

胰腺癌细胞焦亡相关基因风险预测模型的构建

黄舒¹, 马智慧², 赵景霖¹, 欧阳红梅^{1*}

¹昆明理工大学附属医院, 云南省第一人民医院检验科, 云南 昆明

²杭州师范大学医学院衰老研究所, 浙江 杭州

收稿日期: 2021年10月19日; 录用日期: 2021年11月16日; 发布日期: 2021年11月23日

摘要

目的: 胰腺癌(PAAD)是一种高度恶性的肿瘤, 缺乏敏感的生物标志物, 本文通过分析细胞焦亡相关基因对胰腺癌生存预后的影响, 构建有效的风险预测模型, 为胰腺癌的早期诊断、治疗和预后提供新的靶点。方法: 利用基因组图谱(TCGA)数据库中PAAD和GTEx数据库中的正常胰腺组织的RNA-seq数据, 获取细胞焦亡相关基因的表达。利用GSEA软件进行细胞焦亡功能富集分析, 利用R3.6.1对焦亡基因进行差异分析、生存分析、相关性分析以及风险预测模型的构建与验证, 最后利用独立预后分析筛选出与胰腺癌预后显著相关的细胞焦亡相关基因。结果: 得到了细胞焦亡基因大多在胰腺癌中高表达且为预后不良的因素, 构建了由IL18、CHMP2B和CHMP3组成的风险预测模型。结论: 构建了由IL18、CHMP2B、CHMP3组成的、有效的风险预测模型, 为胰腺癌的诊断、治疗和预后的靶点提供了新的方向。

关键词

胰腺癌, 细胞焦亡, 风险预测模型, 预后

Construction of Risk Prediction Model for Pyroptosis Related Genes in Pancreatic Adenocarcinoma

Shu Huang¹, Zhihui Ma², Jinglin Zhao¹, Hongmei Ouyang^{1*}

¹The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Institute of Laboratory Medicine, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan

²Institute of Ageing Research, School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou Zhejiang

Received: Oct. 19th, 2021; accepted: Nov. 16th, 2021; published: Nov. 23rd, 2021

*通讯作者。

Abstract

Objective: Pancreatic adenocarcinoma (PAAD) is a highly malignant tumor and lacks sensitive biomarkers. In this research, we analyzed the impact of pyroptosis-related genes on the survival and prognosis of pancreatic cancer, and constructed an effective risk prediction model to provide a new target for early diagnosis, treatment and prognosis of pancreatic cancer. **Methods:** The RNA-seq data of PAAD in TCGA and normal pancreatic tissue in GTEx database were used to obtain pyroptosis-related genes. GSEA was used to analyze the functional enrichment analysis of pyroptosis, and R3.6.1 was used for different expression genes analysis, survival analysis, correlation analysis and risk prediction model construction and verification. Finally, independent prognostic analysis was used to screen the genes associated with the prognosis of pancreatic cancer. **Results:** Most of the pyroptosis genes are highly expressed in pancreatic carcinoma and are unfavorable prognostic factors. A risk prediction model consisting of IL18, CHMP2B and CHMP3 is constructed. **Conclusion:** Our research constructs an effective risk prediction model composed of IL18, CHMP2B and CHMP3, and provides a new direction for the diagnosis, treatment and prognosis of pancreatic cancer.

Keywords

Pancreatic Adenocarcinoma, Pyroptosis, Risk Prediction Model, Prognosis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

胰腺癌(Pancreatic adenocarcinoma, PAAD)是一种恶性程度高的胃肠道肿瘤,其诊断和治疗难度大。PAAD 发病率逐年上升,2021 年预计新增 60,430 例,死亡 48,220 人[1],其发生与饮酒、吸烟、高脂肪高蛋白饮食、过量饮用咖啡、环境污染和遗传因素有关。糖尿病或慢性胰腺炎患者常发生胰腺癌,并且大约 90%属于胰腺上皮导管腺癌[2] [3]。有数据显示,胰腺癌患者的 5 年生存率不到 10%,使胰腺癌成为恶性胃肠道肿瘤中预后最差的一种[1],严重威胁着人类的生命健康。胰腺癌的发病隐匿并且进展迅速,一旦发现,大多数患者已经失去了最佳治疗机会。因此,寻找准确、快速预测胰腺癌的肿瘤生物标志物成为当务之急。

细胞焦亡(Pyroptosis)是一种炎症性细胞程序性死亡,伴随着大量炎性细胞因子的释放[4] [5]。大量研究表明,细胞焦亡作为一种炎症反应,所产生的炎症环境能够诱导正常细胞发生癌变,为肿瘤的发生和进展提供良好的生存环境[6] [7]。因此,本文旨在筛选出胰腺癌中的细胞凋亡相关基因,为胰腺癌的诊断及靶向药物的研究提供新的方向,同时构建风险预测模型来进一步评估胰腺癌患者的预后。总之,本文将有助于我们更好地理解胰腺癌的进展机制,为胰腺癌的诊断和治疗提供新的靶点。

2. 材料与方方法

2.1. 人胰腺癌基因表达数据的收集

从 TCGA (The Cancer Genome Atlas)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)获取人胰腺癌和正常组织的 RNA-seq 数据及相应的临床病理信息,包括 178 例胰腺癌患者肿瘤组织及 4 例癌旁的正常组织[8]。考虑到 TCGA 数据集中 PAAD 的正常样本数量较少,结合 GTEx (Genotype-Tissue Expression Project)从

UCSC-Xena (<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载了 167 例人正常胰腺组织的基因表达谱。后续所有处理和归一化均采用 R3.6.1 完成。

2.2. 细胞焦亡相关基因的获取

在 MsigDB (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>)上搜索并下载细胞焦亡相关的数据集,然后利用 GSEA4.0.2 进行基因集富集分析[9],提取细胞焦亡相关的基因及表达量,应用“GSVA”软件包计算每个样本中特定基因集的富集分数[10],使用单样本 GSEA (ssGSEA)得分对细胞焦亡通路进行生存分析。

2.3. 构建蛋白互作网络与差异表达基因的筛选

利用 STRING (<https://www.string-db.org/>)构建细胞焦亡基因的蛋白质相互作用网络[11],构建标准位相关系数大于 0.4,线的粗细代表相关性的强弱。利用“limma”软件包进行差异分析[12],筛选 $P < 0.05$ 的基因,并用“pheatmap”软件包进行可视化[13]。

2.4. 生存分析

将差异表达的基因与生存数据合并,运用单因素 Cox 回归分析筛选出与预后显著相关的细胞焦亡相关基因。同时,利用“survival”软件包进行总生存率(overall survival, OS)的生存分析[14],筛选标准为 $P < 0.05$ 。

2.5. 细胞焦亡预后风险预测模型的构建及验证

结合差异分析、单因素 Cox 回归分析和生存分析,利用“VennDiagram”筛选出交集基因用于后续分析[15]。通过 Lasso 回归分析确定风险特征,风险评分按以下公式计算:

$Survival\ risk\ score = \sum_{i=1}^N Coef_i * Ex_i$ 。Coef_i 是系数,Ex_i 是每个选定的细胞焦亡基因的表达。该公式用于计算每位患者的风险评分,然后根据风险评分中位数,将 TCGA-PAAD 数据集分为高风险组和低风险组。采用 Kaplan-Meier 生存分析比较两组患者的预后,受试者操作特征(ROC)曲线用于评估风险预测模型的准确性。

GEPIA2.0 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)是一个综合分析来自 TCGA 和 GTEx 数据库的 RNA-Seq 表达数据的在线网站[16],我们利用 GEPIA 对风险模型基因的差异表达及生存分析进行验证。

2.6. 确定模型风险评分与临床病理特征之间的关系

为了更好地了解风险评分在 PAAD 中的预测作用,我们采用“pheatmap”软件包系统地研究了风险评分与临床病理特征之间的关系,包括生存状态、年龄、性别、病理分级、分期和 TNM 分期。不仅如此,我们还研究了风险评分与所选细胞焦亡风险基因表达水平之间的关系。此外,我们使用“forestplot”软件包进行了单因素 Cox 回归分析和多因素 Cox 回归分析确定风险评分是否是胰腺癌患者的独立预后指标, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2.7. 统计学分析

所有统计学分析均采用 R3.6.1 完成, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 细胞焦亡基因富集分析与差异基因

从 MsigDB 仅下载了 1 个细胞焦亡相关基因的数据集: REACTOME_PYROPTOSIS,包含了 26 个相关基因。GSEA 富集分析发现细胞焦亡在肿瘤样本中更加活跃,标准化的富集分数(NES)为 1.62,标准化

的 $P = 0.041$ ，错误发现率(FDR)为 0.041 (图 1(A))。同时，通路的生存分析表明细胞焦亡($P = 0.041$)与胰腺癌的生存率呈负相关(图 1(B))。图 1(C)显示了细胞焦亡相关基因的蛋白-蛋白相互作用(PPI)。通过差异分析发现，与细胞焦亡相关得 26 个基因中有 23 个均在胰腺肿瘤组织中上调(图 1(D))，***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ 。

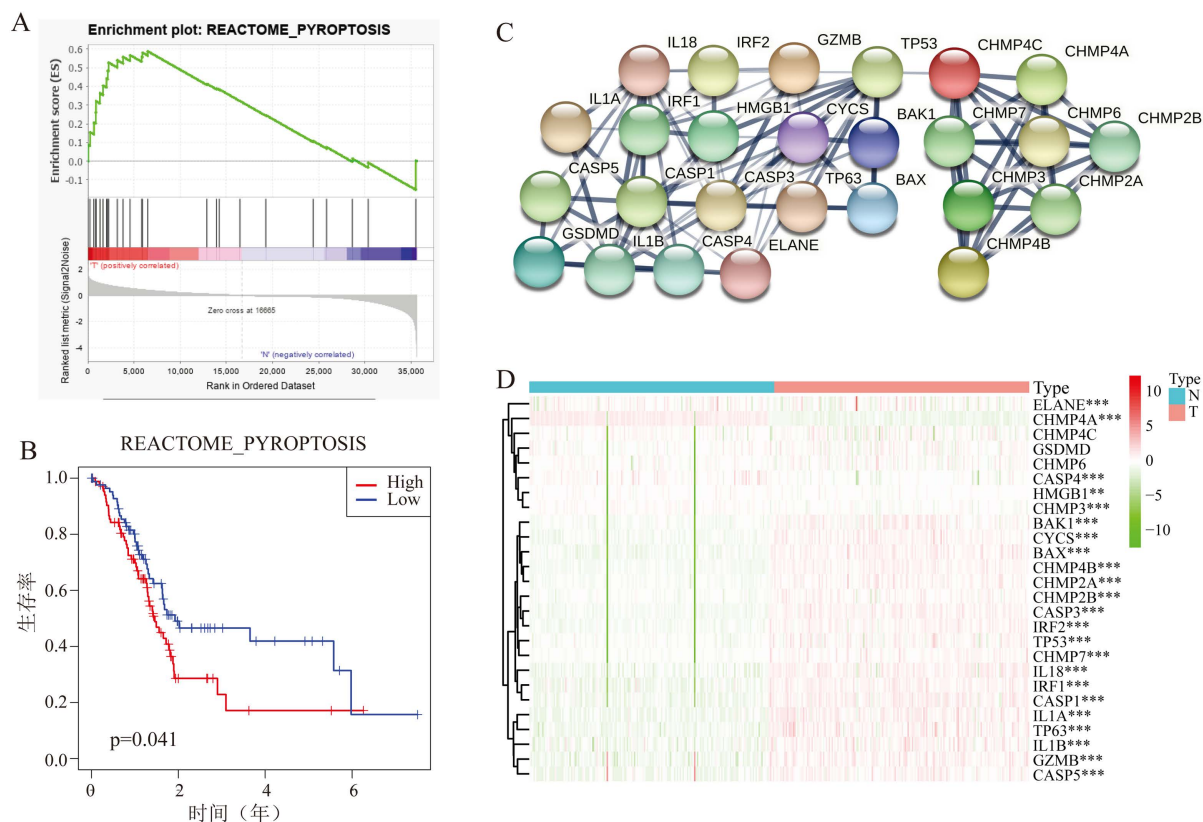


Figure 1. Enrichment analysis and differential expression analysis of pyroptosis-related genes in pancreatic adenocarcinoma
图 1. 胰腺癌中细胞焦亡基因的富集分析与差异分析

3.2. 细胞焦亡相关基因的预后作用

为了建立与细胞焦亡相关的风险预测模型，我们采用了单变量 Cox 回归分析分析了 26 个细胞焦亡基因与总生存率的关系，发现 CASP4、IL18、CHMP4C、CHMP2B、BAK1 及 CHMP3 与 OS 显著相关($P < 0.05$; 表 1)。Kaplan-Meier 生存分析发现 IL18 ($P = 0.003$)、CHMP2B ($P = 0.007$)、CHMP3 ($P = 0.027$)、CASP3 ($P = 0.045$)及 CHMP4 ($P = 0.009$)与胰腺癌患者的生存呈显著负相关(图 2(A)~(E))。韦恩图筛选出 3 个交集基因(图 2(F))，分别是 IL18、CHMP2B 和 CHMP3，用于后续分析。

Table 1. Univariate Cox regression analysis of prognosis related genes
表 1. 预后相关的单因素 Cox 回归分析

细胞焦亡基因	HR	HR.95L	HR.95H	P-value
CASP4	1.000614	1.00028	1.000948	0.000318
IL18	1.000691	1.000309	1.001073	0.000392

Continued

CHMP4C	1.000988	1.000433	1.001543	0.000484
CHMP2B	1.000587	1.000237	1.000938	0.001016
BAK1	1.000869	1.000316	1.001422	0.002064
CHMP3	1.00054	1.000158	1.000923	0.00564

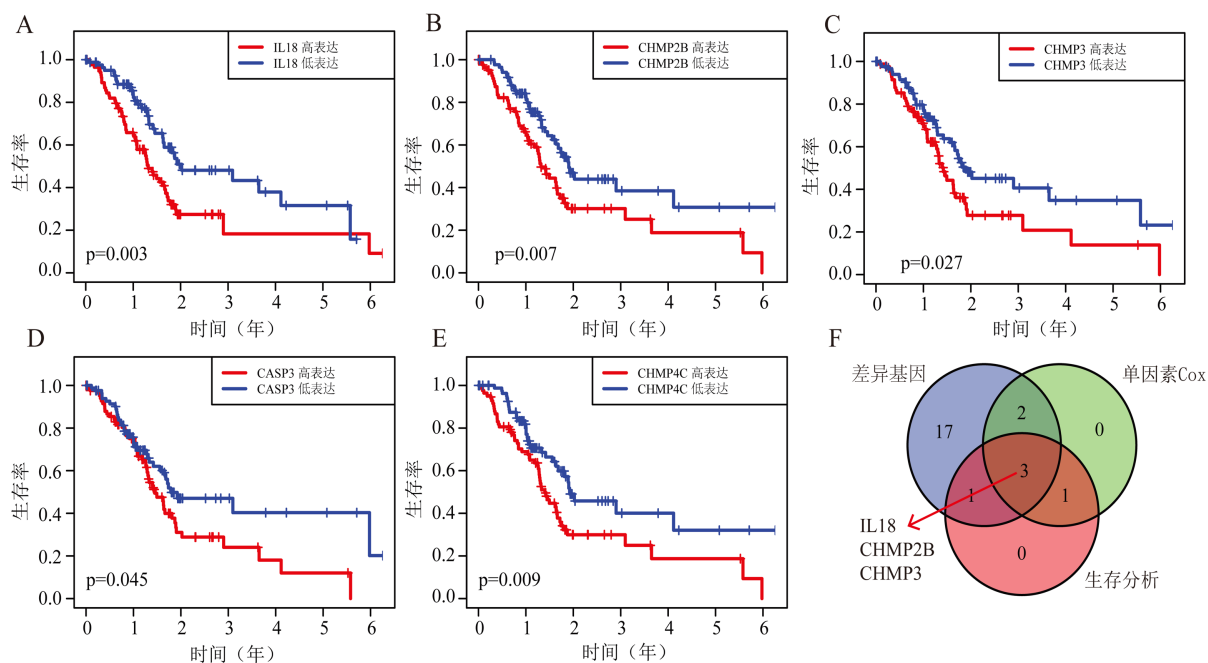


Figure 2. Survival analysis of pyroptosis-related genes in pancreatic adenocarcinoma

图 2. 胰腺癌细胞焦亡基因的生存分析

3.3. 构建胰腺癌的风险预测模型

应用 LASSO-Cox 回归算法构建胰腺癌患者焦亡相关基因的风险评分模型, 选择 IL18、CHMP2B 和 CHMP3 构建风险信号, 计算胰腺癌患者的风险评分(图 3(A), 图 3(B))。以风险评分的中值 6.824711 作为基础, 将胰腺癌患者分为高风险组和低风险组。生存分析结果表明, 高风险组胰腺癌患者的总体生存率更差(图 3(C))。由于胰腺癌患者的总体生存时间不长, 因此 ROC 曲线仅验证了 0.5 年、1 年和 3 年, 图 3(D)~(F)显示该风险特征的 0.5 年、1 年和 3 年 ROC 曲线的曲线下面积(AUC)分别为 0.763、0.639 和 0.684, 表明该风险标志物对胰腺癌患者的短期生存率预测具有良好的特异性和敏感性。

3.4. 风险预测模型基因标志物的验证

为了提高胰腺癌细胞焦亡基因风险评分模型的准确性, 我们利用 GEPIA2.0 对这三个基因标志物进行了差异表达和生存分析的验证。如图 4(A)~(C)所示, 与正常组织相比, IL18、CHMP2B 和 CHMP3 在胰腺癌肿瘤组织中的表达显著升高。并且, 从生存曲线可知, IL18、CHMP2B 和 CHMP3 均是预后不良因素(图 4(A)~(C))。多基因生存分析显示, 与低表达 IL18、CHMP2B 和 CHMP3 的胰腺癌患者相比, 高表达的患者总体生存率($P = 0.0014$)和无病生存率(DFS, $P = 0.013$)均显著较差(图 4(D), 图 4(E))。

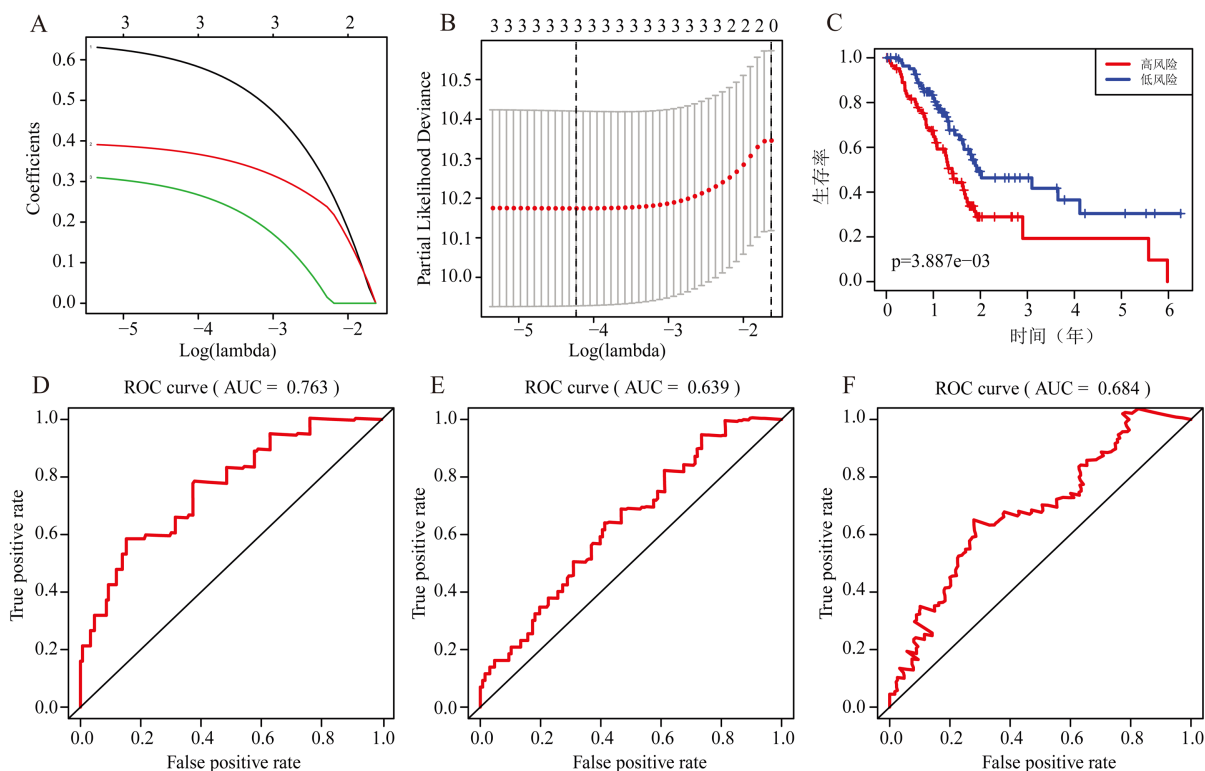
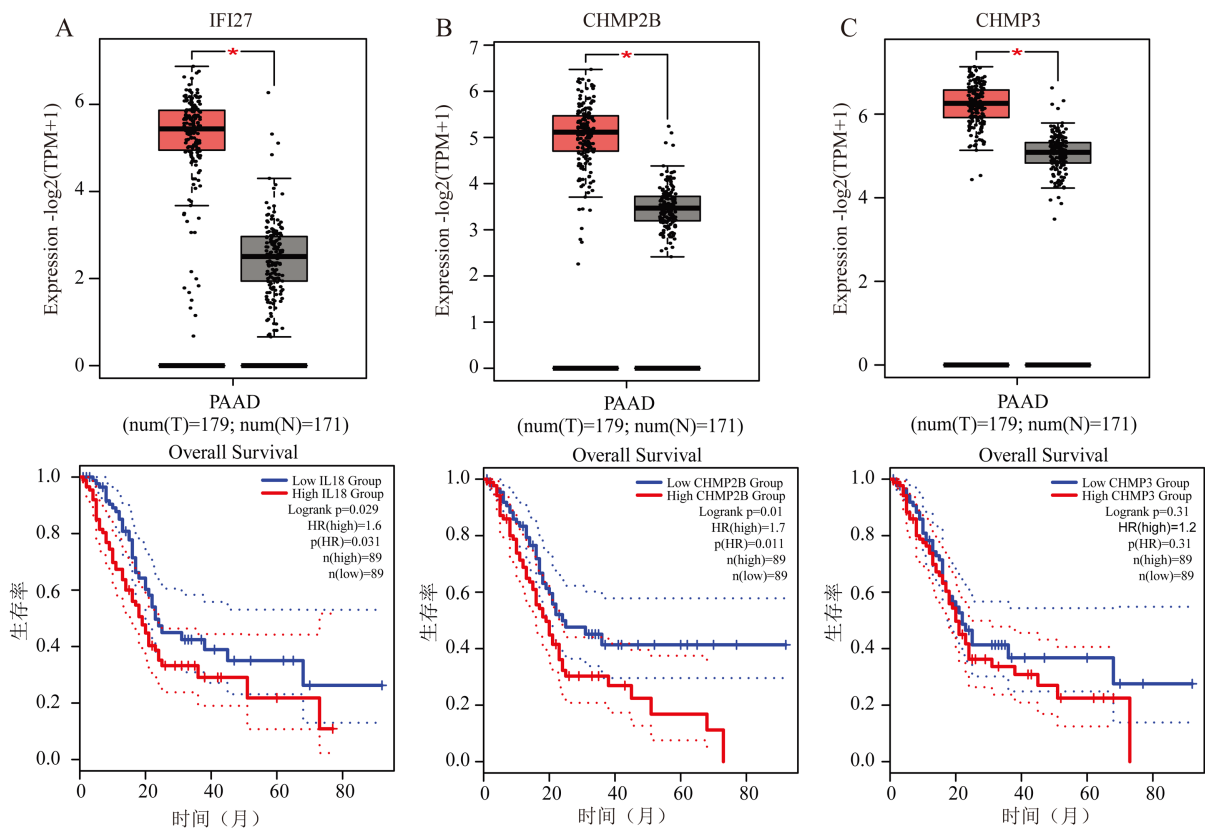


Figure 3. Construction of risk prediction model of pancreatic cancer

图 3. 胰腺癌焦亡基因风险预测模型的构建



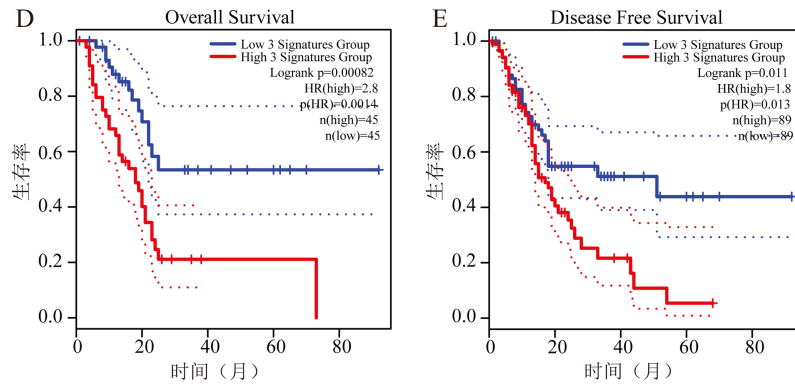


Figure 4. Validation of gene markers of risk prediction model
图 4. 风险预测模型基因标志物的验证

3.5. 风险评分和其他临床病例特征的关系

M 分期有大量的缺失而被排除，仅保留了具有完整生存数据和临床病理信息的 167 个患者。研究风险评分与临床病理特征之间的关系，发现风险评分与胰腺癌患者的生存状态密切相关(图 5(A))。此外，与低风险组患者相比，高风险组的胰腺癌患者的 IL18、CHMP2B 和 CHMP3 的表达水平更高(图 5(A))，***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$ 。接下来，研究风险评分是否能作为一个独立的预后指标，单因素 Cox 回归分析发现风险评分、年龄和 N 分期与胰腺癌患者的预后密切相关(图 5(B))。结合多因素 Cox 回归分析表明风险评分可以作为胰腺癌患者的独立预后指标(HR = 1.105, 95%CI = 1.059~1.154) (图 5(C))。

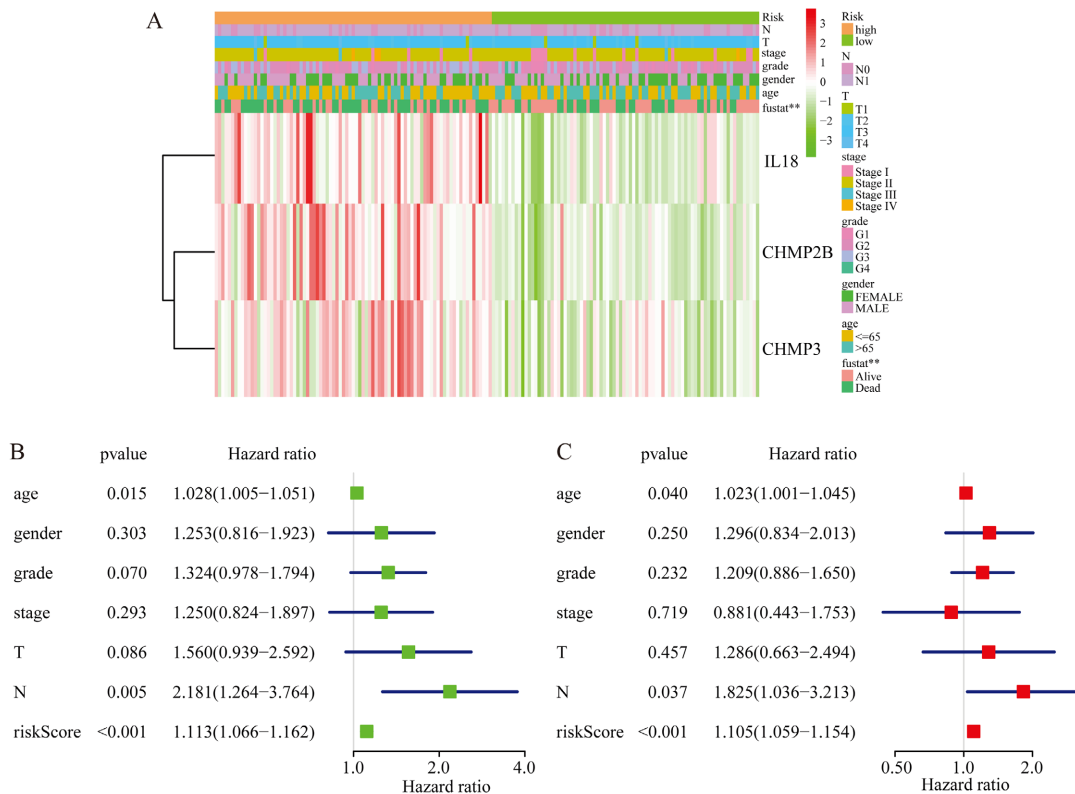


Figure 5. Independent prognostic analysis of risk prediction model
图 5. 风险预测模型的独立预后分析

4. 讨论

胰腺癌作为高度恶性的胃肠道肿瘤，其生存率极低，仅为 10% [1]。因此，寻找一种可靠的胰腺癌预后指标一直是热门话题。细胞焦亡作为广泛存在于肿瘤细胞中的死亡方式，在肿瘤发生发展中的作用随着研究的深入而日渐凸显。对于肿瘤而言，细胞焦亡是一把双刃剑。一方面，作为一种固有免疫机制，焦亡能抑制肿瘤的发生发展；另一方面，作为一种炎性细胞死亡方式，焦亡又为肿瘤生长提供了适宜的微环境。细胞焦亡通路的关键成分：炎性小体、焦孔素蛋白和促炎细胞因子等均与肿瘤的发生、侵袭和转移相关[17]。有研究表明，炎症小体 NLRP3 参与宫颈癌的固有免疫反应过程，激活的 NLRP3 炎症小体能够诱导宫颈癌细胞发生焦亡[18] [19]。人肺癌细胞 A549 的研究表明细胞焦亡的发生可以促进肺癌细胞的生长、增殖、迁移以及侵袭[20]。由此可见，细胞焦亡在肿瘤的发生发展过程中有着重要作用，因此细胞焦亡相关基因不仅是细胞焦亡的调节因子，更有望成为肿瘤早期诊断的标志物与肿瘤抗癌治疗的新靶点。

本研究筛选到了 IL18、CHMP2B 和 CHMP3 是 PAAD 的预后相关基因，其在胰腺癌中的表达显著增加，并且高表达与预后差显著相关。通过构建三个标志物的有效风险预测模型，提示这三个基因可能成为胰腺癌治疗和预后评估的靶点，它们的表达越高 PAAD 患者预后越差。IL18 (Interleukin 18)是一种炎性细胞因子编码基因，血清 IL-18 的水平可能与 ENKTL 患者的血液吞噬功能和不良生存结局有关[21]。而有的研究表明炎症小体激活 IL-18 和 IL-1 β 是一种结合先天性和适应性免疫应答系统的协同作用，因而产生抗病毒和抗肿瘤活性[22]。人乳头瘤病毒感染的控制依赖于合适的免疫应答，并且需要通过炎症小体激活 IL-18 和 IL-1 β ，以刺激先天免疫系统和适应性免疫系统之间的协调并产生有效的抗肿瘤反应[23]。CHMP2B (Charged Multivesicular Body Protein 2B)编码异聚体 ESCRT-III 复合物的一个组成部分，该复合物在细胞表面受体的再循环或降解中起作用[24]。虽然 CHMP2B 与肿瘤的关系研究较少，但也有文献报道 CHMP2B 的过表达提示较高的肿瘤分级[25]。CHMP3 (Charged Multivesicular Body Protein 3)与肿瘤进展的关系与我们的结论相反，有研究表明过表达 CHMP3 可以抑制 A549 肺泡上皮细胞的上皮间质转化进程[26]。也有研究称 CHMP3 在乳腺癌等多种人类癌症中显著下调，CHMP3 表达越高，患者 3 年和 5 年生存率越高[27]，但是我们的研究发现 CHMP3 在胰腺癌中显著上调，其表达越高预后越差。

本研究利用生物信息学分析技术对来自于 TCGA 和 GTEx 的胰腺癌数据进行了系统分析，筛选出了与胰腺癌预后显著相关的细胞焦亡相关基因，尽管如此，本研究仍然存在一定的局限性，为了提高验证结果的准确性，还需要通过进一步的临床实验进行探究，因此后期将进一步通过体内或体外实验来验证 IL18、CHMP2B 和 CHMP3 的表达与胰腺癌进展的相关性，探索它们的预后价值，并深入探究其影响机制。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., *et al.* (2021) Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- [2] Wolfgang, C.L., *et al.* (2013) Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **63**, 318-348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>
- [3] VeDa, T.G. (2015) Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **16**, 5619. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5619>
- [4] Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., *et al.* (2015) Old, New and Emerging Functions of Caspases. *Cell Death & Differentiation*, **22**, 526-539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- [5] Wang, Z., Jensen, M.A. and Zenklusen, J.C. (2016) A Practical Guide to the Cancer Genome Atlas (TCGA). Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_6
- [6] Hnzemann, S., Castelo, R. and Guinney, J. (2013) GSVA: Gene Set Variation Analysis for Microarray and RNA-Seq

- Data. *BMC Bioinformatics*, **14**, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- [7] Subramanian, A., Amayo, P., Mootha, V.K., *et al.* (2005) Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- [8] Pilla, D.M., Hagar, J.A., Haldar, A.K., *et al.* (2014) Guanylate Binding Proteins Promote Caspase-11-Dependent Pyroptosis in Response to Cytoplasmic LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 6046. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321700111>
- [9] Block, K.I., *et al.* (2018) Integrative Treatment for Colorectal Cancer: A Comprehensive Approach. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine: Research on Paradigm, Practice, and Policy*, **24**, 890-901. <https://doi.org/10.1089/acm.2018.0125>
- [10] Georgescu, S.R., *et al.* (2018) New Insights in the Pathogenesis of HPV Infection and the Associated Carcinogenic Processes: The Role of Chronic Inflammation and Oxidative Stress. *Journal of Immunology Research*, **2018**, Article ID: 5315816. <https://doi.org/10.1155/2018/5315816>
- [11] Damian, S., Andrea, F., Michael, K., *et al.* (2011) The STRING Database in 2011: Functional Interaction Networks of Proteins, Globally Integrated and Scored. *Nucleic Acids Research*, **39**, 561-568. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq973>
- [12] Ritchie, M.E., Belinda, P., Wu, D., *et al.* (2015) Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Research*, **43**, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- [13] Kolde, R. (2015) Pheatmap: Pretty Heatmaps.
- [14] Therneau, T.M. and Grambsch, P.M. (2013) Modeling Survival Data: Extending the Cox Model.
- [15] Chen, H. (2017) VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots.
- [16] Tang, Z., Kang, B., Li, C., *et al.* (2019) GEPIA2: An Enhanced Web Server for Large-Scale Expression Profiling and Interactive Analysis. *Nucleic Acids Research*, **47**, W5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
- [17] 连博文. ESCRT 系统成员 CHMP3 对 A549 细胞上皮-间质转化过程的影响及其分子机制的研究[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [18] Wang, Z. and Wang, X. (2020) miR-122-5p Promotes Aggression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer by Suppressing Charged Multivesicular Body Protein 3 through Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Cellular Physiology*, **235**, 2825-2835. <https://doi.org/10.1002/jcp.29188>
- [19] Krasniak, C.S., *et al.* (2016) The Role of CHMP2B Intron5 in Autophagy and Frontotemporal Dementia. *Brain Research*, **1649**, 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.051>
- [20] Wang, T., Goodman, M.A., MCGough, R.L., *et al.* (2014) Immunohistochemical Analysis of Expressions of RB1, CDK4, HSP90, cPLA2G4A, and CHMP2B Is Helpful in Distinction between Myxofibrosarcoma and Myxoid Liposarcoma. *International Journal of Surgical Pathology*, **22**, 589. <https://doi.org/10.1177/1066896914532539>
- [21] Matamoros, J.A., Silva, M., Moura, P., *et al.* (2019) Reduced Expression of IL-1 β and IL-18 Proinflammatory Interleukins Increases the Risk of Developing Cervical Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, **20**, 2715-2721. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.9.2715>
- [22] Gram, A.M., Frenkel, J. and Rensing, M.E. (2012) Inflammasomes and Viruses: Cellular Defence versus Viral Offence. *Journal of General Virology*, **93**, 2063-2075. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042978-0>
- [23] Won, L.S., Ju, R.K., Hansang, L., *et al.* (2018) Serum IL18 Is Associated with Hemophagocytosis and Poor Survival in Extranodal Natural Killer/T-Cell Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, **60**, 317-325.
- [24] 罗远材, 张玉华. 炎性体抗病毒信号通路与宫颈癌[J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 42(3): 245-248.
- [25] 王艳丽. NLRP3 炎症小体活化对肺腺癌细胞 A549 增殖, 迁移, 侵袭的影响及其作用机制[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京医科大学, 2015.
- [26] Kolb, R., Liu, G.H., Janowski, A.M., *et al.* (2014) Inflammasomes in Cancer: A Double-Edged Sword. *Protein & Cell*, **5**, 12-20. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-0001-4>
- [27] Hoseini, Z., Sepahvand, F., Rashidi, B., *et al.* (2018) NLRP3 Inflammasome: Its Regulation and Involvement in Atherosclerosis. *Journal of Cellular Physiology*, **233**, 2116-2132. <https://doi.org/10.1002/jcp.25930>