

CD19 CAR-T细胞培养过程中PD-1蛋白、mRNA水平及细胞杀伤活性变化

蒲业迪 王嘉 邓琦 朱海波 江嫣雨 孟娟霞 李玉明

天津市第一中心医院血液科 300192

通信作者:邓琦,Email:kachydeng@126.com

【摘要】 目的 探讨CD19 CAR-T细胞培养过程中其PD-1蛋白、mRNA水平及细胞杀伤活性变化。方法 收集6例外周血PD-1高表达恶性淋巴瘤患者、6例健康志愿者的外周血T细胞,作为CAR-T培养的T细胞来源。流式细胞术检测PD-1蛋白表达、PCR法检测PD-1 mRNA水平,CCK-8法检测细胞增殖,LDH法检测细胞杀伤活性。结果 ①PD-1高表达患者T细胞来源CD19 CAR-T细胞,与志愿者T细胞来源者相比,转染率无差异($P > 0.05$);②PD-1高表达T细胞来源CAR-T细胞与PD-1抑制剂联合与否,以及健康志愿者CAR-T之间,细胞增殖差异无统计学意义($P > 0.05$);③PD-1高表达T细胞与CAR-T细胞对淋巴瘤细胞株杀伤活性,低于二者联合PD-1抑制剂及志愿者CAR-T细胞($P < 0.001$),而PD-1高表达T细胞来源CAR-T细胞联合PD-1抑制剂与健康志愿者CAR-T细胞间差异无统计学意义($P > 0.05$);④各组细胞培养过程中PD-1表达均下降,差异无统计学意义($P > 0.05$),但各组细胞培养过程中,PD-1 mRNA的变化差异无统计学意义($P > 0.05$);⑤PD-1高表达T细胞来源CAR-T收获后,与PD-1抑制剂共培养与否,其PD-1表达差异无统计学意义($P > 0.05$),但CAR-T与淋巴瘤细胞株接触后,其PD-1表达随培养时间延长而增高,加入PD-1抑制剂可拮抗该作用;各组间PD-1 mRNA的变化差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 PD-1高表达T细胞来源CAR-T细胞与肿瘤细胞接触后,其PD-1表达随培养时间延长而增高;而包括PD-1抑制剂在内,不能改变其PD-1 mRNA的表达。

【关键词】 PD-1; mRNA; 转染; T细胞; 嵌合抗原受体T细胞

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.09.010

PD-1 expression, mRNA level and cytotoxicity changes in CD19CAR-T cells

Pu Yedi, Wang Jia, Deng Qi, Zhu Haibo, Jiang Yanyu, Meng Juanxia, Li Yuming

Department of Hematology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Deng Qi, Email: kachydeng@126.com

【Abstract】 Objective To observe the changes of PD-1 expression, mRNA level and cytotoxic activity of CD19 CAR-T cells during the culture process of CAR-T cells. **Methods** The peripheral blood T cells of 6 lymphoma patients with high expression of PD-1 and 6 healthy volunteers were the source of CAR-T cells. The expression of PD-1 was analyzed by flow cytometry. The mRNA level of PD-1 was analyzed by PCR. The cell proliferation was analyzed by CCK-8 assay. The cytotoxicity was analyzed by LDH assay. **Results** ①The transfection efficiency of high PD-1 expression T cells and healthy volunteer T cells were as the same ($P > 0.05$). ②The cell proliferation capacity of CD19 CAR-T cells from high PD-1 expression T cells or healthy volunteer T cells, with or without PD-1 inhibitor were as the same ($P > 0.05$). ③The cytotoxicity to lymphoma cells of high PD-1 expression T cells and CAR-T cells were lower than that of these two T cells combined with PD-1 inhibitor and the CAR-T cells from healthy volunteer T cells ($P < 0.001$). There was no difference of the cytotoxicity between the CAR-T cells from high PD-1 expression T cells combined with PD-1 inhibitor and the CAR-T cells from healthy volunteer ($P > 0.05$). ④There was no difference of the expression of PD-1 in all CAR-T cell groups during the culture process ($P > 0.05$). There was no difference of mRNA level of PD-1 in all groups during the culture process ($P > 0.05$). ⑤The PD-1 expression of CAR-T cells increased by the time of culture after contacting with lymphoma cells ($P < 0.001$). The PD-1 inhibitors could antagonize this effect. There was no difference of mRNA level of PD-1 in all groups after contacting with lymphoma cells ($P > 0.05$). **Conclusion** The PD-1 expression of CAR-T cells from high PD-1 expression T cells increased by the time of culture after

contacting with lymphoma cells. However, the mRNA level of PD-1 of all groups did not change, even if PD-1 inhibitor was applied.

【Key words】 Expression of PD-1; mRNA level; Transfection efficiency; T cells; CAR-T Cells

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.09.010

嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)治疗通过整合CAR-T细胞特异性识别并结合肿瘤相关抗原靶点,传递信号至细胞内,引起T细胞增殖活化,从而靶向杀伤肿瘤细胞^[1]。研究表明程序性死亡因子1(PD-1)途径的存在削弱了CAR-T细胞治疗效果,通过PD-1抑制剂进行抗体阻断可提高CAR-T细胞的杀伤活性及持久性^[2]。本研究我们通过CD19 CAR-T细胞与PD-1抑制剂共培养,检测PD-1蛋白、mRNA水平及细胞增殖率变化,探讨CD19 CAR-T细胞联合PD-1抑制剂对淋巴瘤细胞株的杀伤活性的影响。

材料与方 法

1. 细胞及主要试剂:人肾上皮细胞系293T细胞、弥漫大B细胞淋巴瘤细胞株Raji细胞均购自美国模式培养物集存库(ATCC),大肠杆菌感受态细胞株DH5 α 购自宝生物工程(大连)有限公司。无内毒素质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。Lenti-Pac慢病毒颗粒包装试剂盒购自上海伯易生物科技有限公司。磁珠分选试剂盒购自德国美天旎生物技术有限公司。CARTEST-19检测试剂盒购自上海近岸科技有限公司。LDH细胞毒性检测试剂盒、ELISA检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。PD-1-PE抗体购自美国BD公司。CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所。第二代抗CD19质粒购自美国Creative Biolabs公司。PD-1抑制剂Nivolumab购自美国百时美施贵宝公司。

2. 质粒转化、扩增、提取:大肠杆菌感受态细胞株DH5 α 置于冰上解冻,加入第二代(共刺激分子为CD28)抗CD19 CAR质粒,冰中放置30 min,42℃放置30~60 s,再次置于冰中2~3 min。加入37℃预温的SOC培养基,振荡培养。取适量上述菌液,三区划菌,37℃过夜培养后挑取单个白色菌落,放入SOC培养基中,37℃振荡培养。取500 μ l培养后的菌液加入SOC培养基中,37℃振荡培养。采用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒后进行定量。

3. CD19 CAR-T细胞制备及检测:收集6例外周血PD-1高表达恶性淋巴瘤患者、6例健康志愿者

的外周血标本,作为本实验CAR-T培养的T细胞来源。研究经我院伦理委员会批准,标本的采集经所有研究对象知情同意并签署知情同意书。淋巴细胞分离液提取单个核细胞,磁珠分选试剂盒从提取的单个核细胞中富集CD3⁺T细胞。获得的细胞用含有IL-2、谷氨酰胺的T细胞专用培养基培养,培养第4天接种慢病毒,培养第12天收获CAR-T细胞。对照组T细胞不进行慢病毒接种,同样第12天收获细胞。按CARTEST-19检测试剂盒说明书进行操作,上流式细胞仪检测CD19 CAR-T细胞的转染效率。同时收获培养第0、4、8、12天各组细胞,流式细胞仪检测各组细胞PD-1蛋白水平,PCR检测各组细胞PD-1 mRNA水平(上游引物:5'-CCAGGATG-GTTCTTAGACTCCC-3',下游引物:5'-TTTAGCAC-GAAGCTCTCCGAT-3'),实验均重复3次。

4. PD-1抑制剂共培养:取培养第12天PD-1高表达患者来源T细胞、PD-1高表达患者CD19 CAR-T细胞、健康志愿者CD19 CAR-T细胞,加入终浓度72 mg/L的Nivolumab共培养72 h,分别设为PD-1高表达T细胞+PD-1抑制剂组、PD-1高表达CD19 CAR-T细胞+PD-1抑制剂组、健康对照CD19 CAR-T细胞+PD-1抑制剂组。

5. CD19 CAR-T细胞体外增殖能力的检测:取PD-1高表达患者及健康志愿者CD19 CAR-T细胞及其与PD-1抑制剂共培养组,于含10% FBS的RPMI 1640培养基,37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养。按CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒说明书进行操作,培养0、24、48 h时采用酶标仪检测450 nm处吸光度(A)值,计算其增殖能力。每组设3个复孔,实验重复3次。

6. 体外杀伤活性的检测:以Raji细胞为靶细胞(细胞计数为2 \times 10⁵),分别以各组T细胞为效应细胞进行实验,效靶比设为2:1。按LDH细胞毒性检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪检测490 nm处A值,计算其杀伤率。每组设3个复孔,实验重复3次。

$$\text{杀伤率}(\%) = \frac{A_{\text{效应细胞自发释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}}{A_{\text{效应细胞最大释放}} - A_{\text{靶细胞自发释放}}} \times 100\%$$

7. 统计学处理:采用SPSS 17.0软件进行统计

学分析,两组间比较采用独立样本的 *t* 检验,各时点的组间比较行单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,双侧 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. CD19 CAR-T细胞的转染效率:6例PD-1高表达患者的外周血T细胞的PD-1表达水平为(62.4±9.5)%,6名健康志愿者外周血T细胞的PD-1表达水平为(21.1±4.9)% (*t* = 9.464, *P* < 0.001); PD-1高表达患者的CD19 CAR-T细胞转染率为(61.2±11.4)%,健康志愿者CD19 CAR-T细胞转染率为(65.5±4.1)% (*t* = -0.869, *P* = 0.417)。

2. PD-1抑制剂对CD19 CAR-T细胞增殖能力的影响:PD-1高表达患者和健康志愿者来源CD19 CAR-T细胞与PD-1抑制剂共培养不同时间,细胞增殖率与未经PD-1抑制剂处理的CD19 CAR-T细胞相近(*P*值均 > 0.05)(图1)。

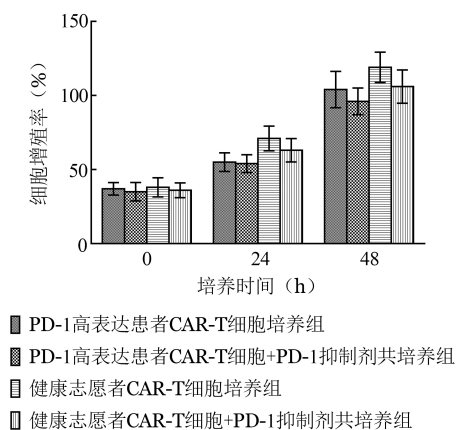


图1 PD-1抑制剂对CD19 CAR-T细胞增殖能力的影响

3. 对淋巴瘤细胞株的体外杀伤活性比较:效靶细胞共培养0、24、48 h,检测对靶细胞的杀伤活性。在48 h时,方差分析显示各组比较差异有统计学意义(*F* = 6.036; *P* = 0.007)。PD-1高表达CD19 CAR-T细胞+PD-1抑制剂组与健康志愿者CD19 CAR-T杀伤活性比较差异无统计学意义[(71.61±7.50)%对(79.73±9.01)% , *P* = 0.153]; PD-1高表达CD19 CAR-T细胞+PD-1抑制剂组杀伤活性高于PD-1高表达T细胞+PD-1抑制剂组[(26.33±4.11)% , *P* = 0.003]和PD-1高表达CD19 CAR-T组[(6.77±1.26)% , *P* < 0.001]; PD-1高表达T细胞联合PD-1抑制剂组杀伤活性,高于PD-1高表达T细胞和PD-1高表达CD19 CAR-T细胞(*P* < 0.001和 *P* <

0.001);而PD-1高表达T细胞和PD-1高表达CD19 CAR-T细胞的杀伤活性比较差异无统计学意义(*P* = 0.403)。

4. 细胞培养过程中PD-1表达的变化:志愿者T细胞组、PD-1高表达CD19 CAR-T组和健康志愿者CD19 CAR-T组PD-1表达水平分别为2.84±0.68、3.14±0.49、2.08±0.54,方差分析显示差异有统计学意义(*F* = 0.285, *P* = 0.599)。

5. 细胞培养过程中PD-1 mRNA变化:在培养过程中,患者高表达PD-1的T细胞、以及与PD-1抑制剂共培养后,PD-1的mRNA水平变化,差异无统计学意义(*P* > 0.05);患者高表达PD-1来源CAR-T细胞与PD-1抑制剂共培养后,mRNA水平变化,差异无统计学意义(*P* > 0.05);健康志愿者T细胞和CAR-T细胞,培养过程中mRNA水平变化,差异均无统计学意义(*P* > 0.05)(图2)。

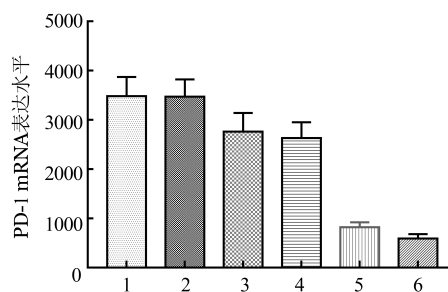


图2 培养12 h各组PD-1 mRNA表达水平比较

6. CD19 CAR-T细胞与淋巴瘤细胞接触后的PD-1表达变化:在96 h时,方差分析显示各组比较差异有统计学意义(*F* = 8.527, *P* = 0.001)。PD-1高表达T细胞来源CD19 CAR-T收获后,与PD-1抑制剂共培养与否,其PD-1表达无统计学意义(*P* = 0.681);但与Raji细胞共培养(效靶比为1:2)后,其PD-1表达随时间延长而上升,与CAR-T组比较差异具有统计学意义(*P* < 0.001),PD-1高表达CAR-T细胞与Raji细胞共培养同时加入PD-1抑制剂PD-1表达无上升情况,与CAR-T联合PD-1抑制剂组比较差异无统计学意义(*P* = 0.617)。

7. CD19 CAR-T细胞与淋巴瘤细胞接触后PD-1的mRNA变化:PD-1高表达CAR-T细胞收获后,比较PD-1高表达CAR-T细胞、与PD-1抑制剂共培

养、与Raji细胞共培养(效靶比为1:2)、与PD-1抑制剂和Raji细胞共培养,其PD-1的mRNA表达变化。在48 h时,各组mRNA表达依次为:3 010±350、2 690±310、2 810±360、2 860±320;方差分析显示各组比较差异无统计学意义($F=0.737, P=0.558$)。

讨 论

CAR-T细胞治疗是近年来快速发展起来的最具应用前景的肿瘤免疫治疗方法^[3-4],CD19 CAR-T在治疗B细胞血液系统恶性肿瘤中具有较好的疗效^[5-8]。PD-1是一种重要的免疫抑制分子,肿瘤患者T细胞高表达PD-1导致肿瘤微环境中PD-1通路持续激活,PD-1抑制剂可以阻断负向调控信号,使T细胞恢复活性^[9-10],目前靶向该检查点治疗已取得突破性进展^[11-12]。

Gargett等^[13]在转移性黑色素瘤I期临床试验中发现,T细胞活性受抑或耗竭导致CAR-T细胞治疗的失败,但与PD-1抑制剂联合,治疗的有效性及其持久性明显增强。PD-1抑制剂能够克服CAR-T细胞在肿瘤微环境的免疫逃逸,有效提高其疗效^[14-16]。Rupp等^[17]研究发现,PD-1高表达CAR-T细胞功能减弱,他们通过CRISPR/Cas9介导的基因编辑和慢病毒转染技术,构建了PD-1缺失的抗CD19 CAR-T细胞,其体外和体内对肿瘤细胞的杀伤能力增强。Cherkassky等^[15]体外实验证实了shRNA沉默PD-1表达的CAR-T细胞功能提高,低剂量CAR-T细胞即可维持治疗的长效性。该结论在肾癌鼠模型中也得到了证实^[18]。

在本实验中,我们收集外周血PD-1高表达的恶性淋巴瘤患者T细胞,作为CAR-T细胞培养的T细胞来源,与健康志愿者T细胞来源CD19 CAR-T细胞相比,T细胞的PD-1高表达并不影响转染率。我们通过检测各组对淋巴瘤细胞株的体外杀伤活性,发现PD-1高表达CD19 CAR-T联合PD-1抑制剂,与健康志愿者CD19 CAR-T杀伤活性比较无统计学差异;但高于PD-1高表达T细胞联合PD-1抑制剂和PD-1高表达CD19 CAR-T组。这表明了PD-1抑制剂对CD19 CAR-T细胞的增殖能力无影响,同时可以纠正因PD-1高表达导致的CD19 CAR-T细胞对淋巴瘤细胞株体外杀伤活性降低的作用。

在本实验中,各组T细胞和CAR-T细胞的PD-1表达,随培养时间的延长而下降。PD-1高表达和健康志愿者CAR-T细胞、以及健康志愿者T细胞的PD-1表达无统计学差异;而PD-1高表达T细胞的

PD-1表达,经过体外培养亦有下降,但下降程度低于上述三者。体外培养后各组细胞的PD-1表达,并不与各组细胞对靶细胞的杀伤活性相对应。虽然各组细胞PD-1表达均有不同程度下降,但PD-1 mRNA的表达并未发生变化。我们进而发现,PD-1高表达CAR-T细胞与Raji细胞共培养后,其PD-1表达随时间延长而上升,与未接触肿瘤细胞的CAR-T组比较差异有统计学意义,而PD-1高表达CAR-T与Raji细胞共培养同时加入PD-1抑制剂组PD-1表达无上升情况。

上述结果,可以在一定程度上解释PD-1高表达的CAR-T细胞体外培养后,虽然其PD-1表达下降,但杀伤活性并未改善这个现象。接触肿瘤细胞后,其PD-1表达再度上升,是否为淋巴瘤CAR-T治疗的疗效较急性淋巴细胞白血病差的原因之一,值得进一步探讨。另外,PD-1抑制剂提高CAR-T杀伤活性,并非通过降低mRNA水平来实现的,亦需进一步探讨其机制。

参 考 文 献

- [1] Gilham DE, Anderson J, Bridgeman JS, et al. Adoptive T-cell therapy for cancer in the United Kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015[J]. Hum Gene Ther, 2015, 26(5):276-285. DOI: 10.1089/hum.2015.024.
- [2] Li H, Zhao Y. Increasing the safety and efficacy of chimeric antigen receptor T cell therapy[J]. Protein Cell, 2017, 8(8):573-589. DOI: 10.1007/s13238-017-0411-9.
- [3] Velasquez MP, Torres D, Iwahori K, et al. T cells expressing CD19-specific Engager Molecules for the Immunotherapy of CD19-positive Malignancies[J]. Sci Rep, 2016, 6:27130. DOI: 10.1038/srep27130.
- [4] Otáhal P, Průková D, Král V, et al. Lenalidomide enhances anti-tumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(4):e1115940. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1115940.
- [5] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(6):540-549. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
- [6] Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias[J]. Blood, 2011, 118(18):4817-4828. DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
- [7] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+

CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(355):355ra116. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf8621.

[8] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients [J]. J Clin Invest, 2016, 126(6):2123-2138. DOI: 10.1172/JCI85309.

[9] Madorsky Rowdo FP, Baron A, Urrutia M, et al. Immunotherapy in Cancer: A Combat between Tumors and the Immune System; You Win Some, You Lose Some [J]. Front Immunol, 2015, 6: 127. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00127.

[10] Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7- h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(127):127ra37. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003689.

[11] Giri A, Walia SS, Gajra A. Clinical Trials Investigating Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer [J]. Rev Recent Clin Trials, 2016, 11(4):297-305.

[12] de Guillebon E, Roussille P, Frouin E, et al. Anti program death-1/anti program death-ligand 1 in digestive cancers [J]. World J Gastrointest Oncol, 2015, 7(8):95-101. DOI: 10.4251/wjgo.v7.i8.95.

[13] Gargett T, Yu W, Dotti G, et al. GD2- specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected From Activation-induced Cell Death by PD- 1 Blockade [J]. Mol Ther, 2016, 24(6):1135-1149. DOI: 10.1038/mt.2016.63.

[14] Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD- 1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance [J]. Nature, 2014, 515(7528):568-571. DOI: 10.1038/nature13954.

[15] Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition [J]. J Clin Invest, 2016, 126(8):3130-3144. DOI: 10.1172/JCI83092.

[16] Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD- L1 antibody MPDL3280A in cancer patients [J]. Nature, 2014, 515(7528):563-567. DOI: 10.1038/nature14011.

[17] Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):737. DOI: 10.1038/s41598-017-00462-8.

[18] Suarez ER, Chang de K, Sun J, et al. Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model [J]. Oncotarget, 2016, 7(23):34341-34355. DOI: 10.18632/oncotarget.9114.

(收稿日期:2019-04-22)
(本文编辑:刘爽)

《中华血液学杂志》第九届编辑委员会委员名单

顾 问 曹雪涛 陈赛娟 阮长耿
 名誉总编辑 王建祥
 总 编 辑 黄晓军
 副 总 编 辑 胡 豫 马 军 邵宗鸿 沈志祥 吴德沛 肖志坚 张凤奎
 编 辑 委 员(按汉语拼音排序) 艾辉胜 秘营昌 常英军 陈 虎 陈方平 陈芳源 陈国安 陈国强
 陈洁平 陈苏宁 陈协群 陈元仲 程 涛 董文革 方美云 冯建明 付 蓉 高春记
 高子芬 韩明哲 侯 健 侯 明 胡 豫 胡灯明 胡建达 黄 河 黄慧强 黄晓军
 纪春岩 江 明 江 倩 金 洁 克晓燕 赖永榕 李 娟 李 薇 李 晓 李 艳
 李建勇 李军民 李扬秋 李玉明 梁爱斌 刘 红 刘 林 刘 霆 刘代红 刘开彦
 刘启发 刘卓刚 罗建民 马 军 牛 挺 裴雪涛 彭 军 邱录贵 任汉云 邵宗鸿
 沈志祥 石远凯 宋永平 孙自敏 王 椿 王 敏 王 欣 王季石 王健民 王景文
 王学锋 魏旭东 吴德沛 肖志坚 徐 卫 徐开林 杨林花 杨仁池 于 力 张 梅
 张 曦 张凤奎 张广森 张连生 张晓辉 赵洪国 赵维莅 赵永强 郑以州 周 晋
 周道斌 周剑峰 朱 军 竺晓凡
 通 讯 编 委(按汉语拼音排序) 白 海 常春康 崔久崧 杜 欣 冯四洲 韩 冰 韩艳秋 胡 炯
 贾永前 姜尔烈 李 剑 刘 兵 刘 澎 钱文斌 邱 林 汝 昆 施 均 宋玉琴
 孙春艳 唐晓文 佟红艳 王 迎 王 昱 王宏伟 魏 辉 吴 彤 肖 扬 许兰平
 俞文娟 张 磊 张翼鹭 郑国光 庄俊玲