

热休克蛋白 A5 对雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤的作用研究

张志标 余 伟 马 达 刘礼军

【摘要】 目的 探讨热休克蛋白 A5(HSPA5)对雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤的作用。方法 分别用高浓度(1×10^{-5} mol/L)、低浓度(1×10^{-11} mol/L)的雨蛙肽建立胰腺腺泡细胞损伤模型。分别将 pcDNA3.1-HSPA5、pcDNA3.1、shHSPA5 和 shCon 以脂质体法转染胰腺腺泡 AR42J 细胞,用 qRT-PCR 法检测细胞中 HSPA5 mRNA 的表达,MTT 法检测细胞活力,Western blot 检测细胞中 HSPA5 的蛋白表达,流式细胞术检测细胞凋亡。结果 与对照组相比,高浓度和低浓度的雨蛙肽均能造成胰腺腺泡细胞损伤,且 HSPA5 在其中高表达。敲减 HSPA5 可加重胰腺腺泡细胞的损伤,过表达 HSPA5 可减轻胰腺腺泡细胞损伤,还可以逆转雨蛙肽对胰腺腺泡细胞的损伤作用。结论 HSPA5 可修复雨蛙肽对胰腺腺泡细胞的损伤,这将为胰腺炎的治疗提供新方向。

【关键词】 HSPA5;雨蛙肽;胰腺腺泡细胞;细胞损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2019.05.011

Effect of HSPA5 on cerulein-induced pancreatic acinar cell injury ZHANG Zhibiao. Department of Emergency, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan 431600, China; YU Wei, MA Da, LIU Lijun. Department of General Surgery, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan 431600, China

【Abstract】 Objective This paper is to investigate the effect of heat shock protein A5 (HSPA5) on cerulein-induced pancreatic acinar cell injury. **Methods** A pancreatic acinar cell injury model was established with a high concentration (1×10^{-5} mol/L) and a low concentration (1×10^{-11} mol/L) of cerulein. pcDNA3.1-HSPA5, pcDNA3.1, shHSPA5, and shCon were transfected into pancreatic acinar AR42J cells by using the liposome method. The expression of HSPA5 mRNA in cells was detected by using qRT-PCR. The cell viability was detected by using the MTT assay. The protein expression of HSPA5 was detected by using Western blot. The apoptosis was detected by using flow cytometry. **Results** Compared with the control group, it was found that the high concentration and low concentration of cerulein could cause pancreatic acinar cell damage, and HSPA5 was highly expressed in it. Besides, the knockdown of HSPA5 could aggravate the damage of pancreatic acinar cells. Moreover, the over-expression of HSPA5 could reduce the damage of pancreatic acinar cells, and can also reverse the damage of cerulein on pancreatic acinar cells. Furthermore, the knockdown of HSPA5 could aggravate the damage of pancreatic acinar cells. **Conclusion** HSPA5 can rescue the damage of pancreatic acinar cells by cerulein, which will provide a new direction for the treatment of pancreatitis.

【Key words】 HSPA5; Cerulein; Pancreatic acinar cells; Cellular injury

胰腺炎是一种病因较复杂的临床常见疾病,可分为急性胰腺炎和慢性胰腺炎^[1-2]。急性胰腺炎的

病情较严重,可引起全身并发症,出现多功能器官衰竭,甚至危及生命^[3]。Lerch 等^[4]早在 1992 年已发现急性胰腺炎的早期损伤部位是胰腺腺泡细胞。在胰腺炎动物模型中,消化酶和溶酶体水解酶的转运出现障碍,且均出现在细胞内的液泡中^[5]。随着细胞生物学和分子生物学的发展,学者们对腺泡细

作者单位:431600 湖北,汉川市人民医院急诊科(张志标),普外科二科(余伟、马达、刘礼军)

通信作者:余伟,Email: 78610726@qq.com

胞损伤机制的认识不断深入,这对研究胰腺炎的发病机制具有重要意义。

热休克蛋白 A5(HSPA5)是 HSP 70 家族成员之一,其可作为分子伴侣促进正常生长状态下的细胞蛋白质成熟,是维持细胞机能和生命的关键性调节物^[6]。HSPA5 可识别错误折叠的多肽,并通过蛋白酶作用使其降解,其也是内质网上的一种应激蛋白,在低糖、低氧或缺钙的应激状态下大量表达以维持内质网稳定,保护细胞对抗生理变化损伤^[7]。HSPA5 不仅在早期胚胎发育时是高度激活的,也是低葡萄糖水平、低 pH 和低氧诱导的结果,而这种环境非常有利于肿瘤的生长^[8]。总之,HSPA5 可通过阻断细胞重要蛋白质的变性及聚合而达到保护细胞的作用。HSPA5 在多种肿瘤中均高表达,为促癌因子^[9],但其在胰腺腺泡细胞中的作用机制尚未阐明。

雨蛙肽是一类与胆囊收缩素化学结构和药理作用相似的多肽类物质,具有较强的刺激胆囊收缩和胰酶分泌的作用。雨蛙肽可引起胰酶异常激活、凋亡基因表达、钙通道调控失调等,从而诱导胰腺腺泡细胞凋亡,引发组织损伤^[10]。这也为体外诱导胰腺腺泡细胞损伤,研究胰腺炎起到了重要作用。

本研究将建立雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤模型,通过检测 HSPA5 的 mRNA 和蛋白表达,观察过表达 HSPA5 和敲除 HSPA5 对胰腺腺泡细胞淀粉酶活性、乳酸脱氢酶(LDH)漏出率以及细胞增殖和凋亡的影响,以明确 HSPA5 对雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤的作用,以期为胰腺炎的早期诊断和治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

胰腺腺泡细胞 AR42J 购自美国模式培养物保藏所(CRL-1492TM);胎牛血清、DMEM 培养液、雨蛙素、MTT、SDS-PAGE 试剂、胰蛋白酶、ECL 发光液和 RIPA 蛋白裂解液均购自碧云天生物技术公司;PVDF 膜购自德国罗氏诊断有限公司;Biovision 淀粉酶活性检测试剂盒、LDH 细胞毒性检测试剂盒均购自武汉艾美捷科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自成都艾为特生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 脂质体试剂盒购自上海基星生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 HyClone Pierce 公司;逆转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;凝胶成像分析仪购自美国

Kodak 公司;半干转膜仪和 PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司;流式细胞仪购自美国 FALS CALIBAR BD 公司;ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统购自美国 ABI 公司;紫外分光光度计购自美国 Thermo 公司;细胞培养箱购自美国 Forma Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养胰腺腺泡细胞 AR42J,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,然后进行换液培养传代。

1.2.2 转染 为建立雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤模型,将正常培养的胰腺腺泡细胞 AR42J 标记为对照组,将分别用高浓度和低浓度的雨蛙肽(1×10^{-5} mol/L、 1×10^{-11} mol/L)处理 48 h 的 AR42J 细胞标记为 Cer-H 组、Cer-L 组;为检测 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响,将 pcDNA3.1-HSPA5、pcDNA3.1、shHSPA5、shCon 用 Lipofectamine™ 2000 脂质体试剂盒分别转染至 AR42J 细胞,转染 6 h 后,更换新鲜培养基继续培养 48 h,用 qRT-PCR 法确认转染成功后,将其标记为 pcDNA3.1-HSPA5 组、pcDNA3.1 组、shHSPA5 组、shCon 组,将不做任何处理的 AR42J 细胞标记为阴性对照组;为了检测过表达 HSPA5 对雨蛙素诱导的胰腺腺泡细胞损伤的影响,分别将 pcDNA3.1-HSPA5 和 pcDNA 3.1 用同样的脂质体方法转染至 Cer-H 组细胞,转染 6 h 后,更换新鲜培养基再次培养 48 h,用 qRT-PCR 法检测转染是否成功,将转染成功的标记为 pcDNA 3.1 + Cer-H 组、pcDNA 3.1-HSPA5 + Cer-H 组,不做任何处理的 AR42J 细胞标记为正常对照组。取对数生长期的转染细胞进行淀粉酶活性、LDH 漏出率、qRT-PCR、Western blot 和流式细胞术检测。

1.2.3 淀粉酶活性测定 取适量对数生长期的胰腺腺泡细胞,按照淀粉酶活性检测试剂盒说明书操作,在 405 nm 波长下测定细胞的吸光度。细胞中淀粉酶活性与细胞吸光度呈正比。每个样品做 5 个重复孔,实验重复 3 次。

1.2.4 LDH 漏出率测定 取适量胰腺腺泡细胞,按照 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明书操作,在 490 nm 波长下测定 LDH 的吸光度。LDH 活性与 LDH 吸光度呈正比,与 LDH 漏出率呈反比。漏出率(%) = 检测组 LDH OD₄₉₀/对照组 LDH OD₄₉₀ × 100 %。每个样品做 5 个重复孔,实验重复 3 次。

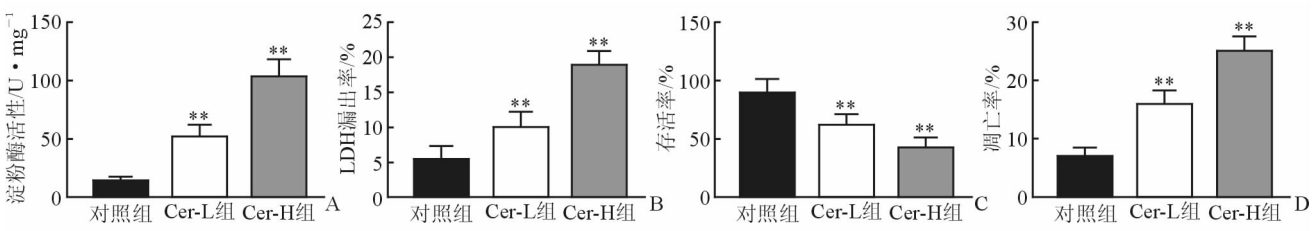
1.2.5 qRT-PCR 检测 HSPA5 mRNA 表达 取

适量对数生长期细胞,用 Trizol 法裂解细胞, RNA 抽提试剂盒提取 RNA 并定量。用逆转录试剂盒合成 cDNA,用 qRT-PCR 试剂盒检测 HSPA5 mRNA 表达,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算定量结果。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 取适量对数生长期细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次。用结合缓冲液 500 μ L 悬浮细胞,分别加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 PI,混匀,室温避光静置 15 min。采用流式细胞仪分析测定细胞凋亡率。细胞总凋亡率(%) = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。每个样品重复 3 次。

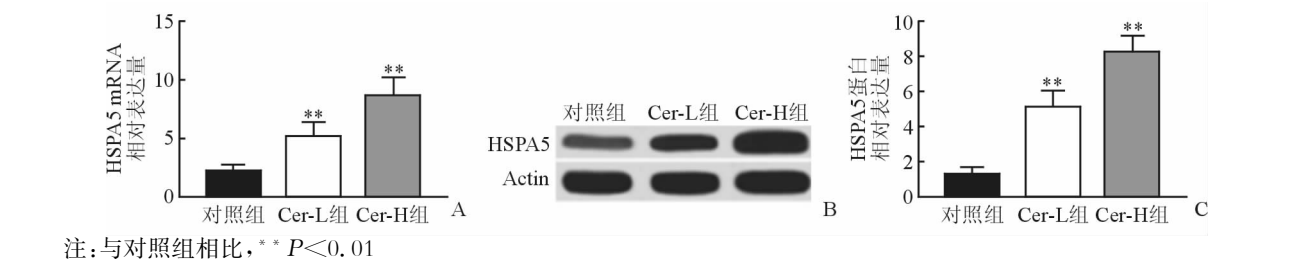
1.2.7 Western blot 检测 HSPA5 蛋白表达 取对数生长期细胞,RIPA 裂解后用 BCA 试剂盒定量,在 100 $^{\circ}$ C 水中变性 10 min,离心后取上清进行蛋白上样。按照 Western blot 操作流程进行电泳-转膜-封闭-I 抗孵育-II 抗孵育-显影曝光。Image J 软件分析目的条带灰度值,以目的条带灰度值与 Actin 灰度值的比值表示目的蛋白的表达情况。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$

图 1 不同浓度雨蛙肽对各组胰腺腺泡细胞损伤的影响 A 各组细胞淀粉酶活性比较 B 各组细胞 LDH 漏出率比较 C 各组细胞存活率比较 D 各组细胞凋亡率比较



注:与对照组相比, ** $P < 0.01$

图 2 雨蛙肽损伤的胰腺腺泡细胞中 HSPA5 的表达 A 各组细胞中 HSPA5 mRNA 表达的比较 B 各组细胞中 HSPA5 蛋白表达的比较(电泳图) C 各组细胞中 HSPA5 蛋白表达的比较(柱状图)

2.3 过表达 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响 将 pcDNA3.1-HSPA5、pcDNA3.1 以脂质体法分别转染到胰腺腺泡细胞,转染 48 h 后,用 Western blot 检测 HSPA5 蛋白的表达,结果如图 3A、3B 所示,与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-

2 结果

2.1 不同浓度的雨蛙肽对胰腺腺泡细胞的损伤

如图 1A、1B 所示,与对照组相比,高浓度和低浓度雨蛙肽处理的胰腺腺泡细胞的淀粉酶活性、LDH 漏出率均显著升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。用 MTT 法检测高浓度和低浓度雨蛙肽处理的胰腺腺泡细胞存活率,结果如图 1C 所示,与对照组相比,Cer-L 组和 Cer-H 组胰腺腺泡细胞的存活率均显著降低。用流式细胞术检测细胞凋亡率,结果如图 1D 所示,与对照组相比,Cer-L 组和 Cer-H 组胰腺腺泡细胞的凋亡率均显著升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。可见,不同浓度的雨蛙肽均可造成胰腺腺泡细胞损伤,本研究选用高浓度雨蛙肽用于后续胰腺腺泡细胞损伤模型的制备。

2.2 HSPA5 在雨蛙肽损伤的胰腺腺泡细胞中的表达

与对照组相比,Cer-L 组和 Cer-H 组细胞中 HSPA5 mRNA 的表达水平均显著升高(图 2A),HSPA5 的蛋白表达水平均显著升高(图 2B、2C),差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结果显示 HSPA5 在雨蛙肽损伤的胰腺腺泡细胞中高表达。

HSPA5 组细胞中 HSPA5 蛋白表达显著升高。如图 3C、3D 所示,与 pcDNA3.1 组相比,pcDNA3.1-HSPA5 组细胞淀粉酶活性、LDH 漏出率均显著下降,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。结果显示过表达 HSPA5 可保护胰腺腺泡细胞。

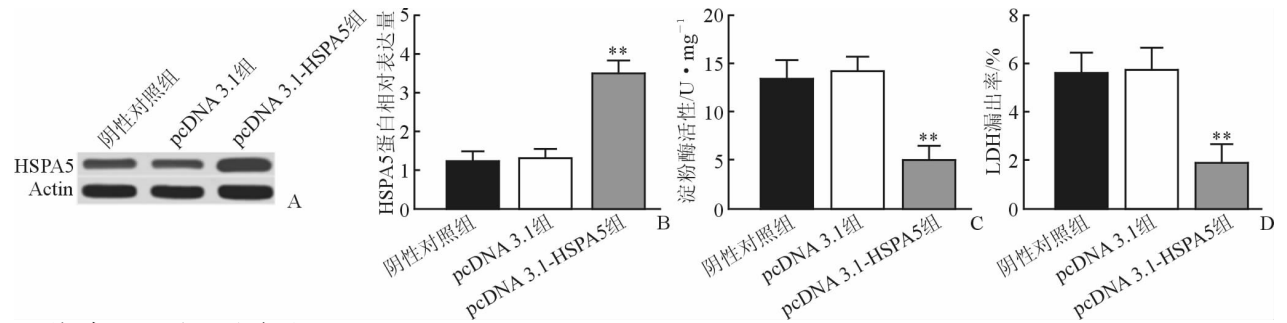
2.4 敲减 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响

将 shCon、shHSPA5 用脂质体法分别转染至胰腺腺泡细胞,标记为 shCon 组、shHSPA5 组,以观察敲减 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响。与 shCon 组相比,shHSPA5 组细胞中 HSPA5 蛋白表达水平显著降低(图 4A),淀粉酶活性显著升高(图 4B),LDH 漏出率显著升高(图 4C),差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。结果显示敲减 HSPA5 可加重胰腺腺泡细胞的损伤。

2.5 过表达 HSPA5 对雨蛙肽对胰腺腺泡细胞损伤作用的影响

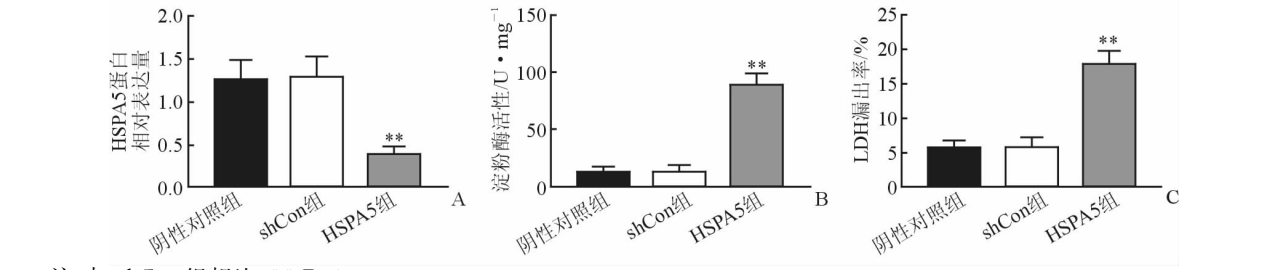
分别将 pcDNA3.1、pcDNA3.1-HSPA5 用脂质

体法转染至用高浓度雨蛙肽处理的胰腺腺泡细胞,标记为 pcDNA3.1 + Cer-H 组、pcDNA3.1-HSPA5 + Cer-H 组,用来观察过表达 HSPA5 对雨蛙素损伤胰腺腺泡细胞的影响。与正常对照组相比,pcDNA3.1 + Cer-H 组细胞淀粉酶活性、LDH 漏出率、细胞凋亡率均显著升高,细胞存活率显著降低,差异均有统计学意义(P 均 <0.01);正常对照组与 pcDNA3.1-HSPA5 + Cer-H 组细胞淀粉酶活性、LDH 漏出率、细胞存活率、细胞凋亡率的差异均无统计学意义。见图 5。结果显示过表达 HSPA5 可减轻雨蛙肽对胰腺腺泡细胞的损伤作用。



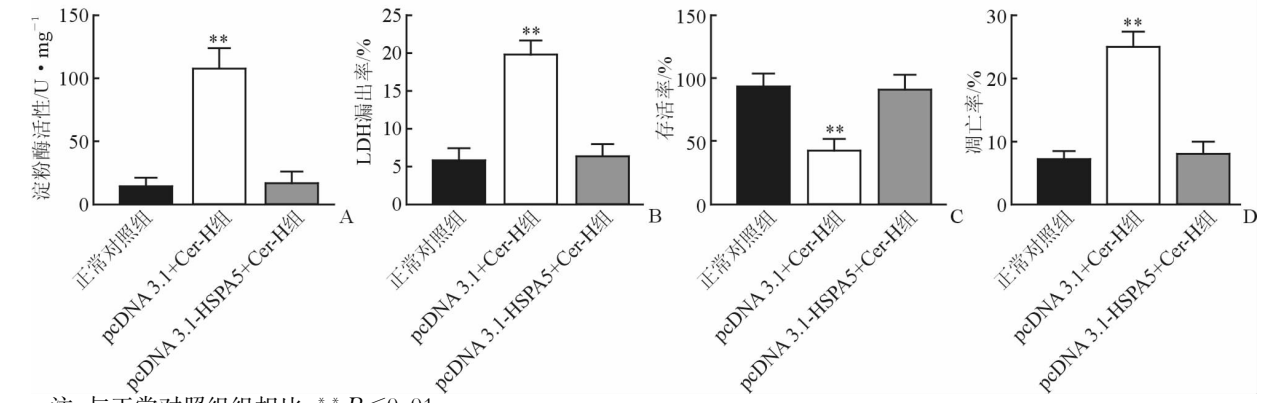
注:与 pcDNA3.1 组相比, ** $P<0.01$

图 3 过表达 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响 A 各组细胞中 HSPA5 蛋白表达的比较(电泳图) B 各组细胞中 HSPA5 蛋白表达的比较(柱状图) C 各组细胞淀粉酶活性比较 D 各组细胞 LDH 漏出率比较



注:与 shCon 组相比, ** $P<0.01$

图 4 敲减 HSPA5 对胰腺腺泡细胞损伤的影响 A 各组细胞中 HSPA5 蛋白表达的比较 B 各组细胞淀粉酶活性比较 C 各组细胞 LDH 漏出率比较



注:与正常对照组相比, ** $P<0.01$

图 5 过表达 HSPA5 对雨蛙肽对胰腺腺泡细胞的损伤 A 各组细胞淀粉酶活性比较 B 各组细胞 LDH 漏出率比较 C 各组细胞存活率比较 D 各组细胞凋亡率比较

3 讨论

雨蛙肽又名雨蛙素、蛙皮素、羚蟾素、羚蟾肽,目前已开发用于建立大鼠、小鼠、狗和叙利亚仓鼠等急性胰腺炎动物模型,1971 年首次由 Anastasi 等^[11]从欧洲两种蛙的皮肤中提取所得,它是一个具有多种活性结构形式的家族,其结构为 10~27 个氨基酸,雨蛙肽为 14 肽,均具有与雨蛙肽相似的 C 端肽链,而且具有许多相同的生理作用^[12]。许多研究报道应用雨蛙肽建立胰腺炎模型^[13-15]。本研究用不同浓度的雨蛙肽与胰腺腺泡细胞共培养,通过试剂盒检测细胞淀粉酶活性和 LDH 漏出率,MTT 法检测细胞存活率,流式细胞术检测细胞凋亡率,结果显示不同浓度的雨蛙肽均可造成胰腺腺泡细胞损伤。

1962 年 Ritossa^[16]首次发现热休克现象,1974 年有学者将在热休克中发生抑制的蛋白命名为“HSP”。HSP 中较保守和较主要的成员有 HSP68、HSP70、HSP72 和 HSP78,其中 HSP70 及其编码基因均具有高度保守性,其在缺血性脑损伤中的研究较多^[17]。HSP70 是目前哺乳动物细胞中重要的、研究得较为深入的 HSP 家族,HSPA5 为 HSP70 家族中的一员,其具有 HSP70 的特性和功能。尽管 HSPA5 在很多肿瘤组织和肿瘤细胞中高表达,且具有促进肿瘤发生、发展的作用,但 HSP70 的这种普遍存在、高度保守的特性是细胞保护的基础,得到了广泛认可^[18-20]。于枫等^[21]对 HSP70 与细胞凋亡的关系的研究发现,HSP70 可阻止变性细胞蛋白质凝集,调节应激活化蛋白激酶,阻止细胞色素 C 从线粒体释放,抑制细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子 1 结合,阻止半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)活化,从而抑制细胞凋亡,保护细胞受损。

本研究建立了雨蛙肽刺激 AR42J 细胞的胰腺炎模型,通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测受损的 AR42J 细胞中 HSPA5 的 mRNA 和蛋白表达,发现 HSPA5 在受损的 AR42J 细胞中高表达;此外,通过检测敲减和过表达 HSPA5 的 AR42J 细胞的淀粉酶活性、LDH 漏出率、细胞存活率及细胞凋亡率,发现 HSPA5 对受损的 AR42J 细胞具有修复能力,揭示其对雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤具有保护作用。

综上所述,HSPA5 可保护雨蛙肽诱导的胰腺腺泡细胞损伤,这对急性胰腺炎的靶点治疗具有重要意义。

参 考 文 献

1 Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and

pancreatic cancer [J]. Gastroenterol, 2013, 144 (6): 1252-1261.

2 Qian JM, Lai YM. Clinical advances in acute pancreatitis[J]. J Clin Hepatol, 2013, 29(7): 481-483.

3 Munsell MA, Buscaglia JM. A cute pancreatitis[J]. J Hosp Med, 2010, 5(4): 241-250.

4 Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, et al. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells[J]. Gastroenterol, 1992, 103(1): 205-213.

5 De Lisle RC. Altered posttranslational processing of glycoproteins in cerulein induced pancreatitis[J]. Exp Cell Res, 2005, 308(1): 101-113.

6 Ortiz C, Cardemil L. Heat-shock responses in two leguminous plants;a comparative study[J]. Exp Bot, 2001, 52(361): 1711-1719.

7 Lee AS. The glucose-regulated proteins :stress in duction an dclinical applications[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(8): 504-510.

8 王文亭, 李建远. HSPA5 研究进展[J]. 中外医学研究, 2010, 8(8): 26-27.

9 Aran G, Saniurio L, Barcena C, et al. CD5L is upregulated in hepatocellular carcinoma and promotes liver cancer cell proliferation and antiapoptotic responses by binding to HSPA5 (GRP78)[J]. 2018, 32(7): 3878-3891.

10 Lee J, Seo J, Kim H, et al. Signal transduction of cerulein induced cytokine expression and apoptosis in pancreatic acinar cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010(1): 104-108.

11 Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians bombina and alytes [J]. Experientia, 1971, 27(2): 166-167.

12 Brown M, Marki W, Rivier J, et al. Is gastrin releasing peptide mammalian bombesin[J]. Life Sci, 1980, 27(2): 125-128.

13 Yao Y, Wang F, Yang X, et al. Bombesin attenuated ischemia-induced spatial cognitive and synaptic plasticity impairment associated with oxidative damage[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103(1): 87-93.

14 Sakuma Y, Kodama Y, Eguchi T, et al. Chemokine CXCL16 mediates acinar cell necrosis in cerulein induced acute pancreatitis in mice[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 8829-8838.

15 Leema G, Tamizhselvi R. Protective effect of scopoletin against cerulein-induced acute pancreatitis and associated lung injury in mice[J]. Pancreas, 2018, 47(5): 577-585.

16 Ritossa FM. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in Drosophila[J]. Experientia, 1962, 18(2): 571-576.

17 韦应波, 孙喜庆, 吴兴裕, 等. 热休克蛋白 70 与加速度应激 [J]. 航天医学与医学工程, 2001, 14(6): 460-464.

18 Craig E. Hsp70 at the membrane: driving protein translocation [J]. BMC Biol, 2018, 16(1): 11-14.

19 Mayer MP. Intra-molecular pathways of allosteric control in Hsp70s[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2018, 373

(1749). pii: 20170183.

20 Hebert SM, Rotta B, Kirkpatrick B, et al. The interplay between glucose-regulated protein 78 (GRP78) and steroids in the reproductive system[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (7): 1842-1842.

21 于枫, 张达, 田文儒, 等. 热休克蛋白 70 与细胞凋亡[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2005, 10(10): 84-85.

(收稿日期:2018-09-18)

(本文编辑:林磊)

《国际消化病杂志》编委会名单

- 顾 问 王兴鹏 王吉耀 王灵台 厉有名 刘厚钰 朱正纲 江石湖
- 吴志勇 李兆申 李宏为 李定国 陈成伟 巫协宁 林三仁
- 房静远 欧阳钦 胡品津 袁耀宗 曾民德 樊 嘉 樊代明
- 名誉主编 邱德凯
- 主 编 马 雄
- 副 主 编 陆 红 陆伦根 陈胜良 夏 强 谢渭芬
- 主编助理兼秘书 王绮夏
- 编 委 (按姓氏笔画为序)
- 丁伟群 于晓峰 戈之铮 王 坚 王江滨 王邦茂 王良静
- 王承党 王炳元 王胜兰 王晓艳 冉志华 冯 珍 史留斌
- 田德安 刘 杰 刘 菲 刘文忠 刘玉兰 刘成海 刘海林
- 刘颖斌 华 静 吴叔明 张 威 李 海 李 爽 李延青
- 李晓波 杨长青 杨永峰 沈锡中 陈 吉 陈卫昌 陈小平
- 陈克敏 陈维雄 孟祥军 林 勇 范竹萍 范建高 茅益民
- 郑 青 郑 萍 侯晓华 保志军 姜 泊 柏 愚 胡和平
- 赵 刚 郜恒骏 钟 良 聂勇战 贾继东 黄 蔚 曾 欣
- 董 蔚 蒋 炜 韩 英 虞朝辉 熊伍军 缪应雷