 及 NCM460 细胞株, RT-qPCR 结果示 circ-ITGA7 在结直肠癌细胞株 (HCT116、HT29、DLD1、SW480) 中表达低于正常肠道粘膜组织细胞株 NCM460, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 1B)。在结直肠癌组织中, circ-ITGA7 的表达水平与 ASXL1 的 mRNA 水平具有正相关性 ( $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.67$ ) (图 1C)。

**2.2 过表达 circ-ITGA7 可上调 HCT116 细胞 ASXL1 的 mRNA 及蛋白水平** 将 circ-ITGA7 载体和空载体转染入 HCT116 细胞株, RT-qPCR 和 western blot 检测 ASXL1 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果示, 对于 HCT116 细胞株, 过表达 circ-ITGA7 可提高 ASXL1 mRNA ( $P < 0.05$ ) 及蛋白 ( $P < 0.05$ ) 的表达水平, 差异具有统计学意义 (图 2)。

**2.3 circ-ITGA7 通过上调 ASXL1 抑制结直肠癌细胞增殖** 研究应用 cck-8 试剂盒检测对比了过表达 circ-ITGA7 与空质粒对照组的 HCT116 增殖活动, 结果示, 过表达 circ-ITGA7 的 HCT116 细胞在第 5、6、7 天吸光度值高于对照组, 差异具有统计学意义 (图 3A)。为进一步验证 ASXL1 在 circ-ITGA7 抑制细胞增殖过程中的作用, 研究应用细胞集落形成实验对比了 circ-ITGA7 过表达与 ASXL1 沉默对细胞集落形成数量的影响, 结果提示, circ-ITGA7 过表达组形成的细胞集落数量显著低于对照组, circ-ITGA7 过表达同时沉默 ASXL1 组的细胞集落数量与对照组无统计学差异, 但显著高于 circ-ITGA7 过表达组 (图 3B)。

## 3 讨论

环状 RNA 的分布广泛, 且参与增殖、分化等多个细胞功能, 亦可由外泌体进入细胞外液, 是

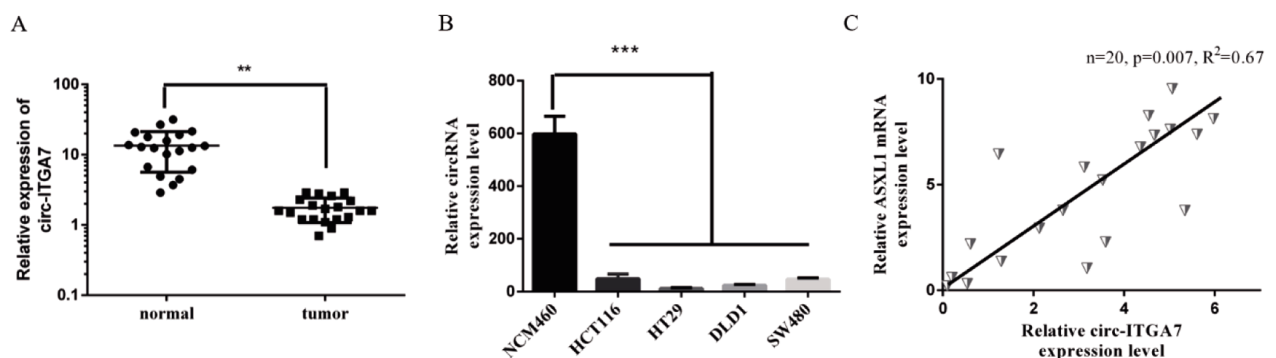


图 1 circ-ITGA7 在结直肠癌组织及细胞中的表达

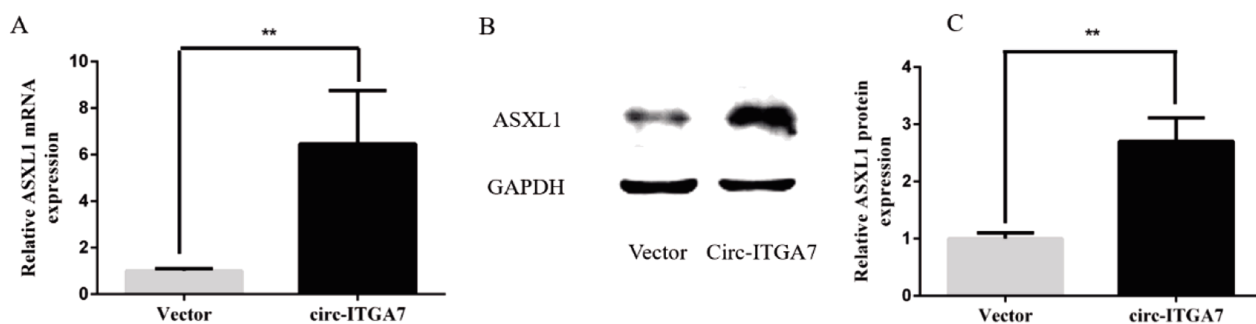


图2 circ-ITGA7 过表达对 HCT116 细胞中 ASXL1 表达的影响

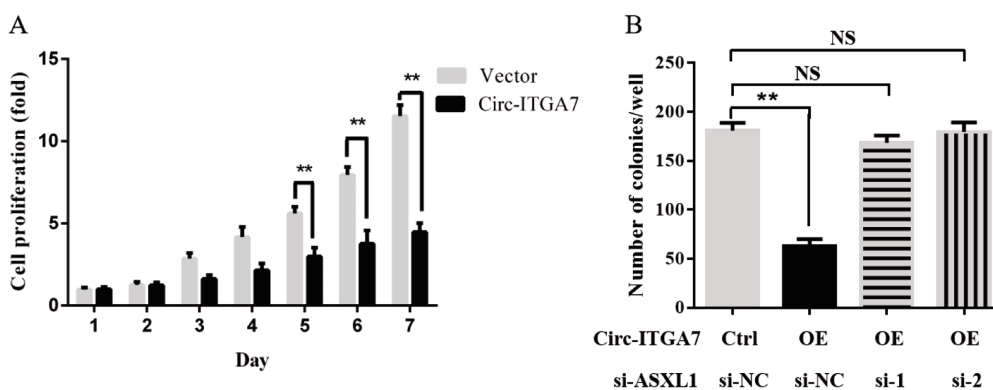


图3 circ-ITGA7 过表达及 ASXL1 沉默对结直肠癌细胞增殖的影响

最具潜力的潜在肿瘤标记物和治疗靶点 [16-18]。近期,学者已研究了一些在结直肠癌中发挥作用的环状 RNA。相较于癌旁正常粘膜组织,在结直肠癌组织中高表达的环状 RNA 包括 ciRS7、circ\_HIPK3、circ\_001569、hsa\_circ-000984 及 hsa\_circ\_0020397 [4,6,7,9,10]; 低表达的包括 hsa\_circ\_0071589 及 circ\_0026344 [5,8]。本文着眼于 circ-ITGA7 对结直肠癌细胞增殖的作用,探究 circ-ITGA7 在结直肠癌细胞中可能作用的靶基因。

一些学者已报道 ITGA7 基因与恶性疾病相关。在恶性胸膜间皮瘤组织中,ITGA7 的低表达和肿瘤的转移具有相关性 [13]。正常的 ITGA7 表达是抑制前列腺癌和黑色素瘤转移和侵袭的条件 [19,20]。本研究对比结直肠癌组织与癌旁正常粘膜组织,结直肠癌细胞株与肠道粘膜组织细胞株,认为结直肠癌组织及细胞中 circ-ITGA7 低表达,并在体外细胞株中证实 circ-ITGA7 具有抑制结直肠癌细胞增殖,且促进其凋亡的作用。Li 等 [21] 的一项同期研究也报道了类似的结果, Li 等应用集落形成实验与 cck-8 增殖实验的方法,提出 circ-ITGA7 过表达抑制 RKO 和 SW620 细胞的增殖。本研究在与之不同的细胞系,即 HCT116 细胞中亦得出此

结果,进一步巩固了 circ-ITGA7 对结直肠癌增殖的抑制作用。

环状 RNA 的功能尚未完全明确,已知的生物功能包括分子海绵、蛋白质的翻译、RNA 的剪切,其中,分子海绵作用目前被认为是环状 RNA 最主要的作用形式 [22,23]。环状 RNA 的“分子海绵”作用与其碱基配对有关。在前期课题中,生物信息库 TargetScan, miRDB, miRTarbase 及 miRMap 提示 circ-ITGA7 序列段 CCAAATTGTCATGGCCTT GGG 及 TCATCCCGGATGGCCAGGTCC 可能通过某微小 RNA 作用于 ASXL1 序列段 CCGCCGCCCC AGCCCCGCGCC, 推测 ASXL1 可能是 circ-ITGA7 的作用靶点所在。本研究从临床组织标本出发,证实 circ-ITGA7 与 ASXL-1 mRNA 在结直肠癌组织中表达水平具有正相关性,进一步地,证明体外过表达 circ-ITGA7 能够上调 HCT116 细胞 ASXL1 基因及蛋白的表达水平,初步证实了 circ-ITGA7 在结直肠癌细胞中对 ASXL1 的上调作用。

ASXL-1 为果蝇 *Asx* 基因的人类同源序列 [14], 生理过程中,该序列作用于视黄酸受体介导的转录过程,可发挥激活和抑制双向活性,对细胞的分裂与增殖起到调控功能。与恶性疾病相关的

ASXL-1 突变,常常导致 ASXL-1 蛋白产物被截短甚至失活<sup>[24, 25]</sup>,因此,ASXL1 表达水平和功能的变化可能在细胞增殖的调控中具有重要作用。本研究利用细胞株的过表达-沉默实验,证实沉默 ASXL1 能够削弱 circ-ITGA7 对结直肠癌细胞增殖活性的抑制。籍此可以认为,在结肠癌组织中,下调的 circ-ITGA7 对 ASXL1 的上调作用减弱,因而促进了结直肠癌细胞的增殖。诚然,本研究结果局限于体外研究,有待动物实验进一步完善得出的结论。未来的探索可着眼于 circ-ITGA7 作用于 ASXL1 的具体机制,如分子海绵、RNA 剪切、蛋白编辑等展开探讨,为 circ-ITGA7 早日服务于临床诊断和治疗提供更加坚实的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Zhang Y, Zhang XO, Chen T, et al. Circular intronic long noncoding RNAs[J]. *Mol Cell*, 2013,51(6):792-806.
- [2] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions [J]. *Development*, 2016,143 (11):1838-1847.
- [3] Kouzminova N, Lu T, Lin AY. Molecular basis of colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2010,362(13):1245-1246, 1246-1247.
- [4] Le DTI, Uram J. N., Wang H., 等. PD-1 阻断在错配修复缺陷的肿瘤中的作用研究 [J]. *消化肿瘤杂志 (电子版)*, 2015,7(02):89.
- [5] 黄跃明,周仕海,陈宏,等. 肿瘤标志物在结直肠癌诊治中的临床应用[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2018,10(01):34-37.
- [6] Weng W, Wei Q, Toden S, et al. Circular RNA ciRS-7-A Promising Prognostic Biomarker and a Potential Therapeutic Target in Colorectal Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017,23(14):3918-3928.
- [7] Yuan Y, Liu W, Zhang Y, et al. CircRNA circ\_0026344 as a prognostic biomarker suppresses colorectal cancer progression via microRNA-21 and microRNA-31 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018,503(2):870-875.
- [8] Xie H, Ren X, Xin S, et al. Emerging roles of circRNA\_001569 targeting miR-145 in the proliferation and invasion of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016,7(18):26680-26691.
- [9] Zhang XL, Xu LL, Wang F. Hsa\_circ\_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1[J]. *Cell Biol Int*, 2017,41(9):1056-1064.
- [10] Yong W, Zhuoqi X, Baocheng W, et al. Hsa\_circ\_0071589 promotes carcinogenesis via the miR-600/EZH2 axis in colorectal cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018,102:1188-1194.
- [11] Zeng K, Chen X, Xu M, et al. CircHIPK3 promotes colorectal cancer growth and metastasis by sponging miR-7 [J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(4):417.
- [12] Xu XW, Zheng BA, Hu ZM, et al. Circular RNA hsa\_circ\_000984 promotes colon cancer growth and metastasis by sponging miR-106b [J]. *Oncotarget*, 2017,8 (53):91674-91683.
- [13] Laszlo V, Hoda MA, Garay T, et al. Epigenetic down-regulation of integrin alpha7 increases migratory potential and confers poor prognosis in malignant pleural mesothelioma [J]. *J Pathol*, 2015,237(2):203-214.
- [14] Katoh M. Functional and cancer genomics of ASXL family members[J]. *Br J Cancer*, 2013,109(2):299-306.
- [15] 肖韵,杨东杰,王维佳,等. 胃肠肿瘤组织标本库的取材与质量控制规范[J]. *消化肿瘤杂志(电子版)*, 2018,10(01):7-10.
- [16] Wang P, He X. Current research on circular RNAs associated with colorectal cancer[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2017,52(11):1203-1210.
- [17] Madhavan B, Yue S, Galli U, et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity [J]. *Int J Cancer*, 2015,136(11):2616-2627.
- [18] Dou Y, Cha DJ, Franklin JL, et al. Circular RNAs are down-regulated in KRAS mutant colon cancer cells and can be transferred to exosomes[J]. *Sci Rep*, 2016,6:37982.
- [19] Ren B, Yu YP, Tseng GC, et al. Analysis of integrin alpha7 mutations in prostate cancer, liver cancer, glioblastoma multiforme, and leiomyosarcoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007,99(11):868-880.
- [20] Ziober BL, Chen YQ, Ramos DM, et al. Expression of the alpha7beta1 laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential [J]. *Cell Growth Differ*, 1999,10(7):479-490.
- [21] Li X, Wang J, Zhang C, et al. Circular RNA circITGA7 inhibits colorectal cancer growth and metastasis by modulating the Ras pathway and upregulating transcription of its host gene ITGA7 [J]. *J Pathol*, 2018,246(2):166-179.
- [22] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013,495(7441):384-388.
- [23] Wang Y, Mo Y, Gong Z, et al. Circular RNAs in human cancer [J]. *Mol Cancer*, 2017,16(1):25.
- [24] Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1 [J]. *Leukemia*, 2010,24(6):1128-1138.
- [25] Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, et al. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex[J]. *Nat Commun*, 2015,6:7307.