

EZH2 表达与结直肠癌肿瘤细胞增殖和血管生成及预后的关系

侯鸿发, 苏永辉, 卜巨源, 王 霄, 侯冰宗
(中山大学附属第五医院胃肠外科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】探讨果蝇 zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 表达与结直肠癌肿瘤细胞增殖、血管生成及预后的关系。【方法】采用免疫组织化学 MaxVision 两步法检测 110 例手术切除的原发性结直肠腺癌组织中 EZH2、增殖细胞核抗原 (Ki-67) 和 CD34 标记血管内皮细胞计数肿瘤微血管密度 (iMVD) 的表达情况, 并分析其与结直肠癌临床病理特征的关系。用 Pearson 相关系数分析 EZH2、Ki-67 及 iMVD 表达的相关性。用 Kaplan-Meier 法分析生存曲线, 多变量 Cox 比例风险回归模型筛选影响患者生存的独立预后因素。【结果】结直肠癌组织的 EZH2、Ki-67 及 iMVD 阳性表达率分别为 40.91% (45/110)、57.27% (63/110) 和 46.36% (51/110)。结直肠癌远处转移患者的 EZH2 蛋白阳性表达率高于无远处转移患者 ($P=0.024$)。Ki-67 与原发性灶大小、肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关 ($P=0.033\sim 0.015$)。iMVD 与肿瘤的肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关 ($P=0.016\sim 0.034$)。Spearman 相关分析显示 EZH2 与 Ki-67 呈正相关 ($r=0.195, P=0.041$), 而与 iMVD 的表达无关; Ki-67 与 iMVD 呈正相关 ($r=0.213, P=0.025$)。多因素分析结果表明, EZH2 蛋白的表达是结直肠癌患者预后差的独立影响因素 (HR 1.965, 95% CI 1.019~3.789, $P=0.044$)。【结论】结直肠癌组织中 EZH2 过表达与肿瘤细胞的增殖活性有关, 在一定程度上 EZH2 具有判断结直肠癌切除术后转移和预后的价值。

关键词: 结直肠癌; EZH2; Ki-67; CD34; 预后

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)06-0866-07

Prognostic Value of EZH2, Ki-67 and CD34 Expression in Patients with Surgically Treated Colorectal Cancer

HOU Hong-fa, SU Yong-hui, BU Ju-yuan, WANG Xiao, HOU Bing-zong

(Department of Gastrointestinal Surgery, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Corresponding to: HOU Bing-zong, E-mail: sysuhoubz@163.com

Abstract:【Objective】To evaluate the expression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), Ki-67 and intratumoral microvascular density (iMVD) in human colorectal cancer (CRC), and discuss their relationship with the biological behavior and prognosis.【Methods】The expression of EZH2, Ki-67 and iMVD (labeled by CD34 protein) was measured with immunohistochemical MaxVision method in CRC patients followed up over 5 years.【Results】Positive expression rates of EZH2, Ki-67 and iMVD were 40.91% (45/110), 57.27% (63/110) and 46.36% (51/110), respectively. EZH2 expression was positively correlated with distant metastasis ($P=0.024$). Ki-67 expression was positively correlated with tumor size, infiltration depth, AJCC stage and differentiation ($P=0.033\sim 0.015$). The iMVD expression was positively correlated with infiltration depth, AJCC stage and differentiation ($P=0.016\sim 0.034$). Spearman correlation analysis showed that EZH2 expression was positively correlated with Ki-67 expression ($r=0.195, P=0.041$), whereas negatively correlated with iMVD expression. Ki-67 expression had a positive correlation with iMVD ($r=0.213, P=0.025$). Multivariate analysis suggested that the EZH2 expression was an adverse independent factor for survivals of CRC patients (HR 1.965, 95% CI: 1.019~3.789, $P=0.044$ for OS).【Conclusion】EZH2 expression was significantly correlate with the proliferation of tumor cells and may plays an important role in the metastasis and prognosis of CRC.

Key words: colorectal cancer; enhancer of zeste homolog 2 (EZH2); Ki-67; CD34; prognosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6): 866-872]

收稿日期: 2017-07-05

基金项目: 广东省珠海市科技计划项目 (20171009E030027)

作者简介: 侯鸿发, 硕士研究生, 研究方向: 消化肿瘤, E-mail: hohongfa@sina.com; 侯冰宗, 通信作者, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 消化肿瘤, E-mail: houbingzong@163.com

近年来我国结直肠癌的发病率较前有所上升,居恶性肿瘤的第3位,并且在一些经济发达地区其发病率更高^[1]。目前关于结直肠癌发生、发展、侵袭及转移的分子生物学机制尚不十分清楚,但普遍认为其恶性生物学行为是涉及多基因、多步骤的调控过程。多梳蛋白家族(PcG)包括PRC1和PRC2两种复合体,分别起着维持基因抑制状态稳定性和沉默转录启动基因的作用。EZH2与EED、SUZ12基因共同构成PRC2复合物,EZH2作为PRC2的催化亚基,通过其组蛋白甲基转移酶中高度保守的SET区域可催化组蛋白H3的第9、27位(H3K27m3和H3K9m3)赖氨酸进行甲基化修饰,从而抑制多种抑癌基因表达,在染色体水平调节基因活性,包括细胞生长、分化、肿瘤转移等相关基因的表达^[2]。目前,EZH2在结直肠癌中的表达及作用研究有限,无明确诊断,且少有EZH2与结直肠肿瘤细胞增殖、血管生成之间关系的研究。本研究拟采用免疫组化MaxVision两步法检测EZH2在正常结肠组织及结直肠癌组织中的表达,并选择Ki-67指数作为反映结直肠癌增殖活性的指标,CD34标记血管内皮细胞计数肿瘤微血管密度,旨在探讨它们的异常表达与结直肠癌恶性程度和预后之间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料

选取中山大学附属第五医院2009~2011年行结直肠癌根治术病例(术前均未接受新辅助放疗或化疗)标本共110例,其中女性46例41.82%,男性64例58.18%,年龄26~94(63.3±14.4)岁。原发病灶位于结肠的病例72例,位于直肠的病例38例。按最新结肠癌AJCC分期标准^[3],病例涵盖了I、II、III和IV期结直肠癌,其中I+II期46例,III+IV期64例;术前影像学诊断有远处转移的病例27例,无远处转移的病例83例,每例选取癌组织全层取材,术后标本常规石蜡包埋,4 μm切片。本研究经中山大学附属第五医院伦理委员会批准实施。

1.2 免疫组化染色

兔抗人EZH2、CD34和Ki-67单克隆抗体购自福州迈新公司。采用免疫组化MaxVision两步法,按试剂盒说明书进行操作:60℃脱蜡60min;石

蜡切片脱蜡水化;柠檬酸缓冲液(pH=6.0)微波炉高温修复15min;切片浸于3% H₂O₂中,室温下灭活过氧化物酶10min;孵一抗(阴性对照组用PBS代替一抗)湿盒内4℃冰箱过夜;聚合HRP(购自福州迈新公司)标记二抗37℃孵育30min;DAB显色5min;苏木素复染2min;梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片观察。

1.3 结果判定

1.3.1 EZH2和Ki-67的表达判断 光镜下EZH2和Ki-67染色主要位于细胞核,呈棕黄色颗粒为阳性。先观察全视野大小,用网格法划线,在200倍光镜下按随机法选取3个网格视野。癌巢区阳性细胞核着色强度和阳性细胞所占比例综合判断EZH2和Ki-67的染色结果(由病理科医师采用双盲法评测)。染色强度评分标准^[4]:0分(阴性)、1分(淡黄色)、2分(黄色或深黄)和3分(褐色或深褐色)。阳性细胞所占比例:未见阳性细胞为0分、阳性细胞率<25%为1分、25%~50%为2分、>50%为3分。两者计分相乘大于3者为染色阳性。

1.3.2 CD34标记的iMVD结果判定 血管内皮细胞被CD34染成棕黄色,主要密集于肿瘤周围间质中。微血管密度(iMVD)计数方法^[5],在肿瘤区凡是染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计数(管腔大于8个红细胞大小或带有较厚肌层的血管除外),每例先在低倍镜下选择iMVD最高的肿瘤区域,然后在400倍镜下随机计数4个视野内微血管数,再求其平均值。然后进一步将组织分成两组:每高倍镜视野≥平均值为高表达组;每高倍镜视野<平均值为低表达组。

1.4 随访方法

通过查看医院病历记录和电话联系病人或家属获得随访数据。术后第一年随访时间为每隔3个月一次,之后每隔6个月一次。总体生存率(OS)设定为从手术日期到患者因结直肠癌死亡或随访截止时间(2016年12月30日)。中位随访时间为59.5个月(范围26~96月)。

1.5 统计学处理

采用SPSS 20.0统计分析软件,根据数据特征进行 χ^2 检验或Fisher精确检验,结直肠癌中EZH2、Ki-67和iMVD的相关性用Pearson相关分析;Kaplan-Meier检验分析生存情况,曲线比较用

Log-rank 检验。对于实验变量, Cox 比例风险模型被用来确定多变量的风险比(HR), 置信区间(CI) 设置为 5%, $P < 0.05$ (双侧) 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EZH2、Ki-67 及 iMVD 的阳性表达与临床病理特征之间的关系

全组 EZH2、Ki-67 阳性表达率分别为 40.91% (45/110) 和 57.27% (63/110), 着色主要位于肿瘤细胞核; iMVD 计数 33.77 ± 12.16 , 阳性表达率为 46.36% (51/110), 微血管最多的区域位于肿

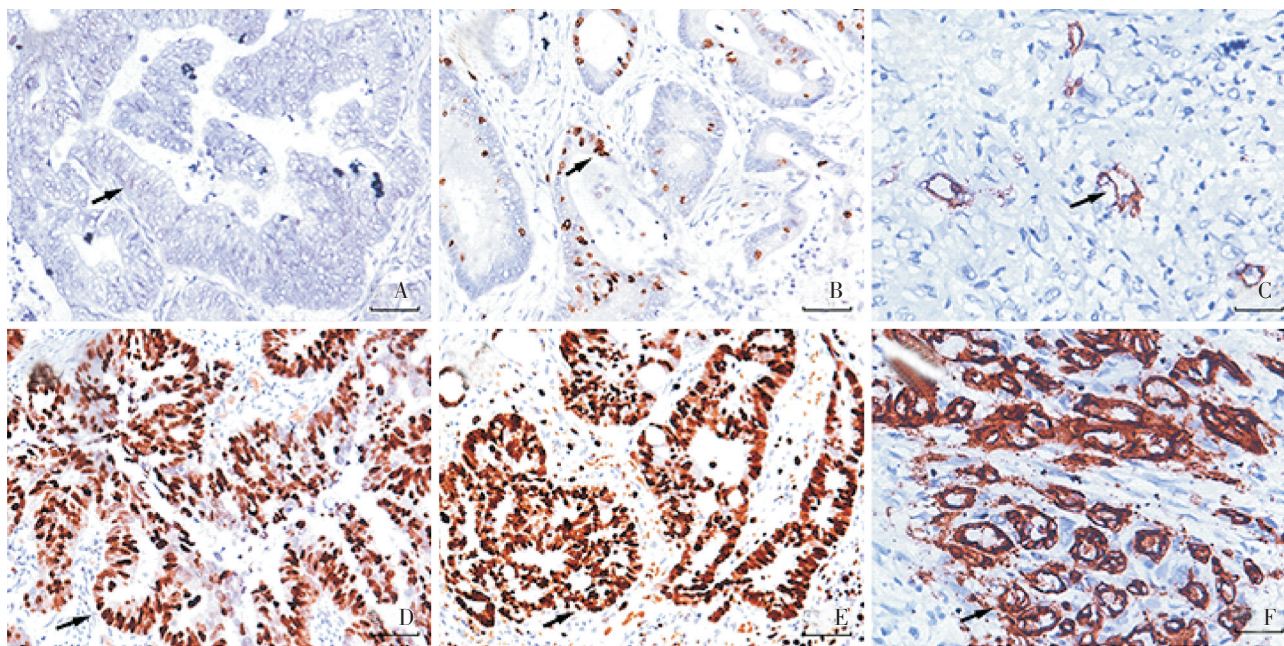
瘤周边部(图1)。EZH2 与结直肠癌远处转移密切相关($P=0.024$), 而与患者的年龄、性别、肿瘤位置、瘤体大小、肠壁浸润深度、淋巴结转移、AJCC 分期及分化程度无关。Ki-67 与原发灶大小、肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关($P=0.033$ 、 $P=0.015$ 、 $P=0.015$ 和 $P=0.017$)。iMVD 与肿瘤的肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关($P=0.016$ 、 $P=0.017$ 、 $P=0.034$; 表1)。

2.2 EZH2、Ki-67 与 iMVD 之间的关系

EZH2 与 Ki-67 呈正相关($r=0.195$, $P=0.041$), 而与 iMVD 的表达无关。Ki-67 与 iMVD 呈正相关($r=0.213$, $P=0.025$; 表2)。

表1 EZH2, Ki-67 和 iMVD 与结直肠癌临床病理特征的关系
Table 1 The relation of EZH2, Ki-67 and iMVD with clinicopathology in colorectal cancer

Variable	<i>n</i>	EZH2 ⁻ (<i>n</i> =65)	EZH2 ⁺ (<i>n</i> =45)	<i>P</i>	Ki-67 ⁻ (<i>n</i> =47)	Ki-67 ⁺ (<i>n</i> =63)	<i>P</i>	iMVD ⁻ (<i>n</i> =59)	iMVD ⁺ (<i>n</i> =51)	<i>P</i>
Age/year										
<65	51	26	25	0.123	23	28	0.701	28	23	0.849
≥65	59	39	20		24	35		31	28	
Gender										
Female	46	31	15	0.170	21	25	0.697	29	17	0.121
Male	64	34	30		26	38		30	34	
Location										
Colon	71	45	26	0.231	31	40	0.842	40	31	0.549
Rectum	39	20	19		16	23		19	20	
Size/cm										
<5	64	39	25	0.697	33	31	0.033	38	26	0.178
≥5	46	26	20		14	32		21	25	
T stage										
T1+T2	37	26	11	0.431	22	15	0.015	26	11	0.016
T3+T4	73	39	34		25	48		33	40	
N stage										
N0	53	33	20	0.564	26	27	0.248	32	21	0.186
N1+N2	57	32	25		21	36		27	30	
M stage										
M0	81	53	28	0.029	37	44	0.383	45	36	0.523
M1	29	12	17		10	19		14	15	
AJCC stage										
I+II	39	27	12	0.156	23	16	0.015	27	12	0.017
III+IV	71	38	33		24	47		32	39	
Differentiation										
Well+Moderate	80	49	31	0.516	40	40	0.017	48	32	0.034
Poor	30	16	14		7	23		11	19	



Our results showed low expression levels of EZHZ (A, bar=50 μm), Ki-67 (B, bar=50 μm) and iMVD (C, bar=25 μm) compared with the high expression levels of EZH2 (D, bar=50 μm), Ki-67 (E, bar=50 μm) and iMVD (F, bar=25 μm), in tumor tissues from patients with CRC. The arrows point to the positive staining of tumor cells or microvascular endothelial cells.

图1 结直肠癌组织 EZH2, Ki-67 和 iMVD 蛋白的免疫组化染色

Fig.1 Immunohistochemical staining for EZH2, Ki-67 and iMVD in human colorectal cancer

表2 EZH2, Ki-67 和 iMVD 之间的关系

Table 2 Correlation among tumor markers EZH2, Ki-67 and iMVD

(n=110)

		EZH2	Ki-67	iMVD
EZH2	Pearson correlation	1	0.195 ¹⁾	0.005
	significance (two-tailed)		0.041	0.958
Ki-67	Pearson correlation	0.195 ¹⁾	1	0.213 ¹⁾
	significance (two-tailed)	0.041		0.025
iMVD	Pearson correlation	0.005	0.213 ¹⁾	1
	significance (two-tailed)	0.958	0.025	

1) Significant at level of P=0.05 (two-tailed).

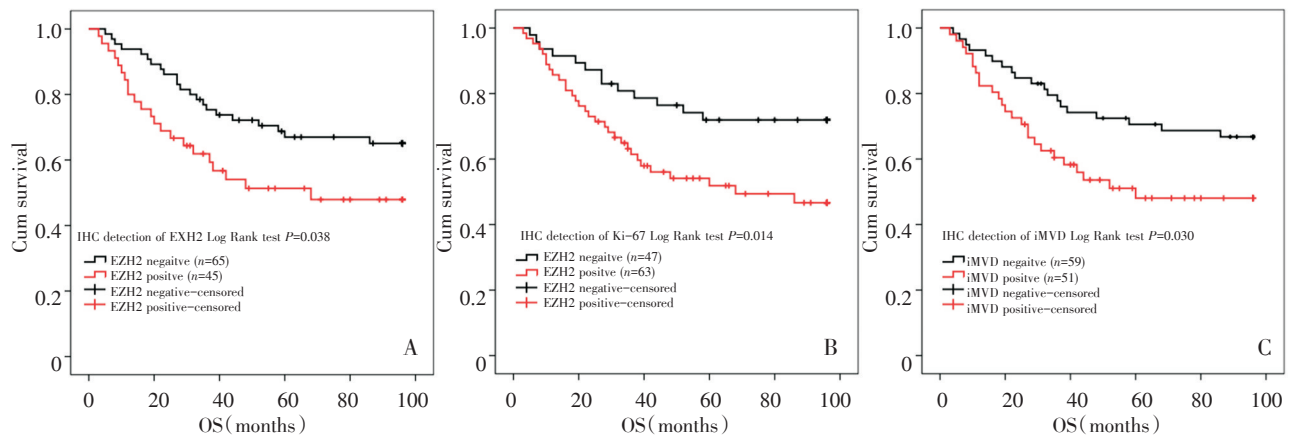
2.3 影响结直肠癌的单因素和多因素分析

我们利用 COX 比例风险模型进行单因素分析,发现与预后相关的临床病理因素包括年龄、原发灶大小、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、AJCC 分期、分化程度以及 EZH2、Ki-67、iMVD 的表达。EZH2、Ki-67、iMVD 高表达组远期生存时间远低于低表达组(见图 2)。将这些因素进行 COX 比例风险模型的多因素分析,结果显示年龄、远处转移、AJCC 分期及 EZH2 的表达是结直肠癌总生存期的独立预后因素(HR 2.918, 95% CI

1.349~6.311, P=0.007; HR 3.279, 95% CI 1.496~7.187, P=0.003; HR 8.667, 95% CI 1.498~50.141, P=0.016; HR 1.965, 95% CI 1.019~3.789, P=0.044; 表 3)。

3 讨论

远处转移是影响结直肠癌预后的主要因素之一^[6]。关于 EZH2 与发生结直肠癌远处转移的关系,在国内外尚少有报道。本次实验通过免疫组



A: Overall survival curves for patients according to the low and high expression levels of EZH2; B: Overall survival curves for patients according to the low and high expression levels of Ki-67; C: Overall survival curves for patients according to the low and high expression levels of iMVD.

图2 结直肠癌组织 EZH2, Ki-67 和 iMVD 蛋白高表达组与低表达组生存曲线对比

Fig.2 Kaplan-Meier survival curves for CRC patients with low and high expressions of EZH2, Ki-67 and iMVD in human colorectal cancer

化技术检测到 EZH2 蛋白的异常高表达与结直肠癌远处转移有明确相关性,提示 EZH2 对结直肠癌的侵袭转移具有促进作用。其机理可能为:① EZH2 提高磷酸化 p38 表达水平^[7]、E-钙粘蛋白表达减少和波形蛋白表达增多^[8]等作用,能促进上皮-间质转化,使癌细胞易于脱离原发灶而发生侵袭和转移;② EZH2 能抑制一些参与调控细胞侵

袭和转移的 miRNA,例如, EZH2 下调肝癌细胞的 miR-200b、mir-139-5p、miR-125b、mir101 及 Let-7c,促进肿瘤细胞运动和转移^[9];③ EZH2 参与调控肿瘤细胞微环境。在前列腺癌, EZH2 基因过表达能减少细胞微环境中不溶性纤维状肌动蛋白含量,影响细胞粘附和迁移,增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[10]。有关结直肠癌组织中 EZH2 蛋白的

表3 结直肠癌患者预后相关因素(单因素及多因素 COX 回归分析)

Table 3 Univariate and multivariate analysis of overall survival in colorectal cancer

Variable	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age/(≥65 vs <65 years)	1.948(1.044~3.636)	0.036	2.918(1.349~6.311)	0.007
Gender(Male/Female)	1.197(0.652~2.196)	0.562		
Location(Rectum/Colon)	1.535(0.844~2.791)	0.225		
Size/cm(≥5 vs <5 cm)	2.259(1.241~4.112)	0.008	1.521(0.780~2.966)	0.219
T stage(T3+T4/T1+T2)	2.768(1.285~5.965)	0.009	0.618(0.239~1.598)	0.320
N stage(N1+ N2/N0)	2.343(1.241~4.424)	0.009	0.977(0.402~2.373)	0.959
M stage(M1/M0)	5.103(2.781~9.365)	<0.001	3.279(1.496~7.187)	0.003
AJCC stage(Ⅲ+Ⅳ/Ⅰ+Ⅱ)	11.328(3.494~36.721)	<0.001	8.667(1.498~50.141)	0.016
Differentiation(Poor/Well+Moderate)	3.941(2.129~7.296)	<0.001	1.344(0.652~2.772)	0.423
EZH2(Positive vs Negative)	1.853(1.024~3.353)	0.042	1.965(1.019~3.789)	0.044
Ki-67(Positive vs Negative)	2.213(1.155~4.241)	0.017	1.047(0.504~2.175)	0.902
iMVD(Positive vs Negative)	1.920(1.053~3.501)	0.033	1.149(0.612~2.158)	0.665

表达与临床病理因素及患者预后关系的报道不一致。文献报道,结直肠癌中 EZH2 过表达与浸润深度、淋巴转移和肿瘤分化程度与预后密切相关,可以作为独立因素影响结直肠癌术后患者的预后^[11-12]。但也有研究认为 EZH2 表达缺失是结直肠癌术后患者不良预后的预测指标^[13-14]。本研究结果显示, EZH2 的异常表达与患者年龄、性别、肿瘤的大体形态、分化程度、浸润深度、淋巴转移均无关,而与有无远处转移有关,表明 EZH2 的表达与结直肠癌的浸润和转移有关,多因素分析表明 EZH2 是提示其可以作为评估结直肠癌预后的指标。造成研究结果差异的原因可能与统计方法、试剂、病例数、实验方案、病例筛选、结果判断等存在差异有关,多中心、大样本、高质量的前瞻性研究可以进一步明确。

Ki-67 蛋白是一种 DNA 结合蛋白,定位于细胞核内,属于大分子非组蛋白,存在于增殖细胞中,能促进 DNA 聚合酶的 DNA 链合成反应及加强复制子的 ATP 酶活性,参与 DNA 损伤修复、细胞周期调控等^[15]。Ki-67 蛋白表达程度在细胞周期的各个阶段都不同,在 G0 期、G1 早期的细胞核不被标记,在 G1 后期开始出现,在 S 和 G2 期逐渐增加,在 M 期达到高峰,呈网状结构包绕整个染色体,当有丝分裂结束后,迅速降解消失,半衰期仅为 1 小时或更短,是反映细胞增殖状态的理想标记物^[15]。Ki-67 抗原在所有增殖细胞中均有表达(包括正常细胞和肿瘤细胞),但在静止细胞中无法检测到其表达。虽然 Ki-67 精确的功能尚不清楚,许多研究发现 Ki-67 阳性细胞数的增加与结直肠癌等多种恶性肿瘤的侵袭性增加、预后差相关^[4, 16-17]。本研究对 Ki-67 的免疫组化染色研究结果显示,其表达情况与肿瘤原发灶大小、肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关;单因素分析显示, Ki-67 高表达是结直肠癌患者的预后的危险因素,但多因素分析显示,其并不是结直肠癌患者预后的独立影响因素。这说明 Ki-67 在结直肠癌发生发展过程中可能起到了促进的作用,其具体机制有待进一步的研究。

肿瘤组织或其周围组织的微血管密度,可反映肿瘤的活动程度,是癌细胞血源性传播前提条件^[18]。此外,增殖的内皮细胞可分泌肿瘤细胞生长因子影响肿瘤细胞的增殖和浸润^[18]。在所有的血管内皮细胞标志物中, CD34 蛋白抗原特异性及

灵敏性高,常用于检测组织微血管密度是反映血管形成活跃程度的特异性抗体。文献报道^[5, 19],随着 iMVD 的增加,结直肠癌侵袭转移等恶性潜能也增加。本研究结果表明,肿瘤组织 iMVD 与肿瘤的肠壁浸润深度、AJCC 分期、分化程度密切相关;单因素分析显示, iMVD 高表达是结直肠癌患者的预后的危险因素,但多因素分析显示,其并不是结直肠癌患者预后的独立影响因素。提示 iMVD 是预测结直肠癌恶性程度的一项重要指标。本研究发现,在结直肠癌组织中 EZH2 与 Ki-67 表达程正相关,提示 EZH2 参与细胞增殖的调控,与既往的研究结果一致^[13]。文献报道, EZH2 能促进多种转录因子生成^[20],促进肿瘤细胞增殖。例如, EZH2 与乳腺癌细胞的雌激素受体(Er α)、Wnt 信号通路中下游的 TCF、 β -catenin 等基因的启动子区域相互作用,增强 c-myc 和 cyclin D1 基因的转录^[20]。EZH2 抑制其他肿瘤凋亡基因,使肿瘤细胞失控生长、过度增殖。如抑制 p21/CDKN1A、E2F1、DAB2IP 的表达^[21-23]。EZH2 可以促进结直肠癌细胞增殖,可以推测, EZH2 参与结直肠癌发生、发展的机制之一可能与其调控细胞增殖能力有关。EZH2 可直接诱导血管内皮细胞 VEGF 的表达,从而促进血管生成^[24]。本研究结果显示, EZH2 与 iMVD 表达并无明显相关。这与既往文献报道的相关结果不一致,有待进一步研究以明确。此外,本研究结果显示, Ki-67 与 iMVD 表达呈正相关,提示肿瘤新生血管越丰富,细胞增殖能力越强。血管的生成可为肿瘤细胞提供充足的营养,促进了肿瘤细胞的增殖和分化。

综上所述, EZH2 作为表观遗传修饰基因, EZH2 蛋白与结肠癌的生长、远处转移和预后密切相关。深入研究 EZH2 在结肠癌中的具体作用机制将有可能为结肠癌的治疗提供新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Kondo Y, Shen L, Cheng AS, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation [J]. Nat Genet, 2008, 40(6): 741-750.
- [3] Chen VW, Hsieh MC, Charlton ME, et al. Analysis of

- stage and clinical/prognostic factors for colon and rectal cancer from SEER registries: AJCC and collaborative stage data collection system [J]. *Cancer*, 2014, 120 Suppl 23: 3793-3806.
- [4] Ma YL, Peng JY, Zhang P, et al. Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer [J]. *Med Oncol*, 2010, 27(2): 304-309.
- [5] Malik A, Mishra RN, Fanthome B, et al. Role of CD34, vascular endothelial growth factor, and p53 in neoangiogenesis as correlated with stage of disease in colorectal carcinoma [J]. *Med J Armed Forces India*, 2011, 67(4): 320-325.
- [6] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [7] Moore HM, Gonzalez ME, Toy KA, et al. EZH2 inhibition decreases p38 signaling and suppresses breast cancer motility and metastasis [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2013, 138(3): 741-752.
- [8] Fujii S, Ochiai A. Enhancer of zeste homolog 2 down-regulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(4): 738-746.
- [9] Au SL, Wong CC, Lee JM, et al. Enhancer of zeste homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 622-631.
- [10] Bryant RJ, Winder SJ, Cross SS, et al. The polycomb group protein EZH2 regulates actin polymerization in human prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2008, 68(3): 255-263.
- [11] Mimori K, Ogawa K, Okamoto M, et al. Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 expression in colorectal cancer cases [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2005, 31(4): 376-380.
- [12] Wang CG, Ye YJ, Yuan J, et al. EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(19): 2421-2427.
- [13] Fluge Ø, Gravdal K, Carlsen E, et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(8): 1282-1289.
- [14] Kurihara H, Maruyama R, Ishiguro K, et al. The relationship between EZH2 expression and microRNA-31 in colorectal cancer and the role in evolution of the serrated pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(11): 12704-12717.
- [15] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown [J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(3): 311-322.
- [16] Li P, Xiao ZT, Braciak TA, et al. Association between Ki67 Index and clinicopathological features in colorectal cancer [J]. *Oncol Res Treat*, 2016, 39(11): 696-702.
- [17] Peng Y, Wang L, Gu J. Elevated preoperative carcinoembryonic antigen (CEA) and Ki67 is predictor of decreased survival in IIA stage colon cancer [J]. *World J Surg*, 2013, 37(1): 208-213.
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [19] Vlaykova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, (24(7)): 1265-1275.
- [20] Shi B, Liang J, Yang X, et al. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(14): 5105-5119.
- [21] Wu ZL, Zheng SS, Li ZM, et al. Polycomb protein EZH2 regulates E2F1-dependent apoptosis through epigenetically modulating Bim expression [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(5): 801-810.
- [22] Fan T, Jiang S, Chung N, et al. EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(4): 418-429.
- [23] Smits M, van Rijn S, Hulleman E, et al. EZH2-regulated DAB2IP is a medulloblastoma tumor suppressor and a positive marker for survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(15): 4048-4058.
- [24] Lu C, Han HD, Mangala LS, et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2 [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(2): 185-197.