

以微型核糖核酸-21 作為預測 缺氧性肺高壓患者右心衰竭之指標

張瑋婷

¹ 奇美醫療財團法人奇美醫院、² 南臺科技大學生物科技與食品系

Cmcvecho2@gmail.com

摘要

肺高壓之預後主要和其造成之右心衰竭有關。慢性缺氧是造成肺高壓的原因之一，然而其造成右心衰竭的機轉目前仍未明。微型核糖核酸廣泛存在生物體中，負責基因轉錄後之修飾。在本研究中致力於探討微型核糖核酸-21 (microRNA-21; miR-21)在缺氧造成肺高壓之調控角色。我們收錄了四十一位缺氧導致肺高壓之患者，其中十位出現右心衰竭。此外，其血液中之微型核糖核酸-21 的表現量也和右心衰竭呈正相關。此外，經缺氧刺激後人肺微血管內皮細胞(human pulmonary endothelial cell; HPEC)以及其條件培養基(conditioned medium)中，微型核糖核酸-21 的表現也顯著地上升。更進一步，微型核糖核酸-21 過度活化的心肌肌原細胞也出現肥大，以及心衰竭相關蛋白表現增加之情況。透過此結果，可以推想—經過缺氧刺激後，肺循環中增加的微型核糖核酸-21 可能對右心心肌功能產生負面影響。

關鍵詞：缺氧造成之肺高壓、右心衰竭、微型核糖核酸-21

Using MiR-21 as a Predictor of the Severity of Right Ventricular Dysfunction in Patients with Hypoxia Induced Pulmonary Hypertension

*Wei-Ting Chang

¹ Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Chi Mei Medical Center

² Department of Biotechnology and Food Science, Southern Taiwan University of Science and Technology

Abstract

The outcome of pulmonary hypertension (PH) mainly depends on the development of right ventricular (RV) dysfunction. Chronic hypoxia is a major cause of secondary PH; however, the mechanisms of its associated RV dysfunction are largely unknown. In this study, we aim to understand the role of microRNA-21 (miR-21) in hypoxia induced RV dysfunction. We enrolled 41 patients with hypoxia induced PH. Echocardiography was conducted and the circulating miR-21 was measured. Moreover, miR-21 expression was detected in hypoxia treated human pulmonary microvascular endothelial cells (human pulmonary endothelial cell; HPEC) and its conditioned media. Through over-expressing miR-21 in H9C2 cells, we further identified the crosstalk between the pulmonary circulation and RV. Among the studied patients, 10 developed RV dysfunction. It is noteworthy that the expression of circulating miR-21 was correlated with the severity of RV dysfunction. Similarly,

Received: Jul. 4, 2018; first revised: Aug. 7, 2018, second revised: Mar. 4, 2019; accepted: Apr. 2019.

Corresponding author: W.-T. Chang, Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Chi Mei Medical Center, Tainan 71004, Taiwan.

miR-21 was up-regulated in the hypoxia treated HPEC and its conditioned media in a time-dependent manner. Furthermore, hypertrophic changes were observed in the hypoxia treated HPEC. The up-regulation of heart failure associated markers in miR-21 over-expressed myoblast (H9C2) cells suggested that pulmonary circulatory miR-21 could have influence on the RV function. As a result, we came to the conclusion that the expression of systemic and pulmonary miR-21 is associated with the severity of right ventricular dysfunction in patients with hypoxia induced pulmonary hypertension.

Keywords: Hypoxia Induced Pulmonary Hypertension, Right Ventricular Dysfunction, miR-21

壹、前言

肺高壓為一複雜的血管變異，造成的原因廣泛從先天性心臟病、自體免疫疾病、肺動脈血栓至左心衰竭等[1]。而其中慢性缺氧是造成次發性肺高壓的主要原因之一，然而造成右心衰竭的機轉目前仍未明[1-2]。而更重要的是，肺高壓患者之死亡率和右心衰竭息息相關[3]。另一方面，微型核糖核酸(microRNAs)是一種微小且自生性的非編碼核糖核酸(non-coding RNAs)，主要負責調控信使核糖核酸的表現[4-5]。而微型核糖核酸的調控異常則可能導致各種心臟疾病，甚至肺高壓的產生[5]。其中微型核糖核酸-21(microRNA-21, miR-21)曾被報導和心臟肥大、心臟衰竭以及肺動脈的再塑形相關[4]。然而，其和缺氧造成之肺高壓衍生出的右心衰竭關係仍不明。在本研究中，我們致力於探討微型核糖核酸-21 在缺氧性肺高壓中所扮演的角色，以及其對右心衰竭的影響。更進一步地，藉由測量缺氧刺激對人肺微血管內皮細胞(human pulmonary endothelial cell, HPEC)以及其條件培養基(conditioned medium)中微型核糖核酸-21 表現量之影響，得以更進一步研究肺動脈循環中對右心產生影響之潛在因子。期許此研究成果可以幫助了解微型核糖核酸-21 在缺氧性肺高壓之調控機轉。

貳、材料與方法

一、臨床肺高壓患者之收案

在此縱向且前瞻性研究(longitudinal and prospective study)，收錄了 41 位缺氧造成肺高壓之患者(肺壓接超過 25 mmHg)。此外，也排除了原本心臟收縮功能不全，超音波影像不清或是已被診斷其他原因造成之肺高壓患者則排除。在 41 位缺氧造成肺高壓之患者中，19 位有慢性阻塞性肺病，9 位有支氣管擴張，7 位為肺結核，6 位為原發性肺纖維患者。本試驗通過人體試驗委員會核准(IRB: B-ER-106-056)，並請受試者簽有同意書。受試者除了接受心臟超音波外，也接受血液檢測。患者之血清經過 3,000 rpm 於攝氏四度離心十五分鐘後，取血清測試心衰竭相關指標—氮端原生 B 型利鈉蛋白鏈(NT-proBNP; BIOSITE, San-Diego, CA, USA)。

(一) 心臟超音波檢測

除了根據美國超音波學會(American Society of Echocardiography)制定的標準影像擷取外(iE33, Philips)，左心之舒張功能、組織都普勒，進一步檢測右心功能，包括：右心的厚度、腔室大小、右心室面積變化率(fractional area change, FAC)、三尖瓣環收縮參數(Tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE)以及右心壓力。患者符合下列兩項條件者(三尖瓣環收縮參數 < 1.6 cm，右心組織都普勒 $S' < 10$ cm/s)則被定義為右心衰竭。

(二) 細胞培養及缺氧刺激

(三) 即時聚合酶鏈式反應

人肺微血管內皮細胞(HPEC)及大鼠心肌原細胞(H9C2)分別被培養於 M199 及 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM; pH 7.2; GIBCO-BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD) 培養基中，並加上 10% 的胎牛血清(fetal bovine serum; FBS)。細胞種植的起始濃度為 6000 cells/cm² 並於分盤後隔天開始進行實驗。人肺微血管內皮細胞被培養於正常氧氣濃度或是缺氧箱(hypoxia chamber; 0.2% O₂, 5% CO₂, Biospherix, Lacuna, NY) 24 或 48 小時後，細胞及其條件培養基則被收集以利後續研究。

(四) 心肌細胞轉染

患者血清、細胞或是條件培養基，經過 Trizol (Invitrogen, CA)以萃取全核糖核酸(total RNA)，再利用 miRCURY LNATM Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon, DK)反轉錄為互補脫氧核糖核酸。更進一步，偵測檢體中 miR-21-5p，血清 B 型利納利尿胜肽原 (NT-pro Brain Natriuretic Protein, BNP) 的基因表現，而 U6 以及 β -actin 則當作內部對照基因(endogenous control)。miR-21-5p 以及 U6 引子序列分別如下：5'UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA3' 以及 5'AAAATATGGAACGCTTCACG3', respectively (Life Technology, Carlsbad, CA)。而血清 B 型利納利尿胜肽原以及 β -actin 之引子序列則如下：Upstream Primer: CGGAATTCACCCGCTGGGCAGCC, Downstream Primer: CCGCTCGAGTTATCGTGGTGCCCGCAGG; Upstream Primer: CTAAGGCCAACCGTGAAAAG3, Downstream Primer: GCCTGGATGGCTACGTACA5。miRs 使用 ExiLENT SYBR Green Master Mix (Exiqon, DK)而 mRNAs 使用 Light-Cycler TaqMan Master (Roche, DE) with 100 ng RNA 偵測。即時聚合酶鏈式反應之定量檢測使用 LightCycler 2.0 System (Roche, DE)。

利用 miRCURY LNA microRNA Mimic (Exiqon, DK)，成功地將 miR-21-5p 0, 10 and 20 nM 轉染至 H9C2 細胞。簡而言之，5 μ l 轉染試劑和 2.5 μ l 的微型核糖核酸-21 mimic (miR-21 mimic) 混合，再加入 100 ml serum-free media 爾後再取 100 μ l 的微型核糖核酸-21 mimic 混合液體加至細胞培養基中，等待 48 小時後再進行後續實驗。而轉染結果也使用即時聚合酶鏈式反應確認 miR-21 有被過度表現。

(五) 螢光染色

使用 4% paraformaldehyde 固定經過轉染而過度表現 miR-21 的 H9C2 細胞。染色對象包括 F-actin (stained with rhodamine phalloidin; Thermo Fisher, USA)，而細胞核則藉由 4', 6-diamidino-2-phenylindole 染色(Thermo Fisher, USA)。

二、統計

全部的數值皆由平均值 \pm 標準差表現。統計方法使用 Student's unpaired *t* test 並藉由 GraphPad Prism (Version 5.03) 圖形呈現。 $P < 0.05$ 表示有統計上的意義。

參、結果

一、病患基本資料

相對 31 位沒有發生右心衰竭的肺高壓患者，10 位發生右心衰竭的患者在年齡，性別，體重，

身高以及基本生化指數上並無顯著差異，僅在血清 B 型利納利尿胜肽原(NT-pro BNP)上略為上升。此外，這兩組在肺高壓的致病原因以及使用藥物上，也無明顯差異(表 1)。

Table 1. Clinical characteristics of patients with hypoxia induced pulmonary hypertension (PH) and preserved or impaired right ventricular (RV) function

	PH without RV dysfunction (n = 31)	PH with RV dysfunction (n = 10)	P-value	
Age (years)	56.2 ± 8.5	51.6 ± 19.4	0.37	
Male (%)	21 (67.7)	6 (60)	0.11	
Body height (cm)	156.7 ± 7.4	157.5 ± 10.6	0.61	
Body weight (kg)	53.4 ± 7.4	58.2 ± 1.1	0.68	
Diabetes mellitus (%)	9 (29)	2 (20)	0.69	
Hypertension (%)	6 (19.3)	3 (30)	0.82	
Malignancy (%)	3 (9.7)	1 (10)	0.74	
Etiologies	COPD	15 (48.4)	4 (40)	0.41
	Bronchiectasis,	6 (19.3)	3 (30)	0.32
	Pulmonary tuberculosis	6 (19.3)	1 (10)	0.72
	IPF	4 (12.9)	2 (20)	0.63
Medication	Theophylline	18 (58)	6 (60)	0.74
	B-agonist	27 (87)	8 (80)	0.63
	Digoxin	8 (25.8)	3 (30)	0.82
	Diuretics	17 (54.8)	7 (70)	0.41
	CCB	15 (48.3)	5 (50)	0.87
	Systemic steroid	11 (35.4)	3 (30)	0.62
Creatinine clearance rate (ml/min)	102.7 ± 42.8	97.5 ± 24.8	0.8	
NT-proBNP (pg/ml)	847.1 ± 643.2	1814.8 ± 1377.8	0.26	
Hemoglobin (g/dl)	13.1 ± 2.1	14.3 ± 2.3	0.17	
miR-21 expression	6.9 ± 4.4	87.4 ± 55.3	0.001	

Data are expressed as mean ± standard deviation.

PH=pulmonary hypertension; RV=right ventricle; COPD=chronic obstructive pulmonary diseases; IPF=idiopathic pulmonary fibrosis; NT-proBNP = N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; CCB=calcium channel blockers;

不過值得注意地，發生右心衰竭的患者，其血液中微型核糖核酸-21 的表現量顯著上升(6.9 ± 4.4 v.s. 87.4 ± 55.3, p=0.001)。在超音波指數方面，發生右心衰竭的患者呈現顯著下降的組織都普勒 S' (13.3 ± 2.5cm/s v.s. 6.5 ± 1.8cm/s, P=0.001)以及三尖瓣環收縮參數(1.9 ± 0.3cm v.s. 1.0 ± 0.2cm, P=0.001)。相似地，右心室面積變化率(45.3.5 ± 6.5% v.s. 21.3 ± 8.2%, P=0.09)及右心之肥厚程度也(4.5 ± 21 v.s. 7.2 ± 3.4, P=0.05)相對沒有右心衰竭的患者下降(表 2)。另一方面，在左右心容積、三尖瓣逆流嚴重度以及右心壓力與舒張功能上，兩組並無顯著不同。

Table 2. Echocardiographic parameters of patients with hypoxia induced pulmonary hypertension (PH) and preserved or impaired right ventricular (RV) function

	PH without RV dysfunction (n = 31)	PH with RV dysfunction (n = 10)	P-value
Right heart parameters			
RV base diameter, mm	3.0 ± 0.5	3.2 ± 0.9	0.82
RV midventricular diameter, mm	2.2 ± 0.8	2.1 ± 0.4	0.51
RV length, mm	5.3 ± 1.1	5.5 ± 0.9	0.72
Tricuspid regurgitation grade >II (%)	24 (77.4)	7 (70)	0.48
RV pressure (mmHg)	44.2 ± 16.1	44.3 ± 32.6	0.91
RVFAC (%)	45.3.5 ± 6.5	21.3 ± 8.2	0.09
RV wall thickness (mm)	4.5 ± 2.1	7.2 ± 3.4	0.05
RV S' (cm/s)	13.3 ± 2.5	6.5 ± 1.8	0.001
TAPSE (cm)	1.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.001
Left heart parameters			
LVMI (g/m ²)	64.0 ± 22.2	56.0 ± 8.5	0.25
LVEDVi (ml)	49.3 ± 21.3	43.5 ± 13.8	0.49
LVEF (%)	69.1 ± 9.0	67.0 ± 3.8	0.21
E (ms)	75.6 ± 27.5	52.8 ± 23.8	0.15
DT (ms)	209.3 ± 62.5	196.3 ± 51.1	0.48
e' (ms)	9.9 ± 3.7	9.9 ± 2.3	0.93
E/e' (mean)	7.5 ± 2.1	6.1 ± 2.3	0.61

Data are expressed as mean ± standard deviation. RVFAC= right ventricular fractional area change; S' = tissue Doppler systolic velocity; TAPSE=Tricuspid annular plane systolic excursion; LVMI = left ventricular mass index; LVEDVi = left ventricular end diastolic volume index; LVEF = left ventricular ejection fraction; E = transmitral valve early filling velocity; DT= deceleration time; e' = early diastolic mitral annular velocity;

二、病患血清中微型核糖核酸-21 和右心衰竭呈正相關

在線性迴歸分析中，因缺氧造成肺高壓患者其血液中之微型核糖核酸-21 表現量和三尖瓣環收縮參數 ($R^2 = 0.66$, $P = 0.01$)，組織都普勒 S' ($R^2 = 0.66$, $P = 0.01$)以及右心室面積變化率($R^2 = 0.67$, $P = 0.01$)呈現負相關 (圖 1)。此結果也暗示—微型核糖核酸-21 和右心衰竭之嚴重程度呈正相關。

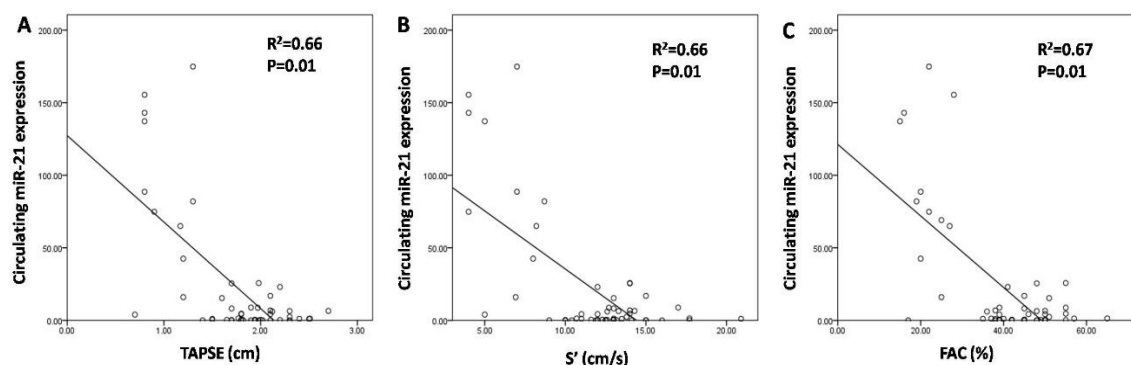
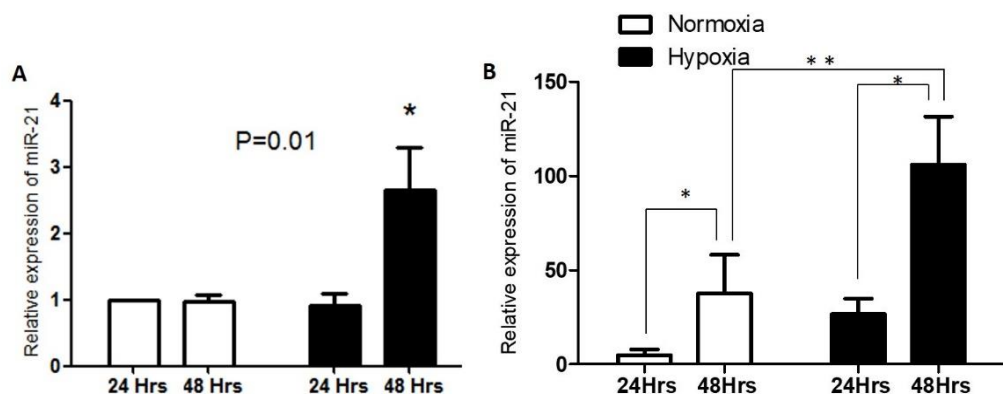


圖 1 因缺氧造成肺高壓患者其血液中之微型核糖核酸-21 表現量和三尖瓣環收縮參數 ($R^2=0.66$, $P=0.01$)，組織都普勒 S' ($R^2=0.66$, $p=0.01$)及右心室面積變化率($R^2=0.67$, $P=0.01$)呈負相關

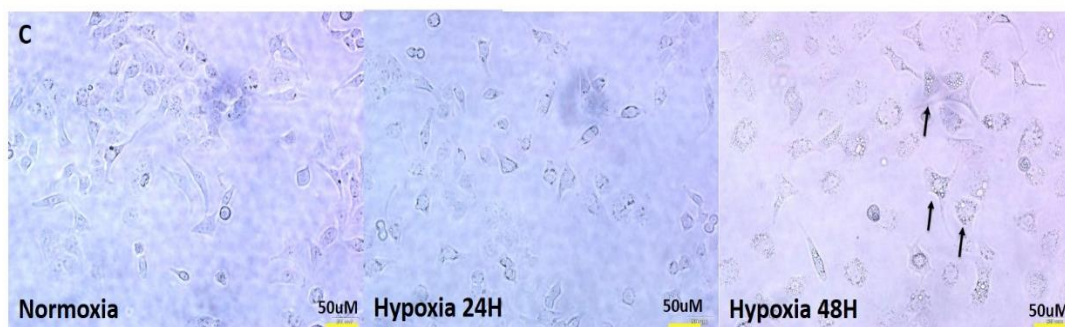
三、缺氧環境刺激人肺微血管內皮細胞以及其條件培養基過度表現微型核糖核酸-21

相較於生長於正常氧氣環境的人肺微血管內皮細胞(HPEC)，培養於缺氧環境四十八小時的細胞呈現微型核糖核酸-21 的顯著上升(圖 2a)。相對地，缺氧環境的條件培養基(conditioned medium)中，微型核糖核酸-21 的表現量也顯著增加(圖 2b)。此外，在缺氧環境刺激四十八小時後細胞也略為出現肥大現象(圖 2c)。



(a) 培養於缺氧環境 48 小時的 HPEC 細胞中，微型核糖核酸-21 呈現顯著上升

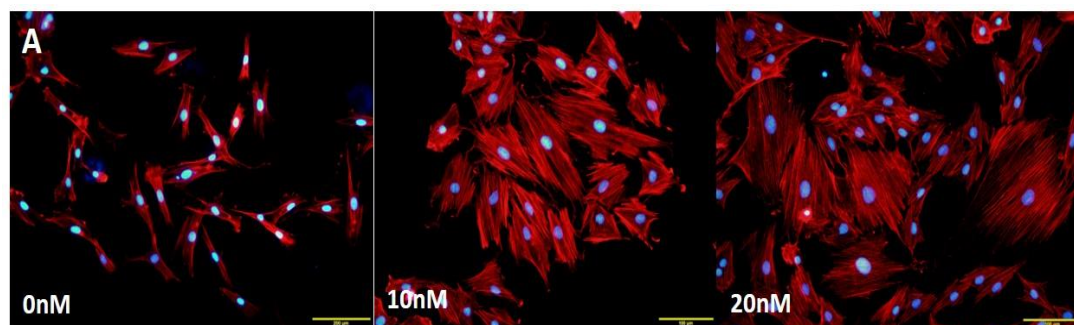
(b) 缺氧環境的條件培養基(conditioned medium)中，微型核糖核酸-21 的表現量也顯著增加



(c) 在缺氧環境刺激 48 小時後人肺微血管內皮細胞(HPEC)也略為出現肥大現象

圖 2 缺氧環境刺激人肺微血管內皮細胞以及其條件培養基過度表現微型核糖核酸-21

為了進一步評估—肺循環中增加的微型核糖核酸-21 對右心之影響，在 H9C2 細胞中過度表現微型核糖核酸-21，並且發現這些經過微型核糖核酸-21 mimic 處理的 H9C2 細胞出現顯著肥大情況(圖 3a, b)，並且其 B 型利納利尿胜肽原的表現量也顯著上升(圖 3c)。



(a) 過度表現微型核糖核酸-21 在 H9C2 細胞出現顯著肥大情況

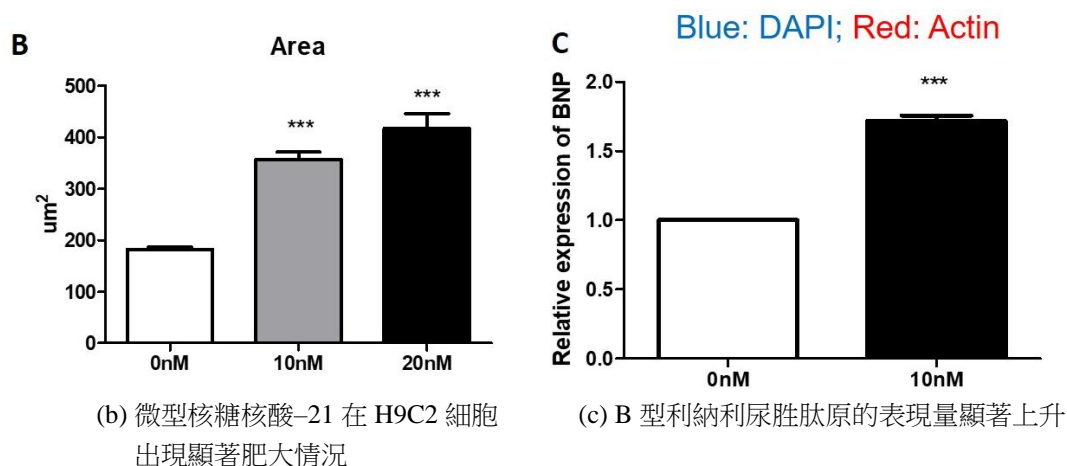


圖 3 肺循環中增加的微型核糖核酸-21 對右心之影響

肆、討論

一、慢性缺氧造成之肺動脈及右心衰竭往往被忽略

慢性缺氧不只會造成肺動脈再塑形也會導致右心衰竭[2,6]。然而慢性缺氧造成之肺高壓卻往往被忽略，主因患者缺氧之症狀常被歸咎於慢性肺病。但值得注意的是，慢性缺氧造成之肺高壓目前仍未有有效的治療，而且缺乏一個可靠的生物標記以偵測與評估。而微型核糖核酸的調控異常除了可能導致各種心臟疾病，也可能導致肺高壓的產生[7]

二、微型核糖核酸在肺動脈高壓及右心衰竭扮演之角色

目前對於造成肺高壓的致病機轉，主要著重在三個面向，包括內皮細胞路徑(endothelial pathway)、一氧化氮路徑(nitric oxide pathway)、前列腺素路徑(prostacyclin pathway) [8]。而其中，慢性缺氧會造成一氧化氮上升，雖然初期可以幫助血管擴張，但後期其衍生的自由基(reactive oxygen species, ROS)則會則會成血管再塑性，進一步導致肺動脈高壓[9]。而和一氧化氮路徑相關的不對稱二甲精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)也被報導會在缺氧環境受微型核糖核酸-21 調控，而產生肺動脈高壓[10]。此外，miR-223 也會透過類胰島素生長因子-1 接受器(insulin-like growth factor-I receptor IGF-IR)在缺氧或過度壓力的肺高壓環境下，導致右心衰竭[11]。而抑制 miR-206 表現在肺纖維化造成之肺高壓可以達到改善右心功能之果效[12]。藉由抑止 Smad3 表現，miR-199-5p 也可以幫助改善肺高壓的嚴重度[13]。以上之訊息在在告訴我們微型核糖核酸在肺高壓的重要性，透過了解相關機轉，更讓未來的治療具有前瞻性。

三、微型核糖核酸-21 做為偵測右心衰竭的生物標記，以及肺循環和右心間之溝通媒介

根據目前的報告，微型核糖核酸-21 主要抑制細胞凋亡並促進增生，在心肌肥大與衰竭扮演重要角色[7]。過往的研究顯示：過度表現之微型核糖核酸-21 會造成和肺高壓高度相關之骨型蛋白之增加[14] 此外，缺氧早成之微型核糖核酸-21 表現上升也負責調控肺動脈細胞之增生[7] 而近期之研究也著重於討論肺動脈內皮細胞與平滑肌細胞之間的交互影響[15]，然而，目前針對微型核糖核酸-21 在右心再塑形僅有在先天性心臟病(congenital heart disease)上和乙型轉化生長因子 (TGF-β)相關路徑做探討[16]。根據本研究之發現，微型核糖核酸-21 或可做為偵測右心衰

竭的重要生物標記，並且在缺氧狀況下的肺循環和右心作為溝通媒介[4,7]。過往的研究也指出：微型核糖核酸-21 可以藉由旁分泌(paracrine)在心臟纖維母細胞以及心肌細胞擔任肥大訊息的傳遞者[17-18]。相似地，若抑制微型核糖核酸-21 在血管收縮素 II 誘發的小鼠心衰模型，則可以避免出現心臟肥大的結果[12]。此外，微型核糖核酸-21 也被報導可以透過抑制 Akt/mTOR 自噬相關路徑，而保護 H9c2 減少因缺氧造成之細胞傷害[19]。而和上述研究不同地，著重在肺動脈內皮細胞(HPEC)和心肌細胞間的交互作用，並發現經過缺氧刺激後，微型核糖核酸-21 在人肺微血管內皮細胞(HPEC)以及其條件培養基(conditioned medium)中的表現量顯著上升。再者，產生心衰患者出現右心肥厚的情況，可以呼應微型核糖核酸-21 過度表現的 H9C2 細胞也呈現顯著肥大以及心衰相關蛋白活化的現象。然而，本研究的人肺微血管內皮細胞(HPEC)在缺氧下的肥大情況未達顯著，故右心衰竭患者其肺動脈內皮細胞是否增厚則需要進一步的研究證實。

伍、結論

根據本研究之結果指出：微型核糖核酸-21 在因缺氧造成肺高壓患者產生之右心衰竭扮演一定的重要角色。在臨床上，患者血清中的 miR-21 表現或可以做為評估右心衰竭嚴重性的生物標記，且其在肺動脈內皮細胞和右心心肌細胞間調控機轉或對後續右心再塑形有顯著影響。然而，是否能藉由調控微型核糖核酸-21 以達到抑止右心衰竭之果效，則需要更多的研究。更進一步地，除了缺氧造成肺高壓之患者，對於其他如原發性肺高壓，自體免疫或先天性心臟病造成之肺高壓患者，miR-21 否也有同樣的調控機轉，值得拭目以待。

參考文獻

- [1] R. L. Vender. (1994). Chronic hypoxic pulmonary hypertension: Cell biology to pathophysiology. *Chest*, 106(1), 236-243.
- [2] H. A. Ghofrani, R. Voswinckel, F. Reichenberger, N. Weissmann, R. T. Schermuly, W. Seeger, and F. Grimminger. (2006). Hypoxia-and non-hypoxia-related pulmonary hypertension-established and new therapies. *Cardiovascular Research*, 72(1), 30-40.
- [3] K. Y. Wang. (2017). The changing landscape of pulmonary arterial hypertension in 21st century. *Acta Cardiologica Sinica*, 33(5), 510-513.
- [4] Y. Cheng, and C. Zhang. (2010). MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 3(3), 251-255.
- [5] M. Han, J. Toli, and M. Abdellatif. (2011). MicroRNAs in the cardiovascular system. *Current Opinion in Cardiology*, 26(3), 181-189.
- [6] B. Blissenbach, C. T. Nakas, M. Krönke, T. Geiser, T. M. Merz and J. Pichler Hefti. (2018). Hypoxia-induced changes in plasma microRNAs correlate with pulmonary artery pressure at high altitude. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(1), L157-L164. DOI: 10.1152/ajplung.00146.2017.
- [7] S. Yang, S. Banerjee, A. Freitas, H. Cui, N. Xie, E. Abraham, and G. Liu. (2012). miR-21

- regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 302(6), L521–L529.
- [8] M. Humbert, O. Sitbon, and G. Simonneau. (2004) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 351, 1425–1436. DOI: 10.1056/NEJMra040291
- [9] A. Jaitovich, and D. Jourdeuil. (2017). A brief overview of nitric oxide and reactive oxygen species signaling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 967, 71–81. DOI: 10.1007/978-3-319-63245-2_6
- [10] L. Iannone, L. Zhao, O. Dubois, L. Duluc, C. J. Rhodes, J. Wharton, ...B. Wojciak–Stothard. (2014). miR–21/DDAH1 pathway regulates pulmonary vascular responses to hypoxia. *Biochemical Journal*, 462(1), 103–112. DOI: 10.1042/BJ20140486.
- [11] L. Shi, B. Kojonazarov, A. Elghezawy, R. Popp, B. K. Dahal, S. S. Pullamsetti, ...I. Fieming. (2016). miR–223–IGF–IR signalling in hypoxia– and load–induced right–ventricular failure: A novel therapeutic approach. *Cardiovascular Research*, 111(3), 184–193.
- [12] S. Sharma, S. Umar, A. Centala, and M. Eghbali. (2015) Role of miR–206 in genistein–induced rescue of pulmonary hypertension in monocrotaline model. *Journal of Applied Physiology*, 119(12), 1374–1382.
- [13] Y. Liu, G. Liu, H. Zhang, and J. Wang. (2016) MiRNA–199a–5p influences pulmonary artery hypertension via downregulating Smad3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(4), 859–866.
- [14] M. I. Ahmed, A. N. Mardaryev, C. J. Lewis, A. A. Sharov, and N. V. Botchkareva. (2011) MicroRNA–21 is an important downstream component of BMP signalling in epidermal keratinocytes. *Journal of Cell Science*, 124(20), 3399–3404. DOI: 10.1242/jcs.086710
- [15] L. Deng, F. J. Blanco, H. Stevens, R. Lu, A. Caudrillier, M. McBride, ...A. H. Baker. (2015). MiR–143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation Research*, 117(10), 870–883.
- [16] S. Reddy, D. Q. Hu, M. Zhao, E. Jr. Blay, N. Sandeep, S. G. Ong, ...D. Bernstein. (2017). miR–21 is associated with fibrosis and right ventricular failure. *JCI Insight*, 2(9), e91625. DOI: 10.1172/jci.insight.91625
- [17] S. Roy, S. Khanna, S. R. Hussain, S. Biswas, A. Azad A, C. Rink, ...C. K. Sen. (2009). MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR–21 regulates fibroblast metalloprotease–2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovascular Research*, 82(1), 21–29.
- [18] C. Bang, S. Batkai, S. Dangwal, S. K. Gupta, A. Foinquinos, A. Hoizmann, ...T. Thum. (2014). Cardiac fibroblast–derived microRNA passenger strand–enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2136–2146.
- [19] M. Yano, S. Kim, Y. Izumi, S. Yamanaka, and H. Iwao. (1998). Differential activation of cardiac c–jun amino–terminal kinase and extracellular signal–regulated kinase in angiotensin II Mediated hypertension. *Circulation Research*, 83(7), 752–760.