

网络出版时间: 2019-9-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1433.010.html>

青蒿素对肝癌细胞基因表达谱的影响

王惠国¹, 蔡珂^{1,2}, 韩鑫龙^{1,3}, 李雨桐^{1,3}, 袁立霞³, 谭晓梅^{3,4}, 汤庆发^{3,4}, 邢学锋^{3,4}, 陈飞龙^{3,4}, 吴长清², 唐玲^{3,4}

摘要 目的 分析青蒿素对肝癌细胞的增殖抑制效果和细胞内 microRNA 表达谱的变化。方法 选取人肝癌细胞 HepG2 和 Huh7, 给予不同浓度的青蒿素, 培养不同时间段, 分析青蒿素对人肝癌细胞的抑制效果; 利用高通量测序技术对两种肝癌细胞中的 miRNA 进行测序并分析。结果 Cell viability 实验和细胞克隆实验结果显示, 青蒿素以时间和剂量依赖的方式抑制人肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的增殖 ($P < 0.05$)。与空白对照比较, 在肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 中发现 10 种新的 miRNA 并筛选出差异表达 miRNA, 相同的差异表达 miRNA 共有 4 个。靶基因的富集分析结果显示青蒿素在 HepG2 细胞中主要调控 Rap1 信号通路, 在 Huh7 细胞主要调控 MAPK 信号通路。结论 青蒿素能够抑制肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的增殖, 且能够改变肝癌细胞 miRNA 表达谱。

关键词 青蒿素; 肝癌; miRNA; 表达谱

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1540-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.009

肝癌细胞 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 占原发性肝癌的 90%^[1]。尽管新型治疗法和诊断技术取得了巨大的成就, 但早期发现 HCC 很困难, 导致 HCC 患者 5 年生存率较低 (0~14%)^[1]。因此, 发现能够鉴定 HCC 的特异和敏感的生物标志至关重要。青蒿是一种重要的中草药植物, 从青蒿草本植物中提取的青蒿素是抗疟疾药物的有效成分。近年来, 已报道了青蒿素的其

他功能^[2]。最近青蒿素作为抗癌剂由其临床安全性和广泛的功效而受到广泛关注。

在肝细胞癌中, miRNA 经常呈现异常的表达谱, 这使得其对于诊断或预后应用具有潜在的吸引力。该研究通过 RNA-Seq 技术, 分析在青蒿素药物作用下, 肝癌细胞中 miRNA 表达谱变化, 发现与调控肝癌增殖有关的 miRNA, 为青蒿素在肝癌治疗策略发展中奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 肝癌细胞 HepG2、Huh7 购自美国 ATCC 细胞库。

1.1.2 实验药物 青蒿素购自美国 Sigma 公司 (规格: 361593-400 MG); 在二甲基亚砜 (DMSO) 中制备青蒿素的储备溶液; DMSO 的最终浓度保持低于 0.01%。

1.1.3 实验试剂与器材 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; RNAiso plus、Premix Taq™、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 均购自日本 TaKaRa 公司; AMOAF1000 自动细胞计数仪购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 人肝癌细胞 HepG2、Huh7, 在含有 10% FBS 和 1% 青霉素、1% 链霉素的培养液 (DMEM 培养液) 于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中进行培养。细胞状态良好并生长至对数期时, 进行实验处理, 每组重复 6 个孔。

1.2.2 Cell Viability Assay 法测定细胞增殖 以每孔 3 000 个细胞, 将 HepG2 和 Huh7 细胞接种到 96 孔板, 加入完全培养基中并使其附着过夜。第 2 天加入青蒿素 (0、50、100、150、200 μmol/L) 处理 24、48 h。每个孔中加入 20 μl CellTiter-Blue® Luminescent Cell Viability Assay。使用 Bio-Rad 细胞成像检测仪测量 Luminescent 的吸光度值。

1.2.3 结晶紫实验测定细胞增殖 将 HepG2 和 Huh7 细胞接种到 12 孔板, 加入完全培养基中并使其附着过夜 (每孔 2 000 个细胞)。第 2 天加入青蒿

2019-05-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81573661); 广东省自然科学基金 (编号: 2016A030313621)

作者单位: ¹ 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622

² 中国科学院大连化学物理研究所, 转化医学科学院研究中心, 大连 116023

³ 南方医科大学中医药学院, 广州 510515

⁴ 广东省中药制剂重点实验室, 广东省中药制剂技术工程实验室, 广州 510515

作者简介: 王惠国, 女, 副教授, 硕士生导师;

唐玲, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: tangyuling6688@163.com;

吴长清, 男, 博士, 助理研究员, 责任作者, E-mail: cqw@dicp.ac.cn

素(0、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 7 d。用 PBS 清洗 2 遍,每孔加入 500 μl 的结晶紫溶液,摇床孵育 30 min 后,PBS 清洗 3 次,每孔加入 10% 冰醋酸溶液 1 ml,摇床孵育 10 min 后,每孔取等量的溶液入 96 孔板中,测取 550 nm 吸光度值。

1.2.4 肝癌细胞总 RNA 提取、文库构建与测序 收集药物处理 24 h 的肝癌细胞,细胞进行消化处理,离心后弃上清液加入 PBS 清洗 2 遍后,加入 1 ml 的 RNAiso Plus,室温静置 5 min,加入 200 μl 氯仿并振荡混匀,室温静置 5 min,离心 5 min (10 360 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。将上清液转移至新的离心管中且加入等体积的异丙醇,室温静置 10 min,离心 10 min (10 360 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。弃上清液,加入 1 ml 的 75% 乙醇清洗沉淀,离心 5 min (10 360 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$)。收集沉淀,并自然干燥,溶解于适量的 DEPC 处理水中。用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA,在得到的 mRNA 中合成 cDNA,再经琼脂糖凝胶电泳回收目的大小片段,并进行 PCR 扩增,从而完成整个文库制备工作,构建好的文库用 Illumina HiSeq 2500 进行测序。

1.2.5 novel miRNA 的预测 miRNA 前体的标志性发夹结构,能够用来预测新的 miRNA。整合 miREvo 和 mirdeep 2 这些 miRNA 预测软件来进行新 miRNA 的分析,基本原理是通过截取一定长度 sRNA 比对上的参考序列,通过探寻其二级结构及 Dicer 酶切位点信息、能量等特征进行分析,预测样品中 novel miRNA,并进行各样本中匹配上的 sRNA 的序列、长度、出现的次数等信息,以及不同长度 miRNA 的首位点碱基分布和所有 miRNA 的各位点碱基分布情况的统计。

1.2.6 差异表达 miRNA 和靶基因的鉴定 对各样本中已知和新 miRNA 进行表达量的统计,并用 DEGseq 软件进行差异表达分析,在获得差异表达的 miRNA 中挑选显著性高表达和低表达的 miRNA,用 miRanda、PITA 和 RNAhybrid 三个软件的交集预测 miRNA 靶基因。由于每个 miRNA 鉴定到的靶基因较多,只挑选分值小于 -1.2,且能量值小于 7 的。用火山图可以推断差异 miRNA 的整体分布情况,从

差异倍数(fold change)和校正后的显著水平(padj/qvalue)两个方面进行评估,对差异 miRNA 进行筛选。横坐标代表 miRNA 在不同实验组中/不同样品中表达倍数变化,纵坐标代表 miRNA 表达量变化的统计学显著程度,图中的散点代表各个 miRNA,蓝色圆点表示无显著性差异的 miRNA,红色圆点表示显著上调的差异 miRNA,绿色圆点表示显著下调的差异 miRNA。

1.2.7 差异 miRNA 靶基因富集分析 京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集程度通过 Rich factor、Qvalue 和富集到此通路上的基因个数来衡量。其中 Rich factor 指差异表达的基因中位于该 pathway 条目的基因数目与所有有注释基因中位于该 pathway 条目的基因总数的比值。Rich factor 越大,表示富集的程度越大。Qvalue 是做过多重假设检验校正之后的 Pvalue, Qvalue 的取值范围为(0,1),越接近于零,表示富集越显著。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 软件分析实验结果,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析进行比较,如方差分析结果显示组间差异有统计学意义,则进一步采用 *t* 检验进行组间差异的两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿素对人肝癌细胞 HepG2、Huh7 增殖的抑制作用 Cell Viability 实验结果显示,青蒿素对 HepG2、Huh7 两种肝癌细胞有增殖抑制作用且呈现量效、时间依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。青蒿素对肝癌细胞的增殖有明显的抑制作用,且青蒿素浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 在 24 h 时就具有明显的抑制效果,见表 1、2。细胞克隆实验结果表明,浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿素对人肝癌细胞 HepG2 的抑制率为 $(21.93 \pm 6.90)\%$,对 Huh7 的抑制率为 $(52.59 \pm 3.63)\%$,有明显的抑制效果且差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。根据实验结果,选择青蒿素药物浓度 100 $\mu\text{mol/L}$,药物作用时间 24 h 用于后续实

表 1 青蒿素对人肝癌细胞 HepG2 增殖作用的抑制率($\%, \bar{x} \pm s$)

时间点	青蒿素组 0 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 50 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 100 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 150 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 200 $\mu\text{mol/L}$	F 值	P 值
24 h	1.96 $\pm$ 0.25	17.95 $\pm$ 4.72 [*]	24.34 $\pm$ 4.60 [*]	32.23 $\pm$ 3.52 [*]	34.90 $\pm$ 7.96 [*]	7.978	0.003
48 h	1.78 $\pm$ 2.42	34.42 $\pm$ 5.11 ^{* #}	43.58 $\pm$ 4.98 ^{* #}	62.94 $\pm$ 6.39 ^{* #}	70.12 $\pm$ 6.29 ^{* #}	33.538	0.000

与青蒿素组 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 24 h 作用时间点比较: [#] $P < 0.05$

表2 青蒿素对人肝癌细胞 Huh7 增殖作用的抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)

时间点	青蒿素组 0 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 50 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 100 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 150 $\mu\text{mol/L}$	青蒿素组 200 $\mu\text{mol/L}$	F 值	P 值
24 h	0.25 $\pm$ 7.34	8.47 $\pm$ 8.28	18.52 $\pm$ 2.71*	25.42 $\pm$ 6.43*	44.83 $\pm$ 2.90*	29.978	0.000
48 h	0.52 $\pm$ 6.14	18.73 $\pm$ 5.32*	30.73 $\pm$ 11.08* #	36.21 $\pm$ 9.45*	66.70 $\pm$ 4.89* #	25.240	0.000

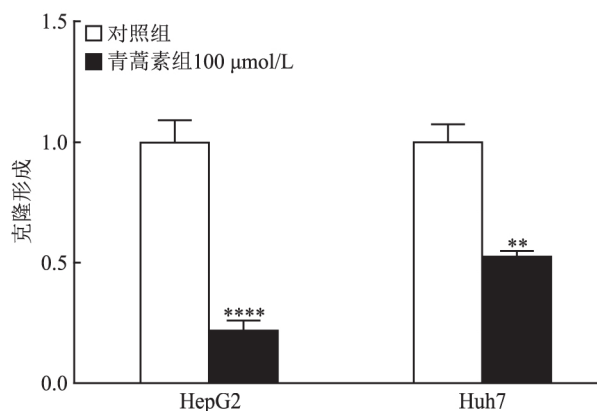
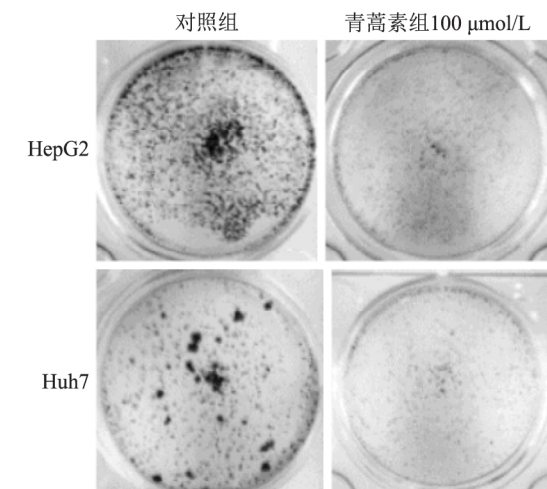
与青蒿素组 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: * $P < 0.05$; 与 24 h 作用时间点比较: # $P < 0.05$ 

图1 青蒿素对肝癌细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较: ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

验研究。

2.2 microRNAs 二代测序数据分析

2.2.1 Novel miRNA 预测 在 HepG2 和 Huh7 两种肝癌细胞中,加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的青蒿素,作用 24 h,其细胞内的 miRNA 与对照组相比,整合 miREvo 和 mirdeep2 这些 miRNA 预测软件来进行新 miRNA 的分析,分析得到 10 种新的 miRNA。在二级结构示意图中,整个序列是 miRNA 前体,红色突出部分为 Novel miRNA 的成熟体序列。见图 2。

2.2.2 差异表达 miRNA 基因的筛选和靶基因的富集分析 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 青蒿素作用 24 h 后,与对照组相比较。HepG2 细胞系中,筛选出上调 miRNA 基因 43 条,下调基因 41 条; Huh7 细胞系中,筛选出上调 miRNA 基因 13 条,下调基因 9 条,见图 3。在

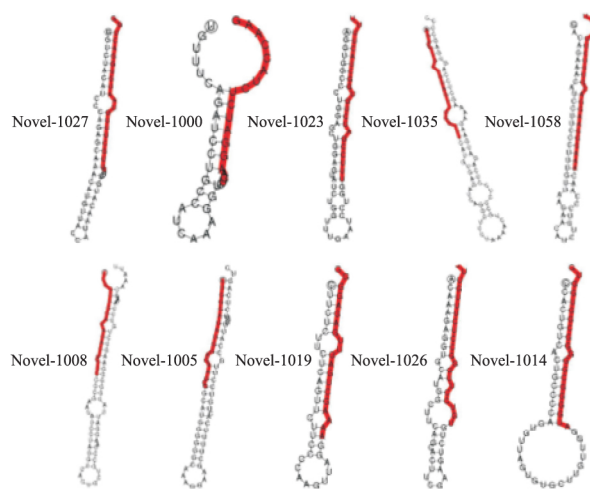


图2 预测 Novel miRNA 的结构

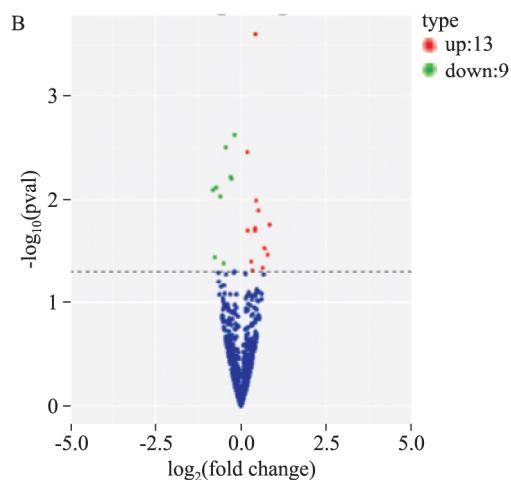
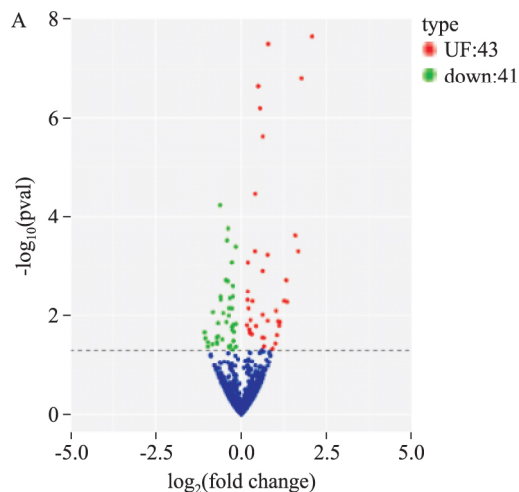


图3 差异 miRNA 火山图

A: HepG2; B: Huh7

上调和下调的 miRNA 中,筛选出显著上调和显著下调的 miRNA,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4。两种细胞系中,相同的差异 miRNA 有 4 个,分别是 hsa-miR-32-5p、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-22-3p 和 hsa-miR-1307-3p,见图 5。

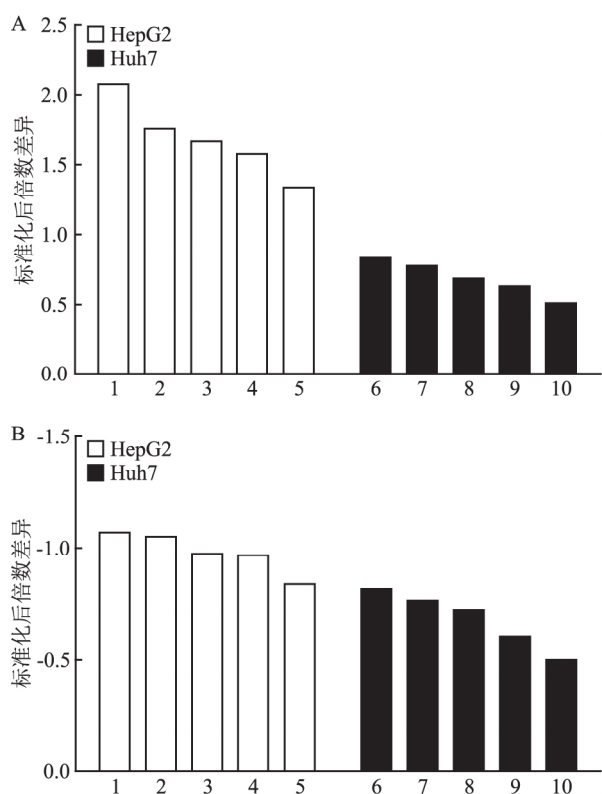


图 4 HepG2 和 Huh7 细胞中显著变化的 miRNA

A: HepG2 和 Huh7 细胞中显著上调的 miRNA; 1: hsa-miR-199a-5p; 2: Novel_1144; 3: Novel_1213; 4: hsa-miR-4426; 5: hsa-miR-1273g-3p; 6: hsa-miR-451a; 7: hsa-miR-556-5p; 8: hsa-miR-33a-5p; 9: hsa-miR-182-3p; 10: hsa-miR-328-3p; B: HepG2 和 Huh7 细胞中显著下调的 miRNA; 1: hsa-miR-4664-5p; 2: hsa-miR-195-3p; 3: hsa-miR-1276; 4: hsa-miR-3679-5p; 5: hsa-miR-4454; 6: hsa-miR-10b-3p; 7: hsa-miR-4671-5p; 8: hsa-miR-1247-3p; 9: hsa-miR-1269b; 10: hsa-miR-1246

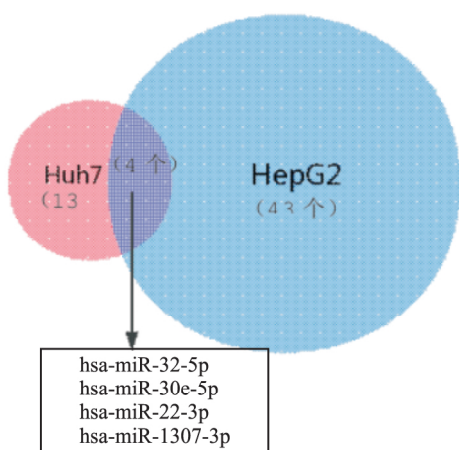


图 5 HepG2 和 Huh7 细胞中相同的差异 miRNA

在 HepG2 和 Huh7 细胞系中,挑选了富集前 20 位的 pathway 条目在图 6 和图 7 中进行展示。在这些通路中,与 HepG2 细胞相关的为 Rap1 信号通路,与 Huh7 细胞相关的为 MAPK 信号通路。

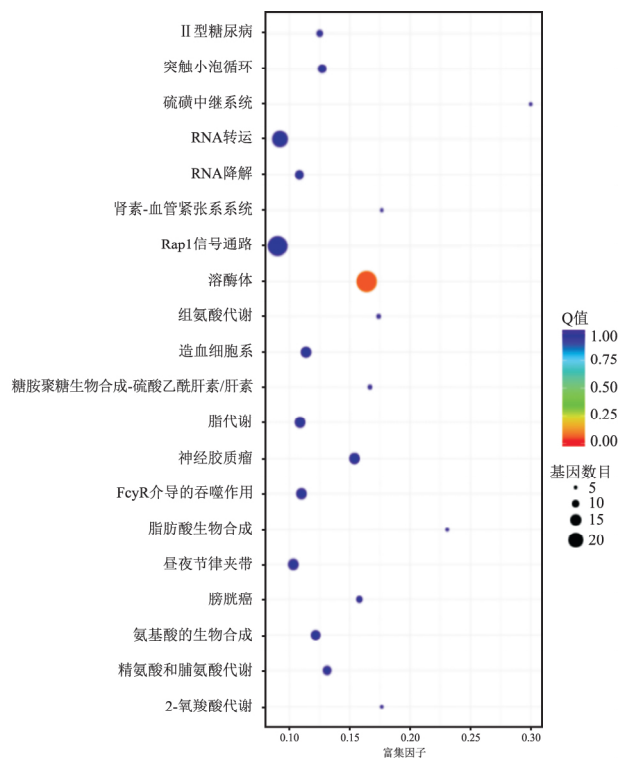


图 6 HepG2 细胞候选靶基因 KEGG 富集散点图

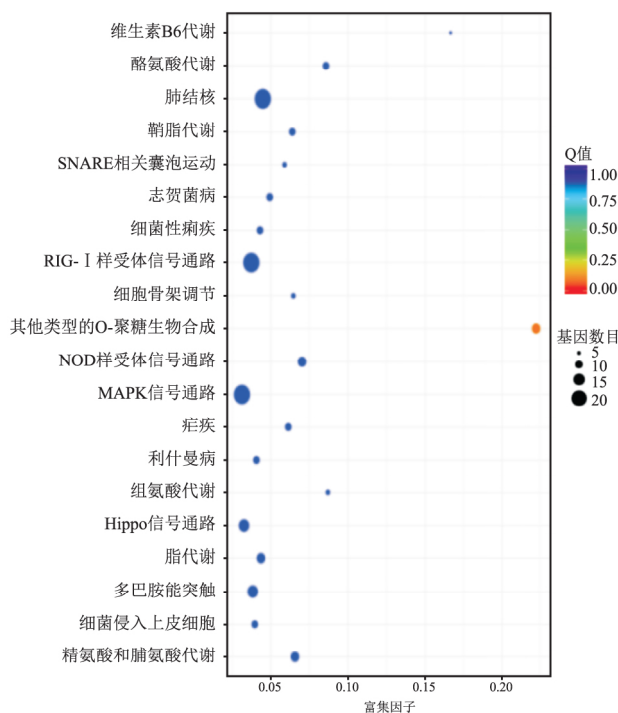


图 7 Huh7 细胞候选靶基因 KEGG 富集散点图

3 讨论

肝细胞肝癌是肝脏最常见的恶性肿瘤之一,是世界死亡率第二的癌症,严重威胁着人们健康^[1]。肝癌起病隐匿,早期没有症状或症状不明显,不易被发现,仅40%患者能在早期被发现。但肝癌发生迅速,大多数患者确诊时已经达到局部晚期或发生远处转移,治疗困难,预后很差,严重威胁着人们的健康。肝癌的发生是复杂的过程,外界刺激导致肝细胞遗传性改变,使其增殖、凋亡、结构等发生异常,导致癌症的发生。通过对肝癌发生分子机制的研究,可能为肝癌临床治疗提供新的方法,也是肝癌治疗的理论基础^[2]。

miRNA是短小的、非编码RNA,通常由1~22个核苷酸组成。目前已发现超过2500种人miRNA在各种生理和病理过程中发挥重要作用。例如胚胎发育、细胞增殖、分化、细胞周期进程、细胞凋亡、自噬、血管生成和代谢^[3]。最近,已经证明miRNA在人类癌症中表现出组织和疾病特异性模式,表明miRNA可能是用于HCC的早期诊断和预后预测的新型生物标志物^[4]。

青蒿是一种使用了2000多年的传统药物,对疟疾、寄生虫病和纤维化具有显著的疗效,且毒性低^[5]。最近几年被报道出具有广泛的抗肿瘤活性,但在肝癌细胞上研究较少。本研究表明青蒿素能够抑制肝癌细胞Huh7和HepG2的增殖,且随着药物浓度增大,抑制作用随之增强;在同一药物浓度下,随着时间的延长抑制作用也越强。说明青蒿素在肝癌细胞中是有一定的研究价值。

本研究利用高通量测序技术对青蒿素作用于两种肝癌细胞Huh7和HepG2中的miRNA进行测序并分析了差异表达miRNA,其中肝癌细胞Huh7筛选出21个差异表达的miRNA,肝癌细胞HepG2筛选出84个差异表达的miRNA,两种肝癌细胞相同的差异表达miRNA共有4个,分别是miR-32-5p、miR-30e-5p、miR-22-3p和miR-1307-3p,这4个miRNA可能与青蒿素抑制肝癌细胞增殖有密切关系。研究^[6]表明,miR-32-5p在肿瘤中异常表达并发挥重要的调节作用,且与膀胱肿瘤的癌症特异性存活密切相关。Chen et al^[7]发现,miR-30e-5p与miR-15a一起抑制LRP6的表达并促进GMEC中的脂肪代谢。Chen et al^[8]将miR-22-3p鉴定为肿瘤抑制因子,其直接靶向SP1以抑制细胞增殖并诱导HCC中的细胞周期停滞和细胞凋亡。Chen et al^[9]发现

miR-1307-3p的表达可能被认为是结肠癌患者5-FU化疗疗效的预测因子。

近几年,已经证明miRNA涉及许多类型的疾病,尤其是人类恶性肿瘤。许多miRNA在HCC中失调,这可能会对当前的研究有所启发。由于miRNA稳定且易于检测,因此在肝癌组织、血清/血浆和细胞系中报道了它们的异位表达。对于miRNA在肝癌作用机制的研究仍然在不断扩展。本研究通过靶基因预测并进行功能分析,结果显示青蒿素在HepG2细胞中主要调控Rap1信号通路,在Huh7细胞主要调控MAPK信号通路,暗示着青蒿素在不同肝癌细胞中的作用机制各有不同。有研究表明,Rap1的下调能够诱导肝癌细胞HepG2凋亡^[10],且Rap1还可以抑制肝癌细胞的生长和侵袭^[11]。MAPK通路联合ERK通路^[12]或者RAS通路^[13]可以作为肝癌细胞生长的预后标志物。基于大量文献报道,可推测Rap1信号通路和MAPK信号通路在青蒿素抑制肝癌细胞生长过程中发挥了重要的作用。本研究中,大量基因指向多种通路,但具体哪条通路指向青蒿素调控肝癌细胞生长仍需进一步研究。

本研究评估了在青蒿素作用下HCC中失调的miRNA的最新数据,在肝癌细胞Huh7中筛选出21个差异表达的miRNA,在肝癌细胞HepG2中筛选出84个差异表达的miRNA,两种肝癌细胞相同的差异表达miRNA共有4个,并回顾了这些miRNA的报道功能和对靶基因预测进行理论分析,推测它们很有可能适用于青蒿素调控miRNA治疗肝癌的诊断、治疗和预后标志物。

参考文献

- [1] Mao B, Wang G. MicroRNAs involved with hepatocellular carcinoma(Review) [J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(6): 2811-20.
- [2] Roy S, He R, Kapoor A, et al. Inhibition of human cytomegalovirus replication by artemisinins: effects mediated through cell cycle modulation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(7): 3870-9.
- [3] Ren Z, He S, Fan X, et al. Survival prediction model for postoperative hepatocellular carcinoma patients [J]. *Medicine*, 2017, 96(37): e7902.
- [4] 张传海, 桂阳, 郭凤林, 等. microRNA-7对人肝癌细胞MH-CC-97H上皮间质转化的影响及作用机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 29-34.
- [5] Garajova I, Le Large T Y, Frampton A E, et al. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs in the chemoresistance of pancreatic cancer [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 678401.

- [6] Lenherr S M, Tsai S, Silva Neto B, et al. MicroRNA expression profile identifies high grade, non-muscle-invasive bladder tumors at elevated risk to progress to an invasive phenotype [J]. *Genes*, 2017, 8 (2): 77–92.
- [7] Chen Z, Qiu H, Ma L, et al. miR-30e-5p and miR-15a synergistically regulate fatty acid metabolism in goat mammary epithelial cells *via* LRP6 and YAP1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (11): 1909–26.
- [8] Chen J, Wu F X, Luo H L, et al. Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1 [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (11): 4932–41.
- [9] Chen Q, Mao Y, Meng F, et al. Rs7911488 modified the efficacy of capecitabine-based therapy in colon cancer through altering miR-1307-3p and TYMS expression [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (43): 74312–9.
- [10] Zha Y, Gan P, Yao Q, et al. Downregulation of Rap1 promotes 5-fluorouracil-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31 (4): 1691–8.
- [11] Mo S J, Hou X, Hao X Y, et al. EYA4 inhibits hepatocellular carcinoma growth and invasion by suppressing NF-kappaB-dependent RAP1 transactivation [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38 (1): 9.
- [12] Zhao J, Dong Q Z, Zhong F, et al. NMI promotes hepatocellular carcinoma progression *via* BDKRB2 and MAPK/ERK pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (7): 12174–85.
- [13] Delire B, Starkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications [J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 45 (6): 609–23.

Effect of artemisinin on gene expression profile of hepatocarcinoma cells

Wang Huiguo¹, Cai Ke^{1,2}, Han Xinlong^{1,3}, et al

(¹College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622;

²Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023;

³College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

Abstract Objective To analyze the inhibitory effect of artemisinin on the proliferation of hepatoma cells and the changes in intracellular microRNA expression profiles. **Methods** Human hepatoma cells HepG2 and Huh7 were selected and different concentrations of artemisinin were administered for different time periods. The inhibitory effect of artemisinin on human hepatoma cells was analyzed. The miRNAs in the two liver cancer cells were sequenced and analyzed using high-throughput sequencing technology. **Results** Cell viability experiments and cell cloning experiments showed that artemisinin inhibited the proliferation of human hepatoma cells HepG2 and Huh7 in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$). Ten new miRNAs were found in hepatoma cells HepG2 and Huh7 and differentially expressed miRNAs were screened in comparison with blank controls. There were 4 identical differentially expressed miRNAs. The enrichment analysis of the target gene showed that artemisinin mainly regulates the Rap1 signaling pathway in HepG2 cells, and mainly regulates the MAPK signaling pathway in Huh7 cells. **Conclusion** Artemisinin can inhibit the proliferation of HepG2 and Huh7 cells, and can change the miRNA expression profile of liver cancer cells.

Key words artemisinin; liver cancer; miRNA; expression profiles