

IL-17信号通路抑制剂细胞筛选模型的优化及应用

薛妮娜, 季 鸣, 张明祎, 刘羿晨, 陈晓光*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室/
创新药物非临床药物代谢及PK/PD研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 本研究摸索及验证 HEK-Blue-IL-17 细胞模型的筛选条件, 并应用该模型筛选抑制 IL-17 信号通路的化合物。按 5×10^4 个/孔的密度, 将 HEK-Blue-IL-17 细胞接种在 96 孔培养板中, 分别加入不同浓度的 IL-17A 或 IL-17F 和待筛选化合物培养 16 h, 移取培养上清与 QUANTI-Blue 反应 1 或 3 h, 在 $\lambda_{655 \text{ nm}}$ 处检测吸光度值。通过碱性磷酸酶 (secreted alkaline phosphatase, SEAP) 的生成量来反映该细胞模型中 IL-17 信号通路的活化状态。实验显示: IL-17A 和 IL-17F 均可显著性地激活 HEK-Blue IL-17 细胞。IL-17A 和 IL-17F 分别在 10 和 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下可产生较高的响应值。SEAP 与 QUANTI-Blue 反应 1 h 基本可达到终点反应。牛蒡子苷元 (arctigenin) 和表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 对 IL-17A 和 IL-17F 刺激的信号通路具有一定的抑制活性。本实验建立并优化了 HEK-Blue IL-17 细胞模型, 可用于 IL-17 信号通路抑制剂的筛选。

关键词: 白介素 17; 筛选模型; 自身免疫性疾病; 肿瘤免疫

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)10-1858-05

The optimization and application of cell-based screening model for IL-17-mediated signaling pathway

XUE Ni-na, JI Ming, ZHANG Ming-yi, LIU Yi-chen, CHEN Xiao-guang*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines/Beijing Key Laboratory of Non-clinical Drug Metabolism and PK/PD Study, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: We explore and verify the optimized condition for HEK-Blue IL-17 screening model, and screen the compounds that inhibits IL-17-mediated signaling pathway. HEK-Blue IL-17 cells (5×10^4 cells per well) were seeded into the 96 plates followed by different concentrations of IL-17A or IL-17F alone, or in combination with tested compounds for 16 h. Then, the supernatant medium was incubated with QUANTI-Blue for 1 or 3 h to detect the OD value at $\lambda_{655 \text{ nm}}$. The secreted alkaline phosphatase (SEAP) production was an index of IL-17-mediated signaling activation in HEK-Blue IL-17 cells. We found that both IL-17A and IL-17F can significantly activate the IL-17 signaling pathway in HEK-Blue IL-17 cells. The available dosage of IL-17A and IL-17F were 10 and 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The reaction time of SEAP and QUANTI-Blue was 1 h. In this model, arctigenin and epigallocatechin gallate (EGCG) could inhibit the IL-17A and IL-17F-mediated signaling pathway. This established and optimized screening model of HEK-Blue IL-17 cells was suitable for screening inhibitors of IL-17-mediated signaling pathway.

Key words: interleukin-17; screening model; autoimmune disease; tumor immunity

收稿日期: 2019-08-30; 修回日期: 2019-09-23.

基金项目: 十三五国家重大新药创制科技重大专项 (2018ZX09711001-003).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: chxg@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0703

白介素-17 (interleukin-17, IL-17) 是重要的促炎症细胞因子, 该家族由 6 名成员组成, 分别是 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E (又名 IL-25) 和 IL-17F。其中 IL-17A 和 IL-17F 在辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 细胞免疫中发挥重要作用。IL-17A 和 IL-17F 具有 50% 的同源性, 它们可组成同源二聚体或者异源二聚体与 IL-17RA/IL-17RC 结合, 通过信号转导复合体 IL-17R-Act1-TRAF6 激活下游核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 和有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路^[1]。IL-17A 和 IL-17F 广泛地参与了众多自身免疫性疾病的病理性进程, 如类风湿性关节炎、慢性阻塞性肺病、银屑病、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎和多发性硬化症等^[2-4]。目前有两个靶向 IL-17A 的单克隆抗体 ixekizumab (Eli Lilly) 和 secukinumab (Novartis) 及一个靶向 IL-17RA 的单克隆抗体 brodalumab (Valeant) 上市, 批准用于银屑病或银屑病性关节炎的治疗。虽然肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 单抗已经占领银屑病市场, 但仍有高达 40% 的患者对 TNF α 阻断剂治疗不足或无反应。而 IL-17A 拮抗剂对 TNF α 单抗治疗效果不佳及出现严重不良反应而停药的银屑病患者同样有效。除了在银屑病中的重要作用外, IL-17A 和 IL-17F 还参与肿瘤的生长、血管形成和肿瘤免疫调节^[5-7]。IL-17 能促进多种恶性肿瘤细胞分泌促血管生成因子血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、前列腺素 (prostaglandin E, PGE)、趋化因子和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 2 和 9, 从而促肿瘤微血管的生成^[8]。在肿瘤微环境中 IL-17 具有双重调节作用, 一方面可募集大量的骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), 抑制机体抗肿瘤免疫^[9,10]; 另一方面可以激活肿瘤特异的 CD8⁺ T 细胞, 从而杀伤肿瘤^[11-13]。因此, 靶向 IL-17 新型小分子药物的研发具有重要的临床意义和市场前景, 不仅能极大地改善银屑病、银屑病关节炎及其他自身免疫性疾病的治疗, 而且在恶性肿瘤的治疗上也会有更广阔的应用前景。

为了筛选 IL-17 信号通路抑制剂, 本研究采用了 Invivogen 公司的 HEK-Blue IL-17 细胞。HEK-Blue IL-17 细胞模型稳定表达人源 IL-17RA/IL-17RC 异二聚体受体和 Act1 衔接分子, 同时还表达 NF- κ B 和 AP-1 诱导的碱性磷酸酶 (secreted alkaline phosphatase, SEAP) 报告基因。当 IL-17A 和 IL-17F 与 IL-17RA/IL-17RC 结合后, 活化的异二聚体募集 AP-1 调节子, 并诱导 TNF 受体诱导因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6) 泛素化, 从而触发 NF- κ B 和 AP-1 信号活化级

联反应, 最终产生可分泌到细胞外的 SEAP, 并通过与 QUANTI-Blue 反应在波长 655 nm 下检测 SEAP 的含量。本研究采用 HEK-Blue IL-17 细胞, 确立了用于筛选 IL-17 信号通路抑制剂的最佳条件, 并筛选发现了一些可抑制 IL-17 介导的信号通路的天然产物, 为后续研发 IL-17 小分子抑制剂奠定基础。

材料与方法

细胞 HEK-Blue IL-17 细胞购自法国 Invivogen 公司。

试剂与药物 人 IL-17A 重组蛋白、anti-hIL-17A-IgG、QUANTI-Blue、Normocin 和 HEK-Blue Selection 购自法国 Invivogen 公司; 人 IL-17F 重组蛋白购自美国 PeproTech 公司。牛蒡子苷元由鲁南制药提供。表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG)、咖啡酸苯乙酯、染料木素 (genistein) 均购自中国食品药品检定研究院。绿原酸由四川九章生物科技公司提供。化合物纯度均大于 98%。

仪器与设备 Biotek 全波长酶标仪 (美国)。

细胞培养与传代 HEK-Blue IL-17 细胞培养于 DMEM 培养基中 (1 \times HEK-Blue Selection 抗生素、100 μ g \cdot mL⁻¹ Normocin、100 u \cdot mL⁻¹ 青霉素、100 μ g \cdot mL⁻¹ 链霉素和 10% 灭活 FBS), 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育箱中贴壁生长。待细胞密度融合至 70%~80% 时, 将贴壁生长的细胞轻轻拍下 (勿用胰酶消化或吹打细胞), 1 200 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 用 37 $^{\circ}$ C 预热的完全培养基重悬培养。

HEK-Blue IL-17 细胞筛选模型的验证及条件优化 参照 Ji 等^[14] 的方法, 取对数生长期的 HEK-Blue IL-17 细胞计数, 按照 5 \times 10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中 (每孔 180 μ L), 随后向每孔加入 20 μ L 不同质量浓度 (0.000 01~100 ng \cdot mL⁻¹) 的细胞因子 IL-17A 或 IL-17F, 对照组加入完全培养基 (每孔 20 μ L), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞孵育箱中培养 16 h。从该 96 孔板中移取 20 μ L 培养上清至新的 96 孔板, 再向每孔加入 180 μ L 37 $^{\circ}$ C 预热的 QUANTI-Blue 显色液, 37 $^{\circ}$ C 孵育不同时间后, 于 $\lambda_{655\text{nm}}$ 下测定吸收度值 (A)。在确定最佳刺激条件下, 并检测不同浓度 (0.01~1 000 ng \cdot mL⁻¹) 的 anti-hIL-17A-IgG 对该信号通路的抑制活性。

化合物筛选 参照上述方法, 每孔加入 160 μ L 细胞悬液 (5 \times 10⁴ 个/孔) 置孵育箱中培养 4 h, 待细胞沉降贴壁后加入 20 μ L 不同浓度的检测化合物孵育 1 h, 随后加入 20 μ L IL-17A 或 IL-17F 细胞因子 (终质量浓度: IL-17A, 10 ng \cdot mL⁻¹; IL-17F, 100 ng \cdot mL⁻¹) 继续培养 16 h。阳性对照药为 anti-hIL-17A-IgG。体系中的

DMSO 含量 \leq 1%。阴性对照组为 40 μ L 完全培养基+160 μ L 的细胞悬液。阳性对照组为 20 μ L IL-17A/IL-17F 细胞因子+20 μ L 完全培养基+160 μ L 的细胞悬液。从 96 孔板中移取 20 μ L 培养上清至新的 96 孔板, 向每孔加入 180 μ L 37 $^{\circ}$ C 预热的 QUANTI-Blue 显色液, 37 $^{\circ}$ C 孵育不同时间后, 于 $\lambda_{655\text{ nm}}$ 下测定 A 值。

免疫印迹法检测 p-p65、p-p38 和 p-ERK1/2 蛋白表达 收集不同浓度牛蒡子苷元和 EGCG 处理过的 HEK-Blue IL-17 细胞, 用预冷的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 用 BCA 蛋白检测试剂盒定量蛋白浓度。蛋白样品经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 随后转印至 PVDF 膜上, 经过一抗、二抗孵育, ECL 化学发光, 凝胶成像仪显影。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 8 软件进行绘图, 数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据分析采用 Student's t -test 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义差异。计算化合物对 IL-17 信号通路的抑制率, 公式如下: 抑制率 (%) = $1 - (A_{\text{comp}} - A_{\text{v}}) / (A_{\text{p}} - A_{\text{v}}) \times 100\%$, 其中 Comp 为待测化合物, V 为阴性对照组, P 为阳性对照组。

结果

1 模型的验证

首先检测了人源细胞因子 IL-17A 和 IL-17F 对 HEK-Blue-IL17 细胞的激活作用, 结果见图 1。10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ IL-17A 和 IL-17F 均可显著激活 HEK-Blue IL-17 细胞下游 NF- κ B 和 AP-1 信号活化级联反应, 促进细胞外 SEAP 的产生。而同剂量的 IL-17A 对该信号通路的刺激活性强于 IL-17F ($P < 0.0001$)。在此基础上, 本研究检测了不同浓度的 IL-17A 和 IL-17F 对 HEK-Blue IL-17 细胞信号通路的活化作用, 以及生成的 SEAP 与 QUANTI-Blue 反应不同时间的吸收度值。如图 2 所示, 随着 IL-17A 和 IL-17F 浓度的增加, HEK-Blue IL-17 细胞信号通路的活化程度越强, 产生的 SEAP 量越多, 与 QUANTI-Blue 反应值越高。10 和 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下的 IL-17A 对 HEK-Blue IL-17 细胞信号刺激效应基本无差异, 反应值分别在 1.53 和 1.67。而 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下的 IL-17F 对 HEK-Blue IL-17 细胞信号刺激效应可达 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下的约 2 倍, 反应值分别在 1.43 和 0.80。100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下的 IL-17F 与 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 剂量下的 IL-17A 在 HEK-Blue IL-17 细胞上的反应值基本相当。此外, SEAP 与 QUANTI-Blue 反应 1 和 3 h 所测的吸收度值基本接近。因此, 本实验最终选用的条件为: IL-17A 和 IL-17F 的刺激浓度分别为 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, SEAP 与 QUANTI-Blue 反应 1 h 在 $\lambda_{655\text{ nm}}$ 下测定吸收度值即可。

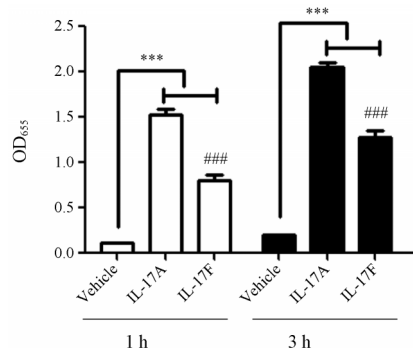


Figure 1 The activated effect of IL-17A and IL-17F on HEK-Blue IL-17 cells. (50 000 cells per well, cytokine incubation for 16 h, reaction time of QUANTI-Blue: 1, 3 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs vehicle; ### $P < 0.001$ vs IL-17A)

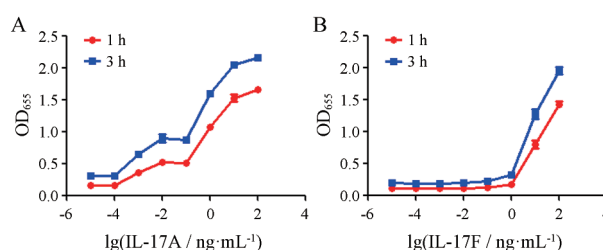


Figure 2 The activated effect of different dosage of IL-17A (A) and IL-17F (B) on HEK-Blue IL-17 cells

在确定 HEK-Blue-IL17 细胞的最佳反应条件的基础上, 本研究首先验证了 anti-hIL-17A-IgG 对 IL-17A 活化该细胞信号通路的抑制作用。由图 3 可见, anti-hIL-17A-IgG 可呈浓度依赖性地抑制 IL-17A 介导的信号通路, 其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 10.16 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (1 h)、10.59 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (3 h)。综上所述, 该反应条件可以实现 HEK-Blue IL-17 细胞对 IL-17 信号通路抑制剂的筛选。

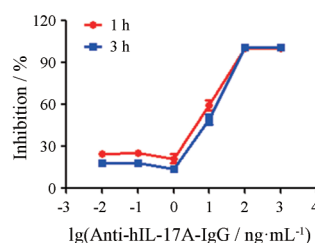


Figure 3 The inhibitory effect of anti-hIL-17A-IgG on IL-17A-mediated signaling pathway

2 化合物筛选

本研究检测了 3 种天然产物在 HEK-Blue IL-17 细胞模型上对 IL-17A 和 IL-17F 介导的信号通路的作用。由表 1 可见, 阳性药 anti-hIL-17A-IgG 可剂量依赖性地抑制 IL-17A 刺激的信号通路活化, 对 IL-17F 刺激的信

号通路活化不影响。这提示, anti-hIL-17A-IgG 有很好的选择性。牛蒡子苷元和 EGCG 对 IL-17A 和 IL-17F 介导的信号通路均显示一定程度的抑制作用, 而染料木素对 IL-17A 和 IL-17F 介导的信号通路无影响。同时, 细胞增殖抑制实验显示该条件下牛蒡子苷元、EGCG 和染料木素对 HEK-Blue IL-17 细胞的增殖无影响。这提示, 牛蒡子苷元和 EGCG 对 IL-17A 和 IL-17F 介导的信号通路的抑制作用不是由于抑制细胞增殖所致。

Table 1 The inhibitory effect of natural products on IL-17A/F-mediated signaling pathway

Compound	Concentration	IL-17A	IL-17F
		inhibition/%	inhibition/%
Arctigenin / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1	13.37 \pm 4.92	4.37 \pm 2.21
	0.3	14.92 \pm 6.13	2.70 \pm 3.20
	1	18.74 \pm 4.33	11.71 \pm 2.36
	3	19.29 \pm 1.31	12.19 \pm 4.13
	10	95.84 \pm 0.83	94.71 \pm 0.12
Genistein / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1	4.11 \pm 4.96	7.67 \pm 2.36
	0.3	2.25 \pm 6.42	1.34 \pm 3.94
	1	2.19 \pm 6.23	5.51 \pm 1.97
	3	7.86 \pm 2.39	3.64 \pm 0.30
	10	-5.90 \pm 2.09	-5.65 \pm 1.23
EGCG / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.1	50.92 \pm 0.97	50.81 \pm 4.33
	0.3	47.34 \pm 2.43	50.63 \pm 3.30
	1	50.27 \pm 1.70	50.70 \pm 1.72
	3	52.64 \pm 1.85	50.67 \pm 0.10
	10	53.47 \pm 2.34	47.12 \pm 6.30
Anti-hIL-17A-IgG / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.01	0.10 \pm 1.72	-
	0.1	0.72 \pm 3.07	-
	1	-3.78 \pm 6.99	-
	10	41.85 \pm 7.59	-
	100	91.04 \pm 0.26	-

3 化合物验证

本研究检测了牛蒡子苷元和 EGCG 对 IL-17A 刺激的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路关键信号分子表达量的影响。由图 4 可见, IL-17A 可以激活 NF- κ B 信号通路中 p-p65 的表达, 但对 MAPK 信号通路中 p-p38 和 p-ERK1/2 几乎不影响。牛蒡子苷元、EGCG 和阳性药 anti-hIL-17A-IgG 均有降低 p-p65 表达的作用。此外, 牛蒡子苷元显示抑制 p-ERK1/2 表达的作用, 而 EGCG 有降低 p-p38 表达的作用。

讨论

IL-17A 和 IL-17F 作为 Th17 细胞的主要标志产物, 在机体的天然免疫和获得性免疫系统中均发挥着重要作用。它们参与机体抗感染免疫、自身免疫性疾病相关的病理性炎症反应及肿瘤发生和进展等过程。其中, IL-17A 对维持银屑病斑块的炎症反应起着关键性

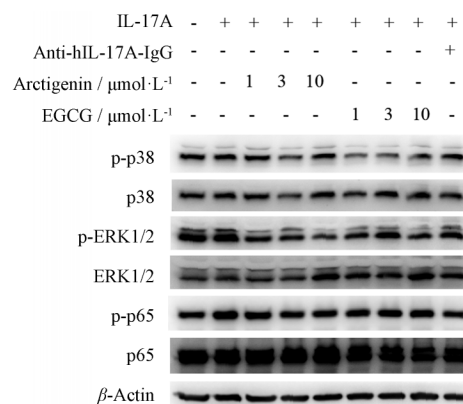


Figure 4 The expressions of key molecules in NF- κ B and MAPK signaling pathway after exposure to arctigenin and EGCG

的作用。它通过促进上皮细胞产生促炎细胞因子、趋化因子和抗微生物肽诱导皮肤炎症反应^[15]。而 IL-17 在调节恶性肿瘤进程中具有双重作用。在促进肿瘤发展方面, IL-17 通过促进一些炎症因子的分泌和募集髓系抑制细胞, 从而促进肿瘤血管生成和转移^[9]; 在抑制肿瘤发展方面, IL-17 可增强细胞毒性 T 细胞的免疫清除能力^[13]。因此, 阻断 IL-17 信号通路可成为治疗自身免疫性疾病和肿瘤的一个新策略。

目前, 针对靶向筛选 IL-17 信号通路抑制剂的报道较少, 仅有 Xu 等^[16]报道的针对 CNS2-IL17A-RORE 建立的双荧光素酶报告基因方法。该方法可用于筛选影响 IL-17 转录的化合物。而该实验优化的 HEK-Blue IL-17 细胞模型筛选方法操作简单、所需检测试剂廉价, 并可实现高通量筛选。该细胞模型是用于筛选对 IL-17A、IL-17F 介导的信号通路具有抑制作用的化合物。这两种模型是针对 IL-17 信号通路不同层面的筛选方法, 可作为相互补充, 用于不同类型的 IL-17 抑制剂的研发。研究中发现同剂量的 IL-17A 比 IL-17F 激活该信号通路的能力强, 这可能与 IL-17A 对 IL-17RA/IL-17RC 亲和能力强有关^[1]。因此, 目前开发的靶向 IL-17 的抑制剂均以抑制 IL-17A 的作用为主。由于没有找到 IL-17F 特异性中和抗体, 本研究只采用了 anti-hIL-17A-IgG 对该细胞模型进行了验证。Anti-hIL-17A-IgG 显示出强效并特异性地抑制 IL-17A 介导的信号通路活化。这提示, 该模型可以用于选择性 IL-17 抑制剂的筛选。在化合物筛选过程中发现, 牛蒡子苷元和 EGCG 对 IL-17A 刺激的信号通路表现出与 IL-17F 刺激的信号通路基本一致的抑制活性。这提示, 牛蒡子苷元和 EGCG 有可能作用于 IL-17RA / IL-17RC 或者其介导的 NF- κ B 和 AP-1 信号通路, 而不是作用于 IL-17A 或 IL-17F 本身。由于 IL-17F 与肿瘤免疫密切相关, 本研究也检测了一些其他天然产物对 IL-17F 介

导的信号通路的影响,包括绿原酸、小白菊内酯衍生物和咖啡酸苯乙酯。20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸对IL-17F介导的信号通路抑制活性可达34.59%,而小白菊内酯衍生物和咖啡酸苯乙酯对IL-17F介导的信号通路的 IC_{50} 分别为7.38和11.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在此基础上,本研究进一步检测了牛蒡子苷元和EGCG对IL-17A刺激的NF- κ B和MAPK信号通路关键信号分子的表达情况。牛蒡子苷元和EGCG对IL-17A诱导的p-p65活化有一定的抑制作用。以上结果说明,牛蒡子苷元和EGCG抑制HEK-Blue IL-17细胞IL-17A的信号通路可能与抑制NF- κ B信号通路密切相关。

References

- [1] Toy D, Kugler D, Wolfson M, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex [J]. J Immunol, 2006, 177: 36-39.
- [2] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis [J]. J Clin Invest, 1999, 103: 1345-1352.
- [3] Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, et al. Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival [J]. Transplant Proc, 1999, 31: 93.
- [4] Kugyelka R, Kohl Z, Olasz K, et al. Enigma of IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis and in autoimmune animal models of arthritis [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 6145810.
- [5] Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and *in vivo* growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis [J]. J Immunol, 2005, 175: 6177-6189.
- [6] Zhang Q, Liu S, Xiong Z, et al. Interleukin-17 promotes development of castration-resistant prostate cancer potentially through creating an immunotolerant and pro-angiogenic tumor microenvironment [J]. Prostate, 2014, 74: 869-879.
- [7] Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth [J]. Blood, 2003, 101: 2620-2627.
- [8] Li J, Lau GK, Chen L, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis *via* NF- κ B induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression [J]. PLoS One, 2011, 6: e21816.
- [9] Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, et al. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production [J]. J Immunol, 2001, 167: 4137-4140.
- [10] Li Q, Liu L, Zhang Q, et al. Interleukin-17 indirectly promotes M2 macrophage differentiation through stimulation of COX-2/PGE₂ pathway in the cancer cells [J]. Cancer Res Treat, 2014, 46: 297-306.
- [11] Benchetrit F, Cirec A, Vives V, et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism [J]. Blood, 2002, 99: 2114-2121.
- [12] Nunez S, Saez JJ, Fernandez D, et al. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour [J]. Immunology, 2013, 139: 61-71.
- [13] Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity [J]. Immunity, 2009, 31: 787-798.
- [14] Ji M, Xue NN, Huang R, et al. Validation and application a cell-based screening model for IL-6/JAK/STAT3 inhibitor [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 749-753.
- [15] Harper EG, Guo C, Rizzo H, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes *in vitro* and *in vivo*: implications for psoriasis pathogenesis [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129: 2175-2183.
- [16] Xu T, Wang X, Zhong B, et al. Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR γ t protein [J]. J Biol Chem, 2011, 286: 22707-22710.