

shRNA沉默LSD1基因对Jurkat细胞增殖的影响及机制研究

韩世炜 黄轶群 郑瑞玘

【摘要】 目的 探讨RNA靶向沉默LSD1基因后对急性T淋巴细胞白血病细胞株Jurkat细胞增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制。方法 将LSD1短发夹RNA(shRNA)真核表达载体经脂质体转染入Jurkat细胞,采用RQ-PCR及Western blot方法观察LSD1 mRNA及蛋白表达;采用MTT法观察细胞增殖情况,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Western blot方法检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、procaspase-3的表达及组蛋白H3K4me、H3K4me2、H3K4me3、Act-H3水平。结果 LSD1 shRNA转染Jurkat细胞后,LSD1 mRNA、蛋白表达均下调($P<0.05$);LSD1 shRNA组48 h细胞增殖率低于转染阴性质粒(Neg-shRNA)组和对照组($P<0.05$),LSD1 shRNA组细胞凋亡率 $[(41.34\pm 3.58)\%]$ 高于Neg-shRNA组 $[(3.45\pm 1.54)\%]$ 和对照组 $[(1.76\pm 0.52)\%]$ ($P<0.05$);凋亡抑制蛋白Bcl-2、凋亡效应蛋白procaspase-3的表达下调,Bax表达上调,H3K4me、H3K4me2、Act-H3表达上调,而H3K4me3水平未见明显变化。结论 沉默LSD1基因可抑制Jurkat细胞增殖,激活凋亡相关蛋白诱导细胞凋亡,机制可能与调节组蛋白H3K4甲基化水平有关。

【关键词】 赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1; RNA干扰; Jurkat细胞; 组蛋白类

基金项目:福建省卫生系统中青年骨干人才培养项目(2014-ZQN-JC-36)

Antiproliferative effect of silencing LSD1 gene on Jurkat cell line and its mechanism Han Shiwei, Huang Yiqun, Zheng Ruiji. *Department of Hematology, Zhangzhou Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Zhangzhou 363000, China*

Corresponding author: Zheng Ruiji, Email: zhengruiji@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of silencing LSD1 gene by RNA interference on the proliferation, apoptosis on human lymphocytic leukemia Jurkat cell line and its mechanism. **Methods** The hairpin-like oligonucleotide sequences targeting LSD1 gene was transfected into Jurkat cells by lipofectamine™ 2000. The LSD1 mRNA and protein were detected by RQ-PCR and Western blot. Cell growth was determined by MTT. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of Bcl-2, Bax, procaspase-3, and histone H3K4me, H3K4me2, H3K4me3, Act-H3, H3K9me were detected by Western blot. **Results** LSD1 mRNA was markedly suppressed by the shRNA targeting LSD1. LSD1 shRNA suppressed the proliferation and induced cells apoptosis of Jurkat cells. The cell apoptotic rate was $(41.34\pm 3.58)\%$, $(3.45\pm 1.54)\%$, $(1.76\pm 0.52)\%$ in LSD1 shRNA, Neg-shRNA and Blank respectively, the difference among them was statistically significant ($P<0.05$). LSD1 shRNA down-regulated the expressions of Bcl-2 and procaspase-3, and up-regulated the expression of Bax. The methylation of H3K4me1, me2 and acetylation of Act-H3 improved without change of the methylation of H3K4me3. **Conclusions** Deplete of LSD1 gene maybe through modifying the methylation of histone H3K4 to promote the cell apoptosis and inhibit cell growth in Jurkat cell line.

【Key words】 Lysine specific demethylase 1; RNA interference; Jurkat cells; Histones

Fund program: Fujian Provincial Health System of Young Backbone Talents Training Project(2014-ZQN-JC-36)

组蛋白甲基化是一种重要的表观遗传学修饰

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.01.011

作者单位:363000 福建医科大学附属漳州市医院血液内科
[韩世炜(浙江省奉化市人民医院血液肿瘤科,315500)、黄轶群、郑瑞玘]

通信作者:郑瑞玘,Email:zhengruiji@sina.com

方式,参与调控染色体的结构和基因的表达,由组蛋白甲基转移酶和去甲基化酶共同调节。组蛋白的甲基化失衡和肿瘤存在着密切关系,一些去甲基化酶与肿瘤发生密切相关^[1]。赖氨酸特异性组蛋白去甲基化酶1(lysine specific demethylase 1, LSD1)是2004年发现的第一个组蛋白去甲基化酶^[2],是一

个FAD依赖性胺氧化酶,能够特异性去除H3K4和H3K9的单甲基化和二甲基化修饰,但对三甲基化无能为力^[3]。近年来研究表明,LSD1基因活化过程的异常调节与多种恶性肿瘤的发生、发展高度相关^[4]。我们在本研究中探讨短发夹RNA(shRNA)靶向沉默LSD1基因对Jurkat细胞的增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制。

材料与方 法

1. 材料:急性T淋巴细胞白血病Jurkat细胞株购自中国科学院上海细胞库,RPMI 1640培养基购自美国Gibico公司,胎牛血清购自浙江天行生物科技股份有限公司,LSD1 shRNA质粒及转染相关试剂与培养基、Bcl-2、Bax、procaspase-3、LSD1、 β -actin鼠抗人一抗、羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗及Western blot化学发光工作液均购自美国Santa Cruz公司,PCR引物、RNA提取试剂盒均购自美国Invitrogen公司、荧光染料(SYBR Green)RQ-PCR试剂盒购自美国Promega公司、Annexin V/PI双染凋亡试剂盒购自美国BD公司,H3K4me、H3K4me2、H3K4me3、Act-H3兔抗人一抗购自美国Upstate公司。

2. 细胞培养:Jurkat细胞株用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液置37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中,隔天换液传代培养,实验时取对数生长期细胞。

3. 转染:设定对照组(只加脂质体)、Neg-shRNA组(转染阴性质粒)、LSD1 shRNA组(转染LSD1的shRNA质粒)。取对数生长期的Jurkat细胞,接种在6孔培养板上,每孔2×10⁶个细胞,分别配置溶液A:每孔shRNA 10 μ l+shRNA质粒转染培养基90 μ l;溶液B:每孔shRNA质粒转染试剂5 μ l+shRNA质粒转染培养基95 μ l,混合溶液A和溶液B,室温放置30 min形成转染复合物,在含有细胞的无抗生素培养基中加入转染复合物使终体积为2 ml。置于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养48 h,收集细胞,用于LSD1 mRNA及蛋白表达水平检测。

4. RQ-PCR检测LSD1基因mRNA表达:根据Gene Bank中的LSD1基因序列,利用Primer Premier 5.0设计引物:LSD1基因上游引物5'-GGCAGCAGCTCGACAGTTACAA-3',下游引物5'-TACCACCATGGCTCCAAGATCA-3'。GAPDH上游引物5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游

引物5'-TGTTGAAGACGCCAGTGGA-3'。

根据TRIzol说明书提取总RNA,用分光光度法检测RNA的浓度和纯度,逆转录为cDNA。PCR条件:94℃预变性5 min;94℃变性45 s;58℃退火30 s;72℃延伸30 s;扩增40个循环;实验同时设空白对照。以PCR反应前3~15个循环的荧光信号作为荧光本底信号。调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为Ct值。以2^{- $\Delta\Delta$ Ct}表示LSD1 mRNA相对表达量。每组设3个复孔,实验重复3次,结果取平均数。

5. LSD1 shRNA对Jurkat细胞增殖的影响:取对数生长期细胞接种于6孔板(每孔2×10⁴个细胞),终体积为200 μ l。实验分为对照组、Neg-shRNA组、LSD1 shRNA组,同时设立空白组(只加培养液)。转染后置37℃、5%CO₂、饱和湿度下继续培养。48 h后收获细胞,实验结束前4 h取出,每孔加MTT(5 mg/ml)20 μ l,继续培养4 h,1 000×g离心10 min,弃上清,每孔加DMSO 150 μ l,避光振荡10 min,充分溶解结晶物,在酶标仪上测定492 nm和630 nm处吸光度(A)值,记录实验结果,按以下公式计算细胞增殖率。每组设3个复孔,实验重复3次。

$$\text{细胞增殖率(\%)} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

6. LSD1 shRNA对Jurkat细胞凋亡的影响:按照美国BD公司Annexin V/PI双染试剂盒说明书处理各组细胞后,上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复3次。

7. Western blot方法检测LSD1 shRNA对Jurkat细胞凋亡相关蛋白及组蛋白甲基化的影响:离心收集细胞,预冷PBS洗涤2次,吸干洗涤液。按1×10⁶细胞加入100 μ l裂解液+1 μ l酶抑制剂的比例冰上裂解细胞30 min,4℃10 000×g离心10 min,吸取中间清亮层。BCA法进行蛋白定量。以120 g/L的SDS-PAGE电泳分离,电转移法转膜,室温下摇床封闭1 h,加入用TBS稀释的一抗,4℃过夜,TBS洗涤液洗膜后分别加入用TBS按1:5 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下摇床作用1 h,TBS洗涤液洗膜后化学发光法显色,X射线底片曝光、扫描后,应用ALphaDigiDoc图像分析软件进行分析,各组目的蛋白的相对表达量以其与 β -actin(内参照)灰度值的比值表示。实验重复3次。

8. 统计学处理:采用SPSS17.0软件分析实验数据。常规进行方差齐性检验、正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组表达水平以单因素方

差分析进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

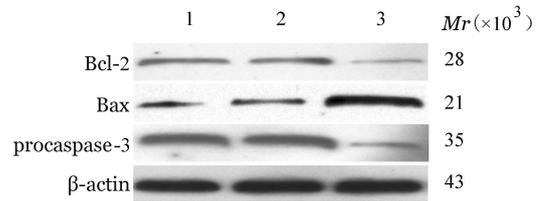
1. LSD1 shRNA 对 Jurkat 细胞 LSD1 mRNA 和 LSD1 蛋白表达的影响: LSD1 shRNA 处理 Jurkat 细胞 48 h 后, RQ-PCR 法检测对照组、Neg-shRNA 组、LSD1 shRNA 组 LSD1 mRNA 相对表达量分别为 1.01 ± 0.02 、 0.97 ± 0.03 、 0.17 ± 0.02 ($P < 0.05$); Western blot 方法检测 LSD1 蛋白表达量分别为 0.642 ± 0.114 、 0.624 ± 0.104 、 0.138 ± 0.023 , LSD1 shRNA 组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2. LSD1 shRNA 对 Jurkat 细胞增殖的影响: 培养 48 h 后对照组、Neg-shRNA 组、LSD1 shRNA 组的细胞增殖率分别为 $(98.24 \pm 1.37)\%$ 、 $(94.61 \pm 2.28)\%$ 、 $(52.13 \pm 3.56)\%$, 对照组与 Neg-shRNA 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 LSD1 shRNA 组与对照组、Neg-shRNA 组比较差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.05), 提示 LSD1 shRNA 可抑制 Jurkat 细胞增殖。

3. LSD1 shRNA 对 Jurkat 细胞凋亡的影响: 如图 1 所示, 转染 48 h 后, 对照组、Neg-shRNA 组、LSD1 shRNA 组早期凋亡率分别为 $(1.76 \pm 0.52)\%$ 、 $(3.45 \pm 1.54)\%$ 、 $(41.34 \pm 3.58)\%$ ($P < 0.01$)。

4. LSD1 shRNA 对 Jurkat 细胞凋亡蛋白 Bax、抑制凋亡蛋白 Bcl-2、凋亡效益因子 procaspase-3 表达的影响: Western blot 检测发现 LSD1 shRNA 处理

Jurkat 细胞 48 h 后 Bax 表达上调、Bcl-2 表达下调、procaspase-3 出现降解(图 2)。AlphaDigiDoc 图像分析软件分析结果显示, LSD1 shRNA 组 Bcl-2、procaspase-3 的表达较对照组均下调 ($P < 0.05$), Bax 较对照组上调 ($P < 0.05$) Neg-shRNA 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1)。



1: 对照组; 2: Neg-shRNA 组; 3: LSD1 shRNA 组

图 2 LSD1 shRNA 处理 Jurkat 细胞 48 h 后凋亡相关蛋白表达变化

5. LSD1 shRNA 对组蛋白 H3K4 甲基化水平的影响: 干扰 LSD1 基因表达后, LSD1 蛋白表达下降, LSD1 能催化 H3K 4me1、H3K4me2 的赖氨酸去甲基化能力下降, Western blot 检测组蛋白 H3K4me1、H3K4me2 水平上调 ($P < 0.05$); 而 LSD1 无去除三甲甲基化的能力, 故组蛋白 H3K4me3 水平不变 ($P > 0.05$); 进一步研究发现组蛋白 Act-H3 水平表达上调 ($P < 0.05$) (图 3、表 2)。

讨 论

不同位点组蛋白甲基化有不同的转录活性, H3K4、H3K36 和 H3K79 的甲基化通常与基因转录的激活相关, 而 H3K9、H3K27 和 H4K20 的甲基化通

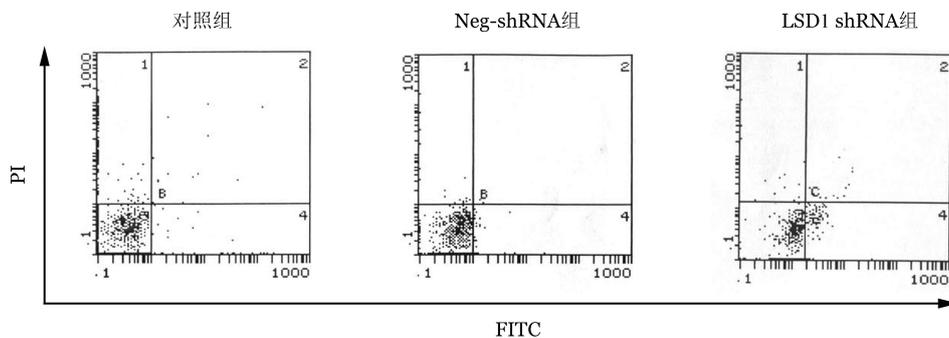
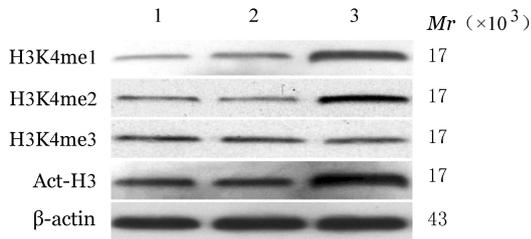


图 1 LSD1 shRNA 对 Jurkat 细胞凋亡的影响

表 1 LSD1 shRNA 处理 Jurkat 细胞 48 h 后凋亡蛋白相对表达量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	procaspase-3
对照组	0.415 ± 0.107	0.348 ± 0.072	1.143 ± 0.125
Neg-shRNA	0.404 ± 0.101	0.359 ± 0.081	1.158 ± 0.117
LSD1 shRNA	0.092 ± 0.017^a	1.193 ± 0.132^a	0.157 ± 0.046^a

注: 对照组: 只加脂质体; Neg shRNA 组: 转染阴性质粒; LSD1 shRNA 组: 转染 LSD1 的 shRNA 质粒; 与对照组比较, $^a P < 0.05$ 。实验重复 3 次



1:对照组;2:Neg-shRNA组;3:LSD1 shRNA组

图3 LSD1 shRNA处理Jurkat细胞48h后组蛋白甲基化及乙酰化表达变化

常和基因转录的抑制相关^[5-6]。前期认为组蛋白甲基化是不可逆的,直到LSD1的发现,才认识到组蛋白的甲基化修饰是一个动态可调节的过程,组蛋白甲基转移酶和去甲基化酶的相互作用是动态的,可调节组蛋白的甲基化状态,从而调节组蛋白和其他功能蛋白的相互作用,进而调控基因转录的激活和抑制等生物学过程。

LSD1含有一个N端SWIRM结构域、一个Tower结构域和一个C端胺氧化酶结构域(AOL)。SWIRM结构域主要负责LSD1与染色质结合,氨基氧化区又被Tower结构域分为黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)结合结构域与底物结合结构域,是LSD1活性区域。Tower结构域与CoREST的2个SANT结构域中间一个很长的连接 α 螺旋相互作用,使LSD1和CoREST形成紧密的复合物,进而使核小体去甲基化,Tower结构域的缺失突变会导致LSD1丧失活性^[7]。LSD1能催化单甲基(me1)或二甲基(me2)的赖氨酸去甲基,可特异性地催化组蛋白H3K4位点去甲基化,在与雄激素受体结合后,LSD1能使甲基化的H3K9去甲基化^[8],LSD1在FAD介导去甲基化过程中需要非质子化甲基赖氨酸N端的孤对电子,因此LSD1不可去除三甲基化赖氨酸甲基^[9],而本次实验也显示,RNA靶向沉默LSD1基因,LSD1的mRNA及蛋白的表达水平下降,同时组蛋白H3K4单甲基、二甲基水平上调,三甲基化水平未见明显改变,从侧面验证了LSD1对三甲基化水平无影响。

LSD1基因在多种肿瘤组织中高表达并对其生

长、转移和侵袭起着重要作用,而用RNA干扰技术降低LSD1基因的表达或用小分子LSD1抑制剂调控LSD1基因的活性能够抑制肿瘤细胞的生长和转移。目前LSD1基因与肿瘤之间的潜在联系被认为与多种肿瘤中H3K4的甲基化水平下降和H3K9水平上升的现象相关^[10]。LSD1在前列腺癌组织中高表达,作为AR依赖基因活化的转录辅助因子,LSD1能促进雄激素依赖的基因表达,从而协助维持肿瘤细胞的永生性,LSD1的高表达与前列腺癌的预后不良及术后高复发率相关,可以作为预测前列腺癌预后的新指标^[11],LSD1在肺癌组织中表达量显著高于正常的肺组织,且表达量和非小细胞肺癌患者的总生存期呈负相关,小分子干扰RNA及小分子LSD1抑制剂降低LSD1表达量或抑制LSD1的活性能抑制细胞增殖,抑制细胞的转移和侵袭^[12]。LSD1在白血病细胞中同样过表达,干细胞白血病基因TAL1是癌基因,其活性与T细胞急性淋巴细胞白血病的发生密切相关,也能干扰细胞周期,LSD1与TAL1相结合抑制了TAL1介导的转录活性,并导致白血病的发生^[13]。LSD1小分子抑制剂其可以显著抑制白血病细胞分化,并具有增强抗白血病药物疗效的作用^[14]。本研究显示,shRNA靶向沉默LSD1基因,LSD1基因的mRNA及蛋白的表达水平下降,Jurkat细胞的增殖率下降,细胞凋亡上升,发现其诱导凋亡是通过下调Bcl-2、procaspase-3的表达,上调Bax表达发挥作用。同时发现干扰LSD1基因后组蛋白H3乙酰化水平也升高,因为LSD1是核小体重塑及组蛋白去乙酰化复合体中的重要组成部分,该复合体兼具ATP酶、去乙酰化酶和去甲基化酶活性,组蛋白去乙酰化和去甲基化这两种重要的组蛋白修饰是相互依存、相互协调作用的。LSD1的活性受去乙酰化酶的调节,反之,LSD1活性也可以影响组蛋白乙酰化状态^[15]。

本研究结果表明,干扰LSD1基因后通过调控组蛋白H3K4一、二甲基化及H3乙酰化,下调Bcl-2、procaspase-3表达,上调Bax表达,从而诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖,提示LSD1基因可能成为急性T淋巴细胞白血病治疗的新靶点。

表2 LSD1 shRNA处理Jurkat细胞48h后组蛋白甲基化及乙酰化相对水平($\bar{x} \pm s$)

组别	H3K4me1	H3K4me2	H3K4me3	Act-H3
对照组	0.162±0.042	0.177±0.054	0.402±0.061	0.572±0.840
Neg-shRNA	0.173±0.044	0.172±0.047	0.407±0.063	0.581±0.870
LSD1 shRNA	1.162±0.146 ^a	1.132±0.112 ^a	0.413±0.072	1.178±0.129 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。实验重复3次

参考文献

[1] Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28 (10):1057- 1068. doi: 10.1038/nbt.1685.

[2] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1[J]. Cell, 2004, 119 (7):941-953. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012.

[3] Lan F, Nottke AC, Shi Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20 (3):316-325. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.004.

[4] Hayami S, Kelly JD, Cho HS, et al. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers[J]. Int J Cancer, 2011,128(3):574-586. doi: 10.1002/ijc.25349.

[5] Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(11):838-849. doi:10.1038/nrm1761.

[6] Kong X, Ouyang S, Liang Z, et al. Catalytic mechanism investigation of lysine-specific demethylase 1 (LSD1): a computational study[J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25444. doi: 10.1371/journal.pone.0025444.

[7] Foster CT, Dovey OM, Lezina L, et al. Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(20):4851-4863. doi: 10.1128/MCB.00521-10.

[8] Metzger E, Wissmann M, Yin N, et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen- receptor-dependent transcription[J]. Nature, 2005, 437(7057):436-439. doi:10.1038/nature04020.

[9] Hou H, Yu H. Structural insights into histone lysine demethylation [J]. Curr Opin Struct Biol, 2010, 20 (6):739- 748. doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.006.

[10] Zhu Q, Huang Y, Marton LJ, et al. Polyamine analogs modulate gene expression by inhibiting lysine- specific demethylase 1 (LSD1) and altering chromatin structure in human breast cancer cells [J]. Amino Acids, 2012, 42 (2-3):887-898. doi: 10.1007/s00726-011-1004-1.

[11] Gao L, Alumkal J. Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer [J]. Epigenetics, 2010, 5 (2):100-104.

[12] Lyu T, Yuan D, Miao X, et al. Over- expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer [J]. PLoS One, 2012, 7 (4):e35065. doi: 10.1371/journal.pone.0035065.

[13] Hu X, Li X, Valverde K, et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106 (25):10141- 10146. doi: 10.1073/pnas.0900437106.

[14] Binda C, Valente S, Romanenghi M, et al. Biochemical, structural, and biological evaluation of tranylcypropine derivatives as inhibitors of histone demethylases LSD1 and LSD2 [J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(19):6827-6833. doi: 10.1021/ja101557k.

[15] Wang Y, Zhang H, Chen Y, et al. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer [J]. Cell, 2009, 138 (4):660- 672. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.050.

(收稿日期:2015-06-24)

(本文编辑:徐茂强)

《中华血液学杂志》2015年度审稿专家名单

以下为年度本刊审稿专家,在此表示衷心感谢!(以姓氏汉语拼音为序)

- 艾辉胜 秘营昌 白海 蔡真 常春康 常英军 陈宝安 陈芳源 陈国安 陈虎 陈洁平
 陈苏宁 陈文明 陈协群 陈子兴 程韵枫 达万明 杜欣 方美云 冯四洲 付蓉 高春记
 高子芬 顾健 郭农建 韩冰 韩明哲 韩颖 侯健 侯明 胡灯明 胡建达 胡豫
 黄河 黄晓军 纪春岩 贾永前 江明 江倩 姜尔烈 金洁 鞠秀丽 克晓燕 赖永榕
 李建勇 李剑 李津婴 李娟 李军民 李薇 李晓 李艳 李扬秋 梁爱斌 刘兵
 刘兵城 刘代红 刘红 刘开彦 刘澎 刘启发 刘霆 刘艳荣 刘卓刚 罗建民 马道新
 马军 马志贵 庞天翔 裴雪涛 彭军 钱文斌 邱林 邱录贵 任汉云 汝昆 邵宗鸿
 施菊妹 施均 石远凯 宋永平 宋玉琴 孙春艳 孙慧 孙恺 孙自敏 佟红艳 童春容
 王椿 王宏伟 王季石 王建祥 王健民 王景文 王敏 王小钦 王晓敏 王欣 王迎
 王昱 王昭 魏辉 魏旭东 文飞球 文珠 吴德沛 吴竞生 吴彤 肖志坚 熊冬生
 徐开林 徐荣臻 徐卫 许兰平 许小平 阎石 杨建民 杨林花 杨仁池 于力 余自强
 袁卫平 张凤奎 张广森 张磊 张连生 张梅 张曦 张晓辉 张毅 张翼鹭 赵洪国
 赵钧铭 赵维莅 赵永强 郑国光 郑以州 周道斌 周剑峰 朱焕玲 朱军 朱力 朱平
 朱易萍 庄俊玲 邹萍 邹善华