1 ,

y , , , v , , , , , ,*

Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China
Hangzhou Health Sky Biotechnology Co., Ltd, China
Institute of Viral Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, China

A R T I C L E I N F O

Article history:
1 ,01
1 y ,01
y ,01
, y ,01

Keywords:
1 ,

A B S T R A C T

y fl -
z . y ( ) fi y 1
, (-) -1 . -
fi y - -1 - . -
-1 - fi y ,
- .
fi y - fi y , , -γ-
, -10- . , -
-10, , - -γ y
. y -
- - -
y .
,01 . .

1. Introduction

1 . y
00,000 ,
,00,000 y .
,000 0,000 .
( ) -
y – . ,0
.
- - -
y 000 . 100 y
z , 1 1 y
,10 . y (1
) . , (1 ,) 11 . ,
y - y z

1 ,1 . y

1 . y 1 -1 . -1 y - 1 *ras* y / 1 . - . y - 0 .

2. Materials and methods

2.1. Vaccine formulations

1 (-) z *Escherichia coli* - fi y y %. 0- , - y (.0) 0. y - , z - – . ( ) -) ., . (,). y - 10 0. , 1.0 .0 / . <0. / - y y (& ., ,) - .

2.2. Tumor cell line

-1 y 1 0 (y ,) 10% (y ,).

2.3. Tumor model and vaccination

/ ( ) - y . .(,) y - y y y . , y (. .) 10 -1 (100 µ) y — 1, - y (. .) 1 0 µ - 00 µ (0, 100, 00 00 µ) (100 µ) (100 µ) y 0, , . 1. y y 0. y 1 y . y fi y y, -γ- -10- (y), (fl y - y). - , / ( ).

y - y .

2.4. CTL assay

y (10) 1 0 10% , 00 / - (- y .,) 10 µ / - (., ., ,) % , fi y . y -1 . y y - y y y (.,) . fly, y 10 - (/) 0 1, 0 1, 10 1 1 % , . (0 µ /) - . (0 µ) , 0 . - y 0 µ (1), 0 (- ,). y y ( ) y . y 1% -100 y . fi y ( ) (— — -) / (— -) 100. y yz .

2.5. Elispot assay of IFN-γ- and IL-10-secreting cells

-γ -10 y (, .,) -γ -10 y . y (10 /) -γ ( ) -10 ( ) % , - (-γ), (-10) - . - 0 (0.0 %) - y . , - (100 µ /) . - 0 (-0) . y z (100 µ) . 10 . - y (y .,).

2.6. Flow cytometry for Treg cells

- fi y . -1 (0.1) z y 1 - z z .

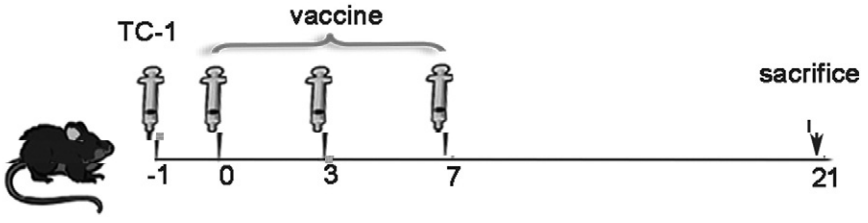

Fig. 1. -1 - . . . 10 -1 y — 1, . . (+) (—) 1 0 µ - 00 µ (0, 100, 00 00 µ) y 0, .

.
1 0 y
100% - y 00 g 0 .
- fi
100% - y . y y
(,) fl y .
y (1 10)
- - (μ)
- (μ) 0 .
( ) .
(,) z fi -
z . 100 μ
1 / (,) - - -
(,) y -
( ). κ y (,
) fi 0
. 1
/ 0 μ . yz
fl y .

2.7. IgG and isotypes

- - fi fi .
y- - 1 μ / - 100
, . , .
0.01 0.0 % -0 (/) ( )
% 1 .
, 100 μ . 1/100
yz . y
1/ 0. 1 .
, 100 μ - (1/000)
(z y .,)
1 . , 100 μ -
(, ′, , - y z 100 μ /
0.1 - , .0) (,)
. y -
0 μ , .
0 (-
,). - (
z y .1) .
- . yz y ,
100 μ - - 1, , ,
(1/1000) (z y, .,) -
.

2.8. mRNA expression of IL-10, VEGF, STAT3 and IFN-γ in tumors

-1
ν / (.,
.,) - - (
.,).

Table 1
- .

-10
-γ
-
β-

-10, -γ, -
00 (y ,)
(.,).
1. fi
0 μ 10 μ , μ
(0 /μ), 0. μ (10 μ), 0. μ
(10 μ), . μ - . -
- 10 , 1
, 0 0 0 y ,
y
1 , 0 1 , 1 0 1 . fi -
y $^{-\Delta\Delta}$, y
00 (y y,).
- -
(z).

2.9. Statistical analysis

- y yz , -
. *t*- -
yz z 1 y - -1 -
, fi y . yz
- y - -
. . .
fi $P \le 0.0$.

3. Results

3.1. Docetaxel and HPV-LFP synergistically suppress tumor growth

( ) -1 ,
- -
y y -
.
(.), yz .
. - /
fi y -
($P < 0.0$). -
y .% .%, y
($P < 0.0$). y . % 1 0 μ -
00 μ , fi y
- ($P < 0.0$).

3.2. Docetaxel and HPV-LFP synergistically increase the survival of mice inoculated with TC-1 cells

( ) -
y -
y -1- .
-1 y 0 y . .
-
0 y . 1 % -
0 y . 00 μ
, 0% ($P < 0.0$).

3.3. Docetaxel and HPV-LFP synergistically activate CTL cells

( ) -
y y
. y z -
y fi y y y -
- y y y. .
y-
y -1 . - y y,
fi y y y
.

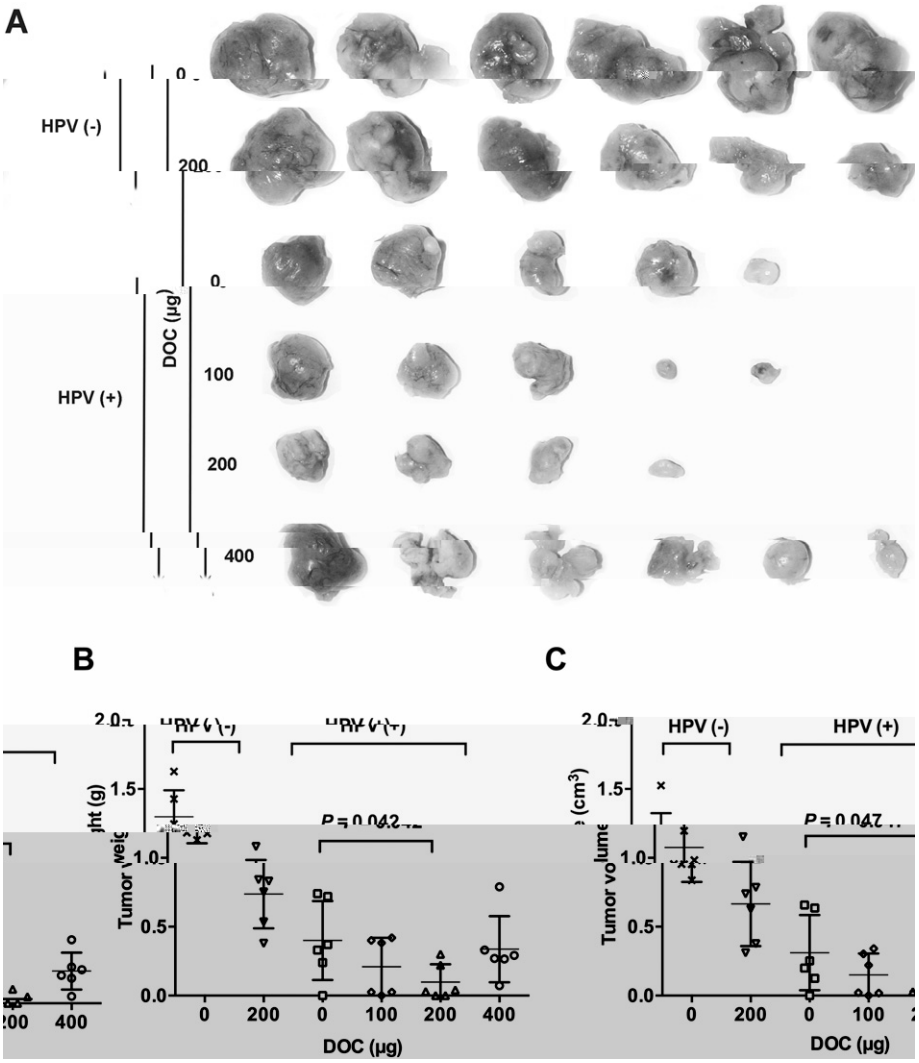

Fig. 2. y - . (/) . . 10 -1 y . . ≠00 μ (≠00 μ) ((−)), 1≠0 μ - ≠00 μ (0, 100, ≠00, 00 μ) ((+)) y 0, . , z y ≠1. , . . ( )′ , y . . ( ). *P* ≤ 0.0 fi y .

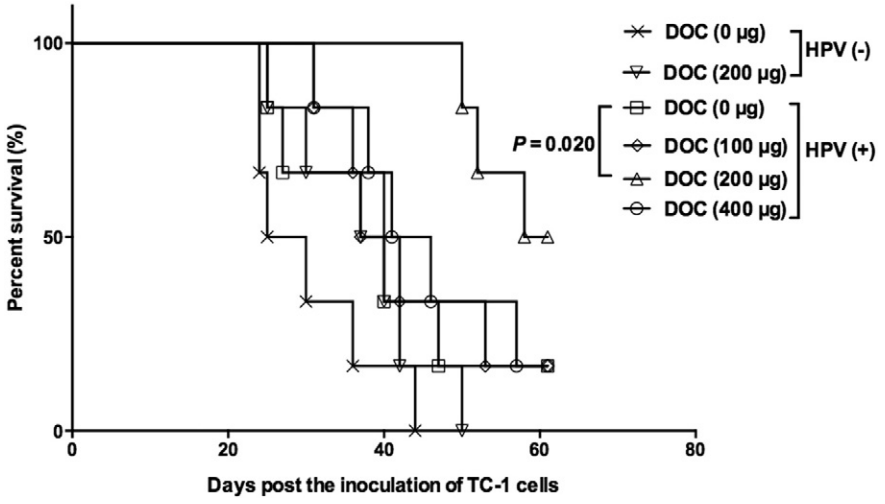

Fig. 3. - . (/) .1. y y. *P* ≤ 0.0 fi y .

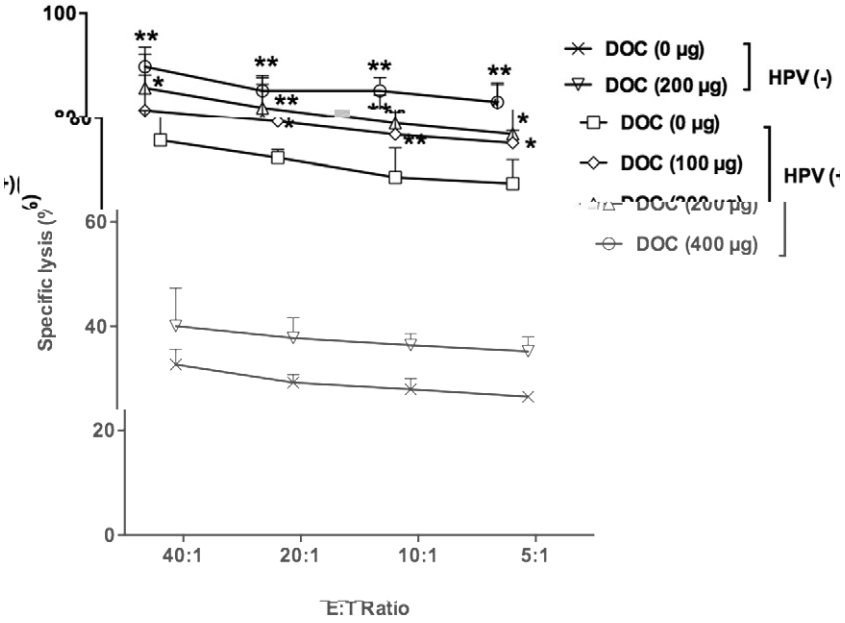

Fig. 4. y -1 . (/) . 1. y z y 1. y y (10) 1 _ (10 μ /) 00 / - y , (-1) (/) 0 1, 0 1, 10 1 1, y. fi y y y . y yz . . * ** z - $P \le 0.0$ $P \le 0.01$, y.

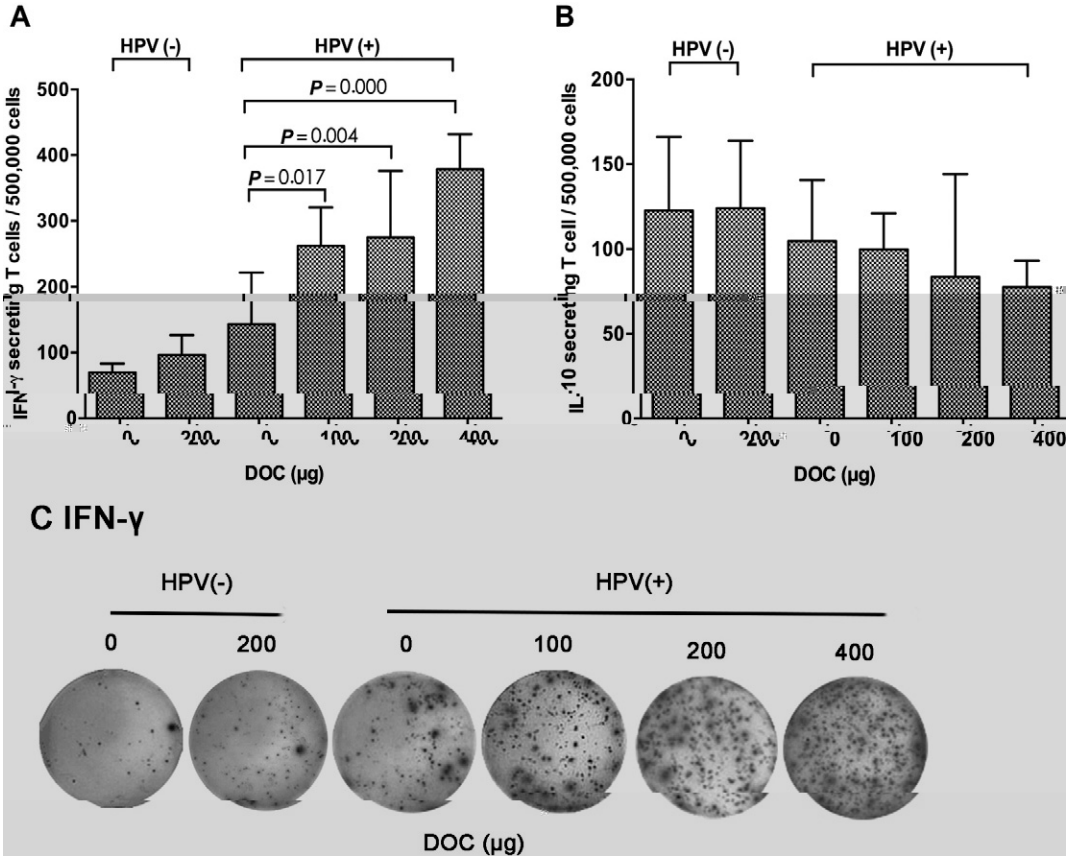

Fig. 5. -γ -10 . (/) . 1. y z y 1. (10 /) 1 _ (-γ) (-10) , (-γ) (-10) % , -γ ( ) -10 ( ) y . . (/ 00,000). . *P* ≤ 0.0 fi y .

3.4. Docetaxel and HPV-LFP synergistically increase IFN-γ and decrease IL-10 secreting cells

( )
y -γ-
-10- . y z
-γ- -10-
.
-γ- fi y
(.), -10- y
(.) z
.

3.5. Docetaxel enhances HPV-LFP-elicited antibody responses

( )
y . -
- fi y . .
fi y (.) y
(.) - , -
y -
00 μ /
00 μ , fi y y
.

3.6. Docetaxel decreases Treg cells in $CD4^+$ splenocytes

( ) -
y
+ y . .
y z -
. . -1
fi y + . - -
-1- .
- .
-
, fi 00 μ
(P 0.00) 00 μ (P 0.00) .

3.7. Docetaxel decreases Treg cells in tumors

-
, -1
yz y . .
fi y
- .

3.8. Docetaxel and HPV-LFP synergistically up-regulate IFN-γ and down-regulate IL-10, VEGF and STAT-3 mRNA expression in tumors

y
-γ, -10, - ,
-1
-γ, -10, - fi y - . .
- fi y
- -γ - -10, -
y -
.

4. Discussion

y fi y
1
(-) -1 - . -
-1 - -
fi y
- . -
fi y , -
γ- , - fi y
-10- .
(1) y
1 . y -
y . 1 . .
-
, y .
( )
, - y
1 .
,
11 .

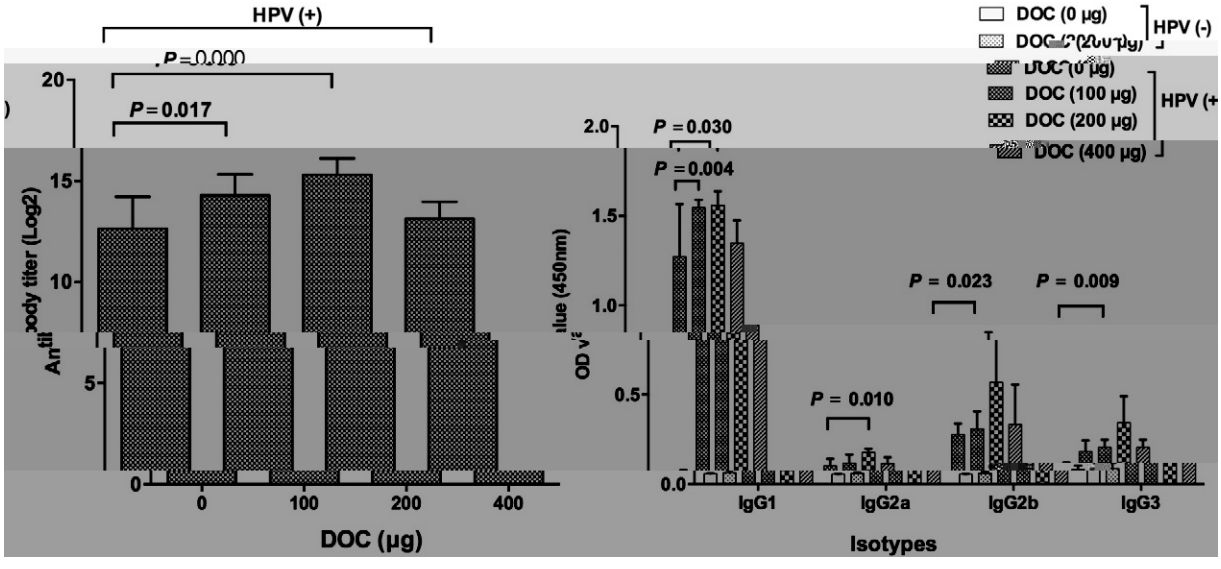

Fig. 6. y . (/) . 1. y 1 ( ) y ( ). . . P ≤ 0.0 fi y .

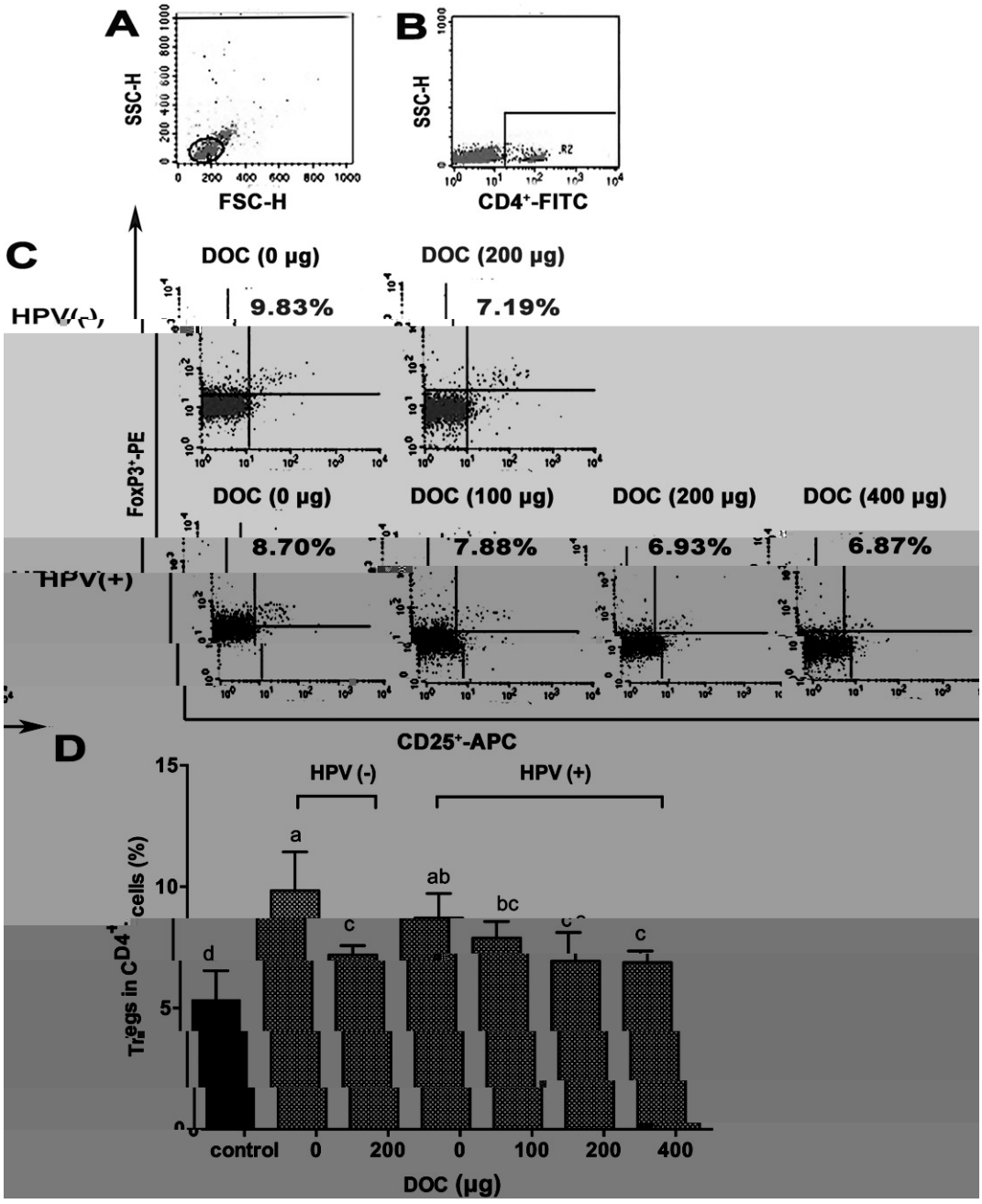

Fig. 7. y yfl y y. (/) .1. , . y z y 1 - - , - - , - - (+ +). , y y fi y y y z (-)/ y (-), y y . , + y − . , ( )- ( )- + fi . . , + y (%) . . . *P* y *t*- z - .

1 , fi y y . . y 1 - y - - - -1 - - , - fi - fi y y (. %) y (. %, . %, – . , - - y) (.). - fi y y - fi - -1 (.). z , / - fi -γ - - , . - . y - (y - - 1 1) . . 00 μ . , fi y y 00 μ ,

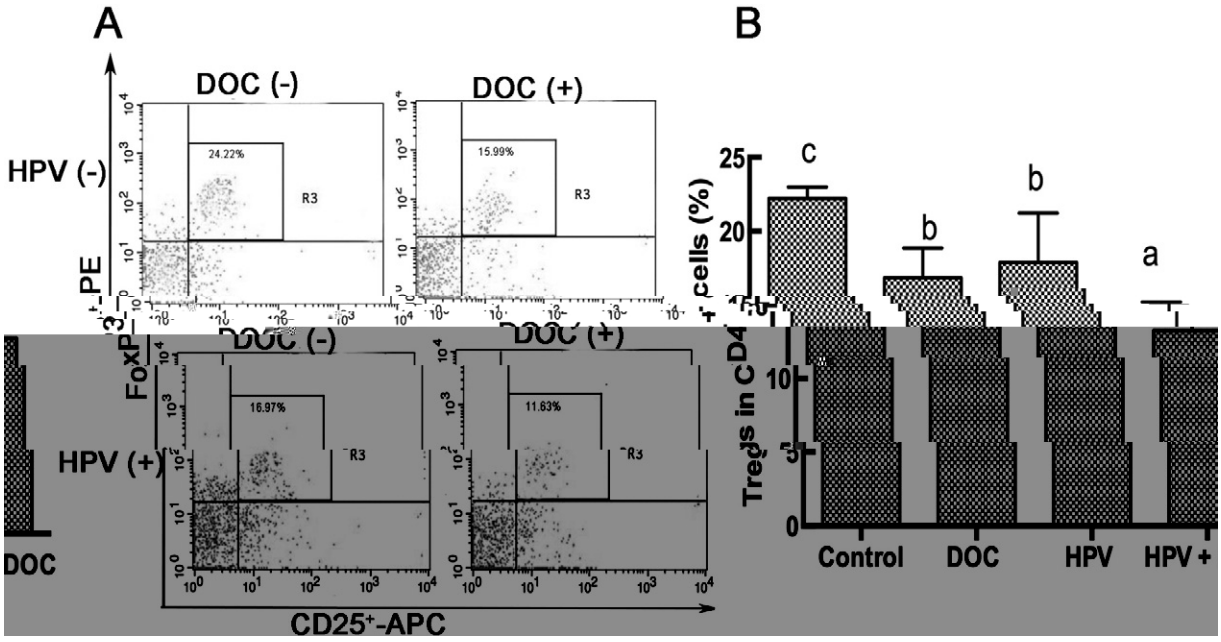
A
DOC (-)
DOC (+)
HPV (-)
HPV (+)
DOC
24.22%
15.99%
16.97%
11.63%
R3
PE
FoxP
CD25+-APC
B
Tregs in CD4+ cells (%)
c
b
b
a
Control
DOC
HPV
HPV +

Fig. 8.

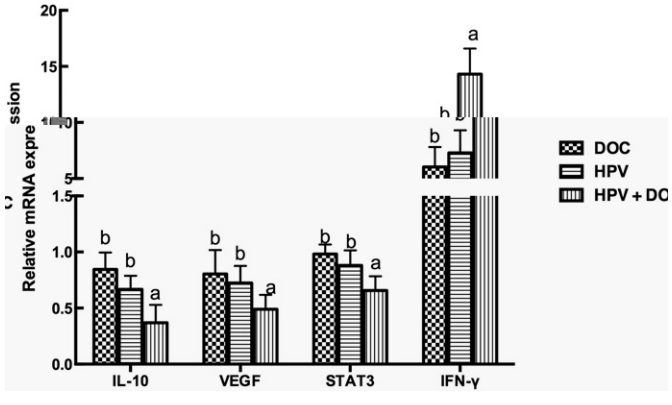
Relative mRNA expression
IL-10
VEGF
STAT3
IFN-γ
DOC
HPV
HPV + DC

Fig. 9.

Authors' contributions

Conflict of interest

Acknowledgements

References

1 *Listeria-based*