

# 基因疗法在骨科运用的可能性

朱建民 金宗达 王萍花 吴 驿  
(上海市第八人民医院, 上海 200233)

基因疗法是指将外源性基因转移到个体以达到治疗疾病的目的。早期设想是将基因疗法作为一种补偿机制治疗遗传性疾病。近年来, 采用基因转移方法将基因疗法作为一种药物转移系统 (drug delivery system) 可治疗获得性疾病<sup>[1]</sup>。首例基因转移成功是一个标记基因 (即不是以治疗疾病为目的, 而是显示基因转移成功与否)。在美国, 人类基因转移疗法是在 1988 年由美国国家卫生研究所重组 DNA 咨询委员会 (the Recombinant DNA Advisory Committee of the National Institutes of Health) 批准实施的。1990 年美国人将一个标记基因转移到黑色素瘤患者体内; 1991 年, 第一个治疗基因 (therapeutic gene, 即期望产生治疗效应的基因) 转移到 T-淋巴细胞以矫正腺苷脱氨酶缺乏症。到目前为止, 重组 DNA 咨询委员会已批准了 80 多例基因转移病人的临床研究, 其中约 50 例正在世界各地实施中。尽管基因疗法还没有治疗骨科疾病的临床研究, 但 1993 年 6 月, 重组 DNA 咨询委员会则批准了 2 例治疗 Gaucher's 病的临床研究; 1994 年 6 月, 该委员会又批准第 3 例采用基因转移到类风湿关节炎患者关节内的临床研究, 这些都为基因疗法在骨科的应用具有了可能性<sup>[1]</sup>。

## 1 基因转移的载体

基因疗法有两大基本系统, 即基因转移系统和基因表达—调节系统。除极少数外, 裸体 DNA 一般是不能进入细胞并进行良好表达的, 这种能使细胞摄取遗传物质和表达遗传信息的作用物质叫载体 (vector)。基因载体分为病毒和非病毒 (non-viral delivery system) 两类, 病毒是非常有效的载体, 当病毒用作载体时, 病毒基因组的一些成份通常要被切除, 并被一些插入基因所替代。这种附加基因还可防止病毒感染靶细胞后大量增殖引起病理改变, 从而使病毒载体设计成只能传递遗传物质到靶细胞的细胞核内, 并无其他细胞毒作用<sup>[2]</sup>。

逆转录病毒 (retroviruses) 和腺病毒相关病毒 (adenosocited viruses) 是病毒载体的两种类型, 它们可通过感染将自己的遗传物质整合到细胞的 DNA 中去。逆转录病毒是基因疗法中最有发展前途的病毒载体, 现已用于许多临床研究<sup>[3]</sup>。目前, 采用特殊细胞株可获得每毫升大于  $10^6$  有用滴度的重组病毒产品, 以供临床研究使用。然而, 逆转录病毒载体也有一些缺点, 包括 (1) 大多数逆转录病毒可诱导 Moloney 鼠白血病病毒; (2) 逆转录病毒基因组太小, 最大限度只能接受 8000 个额外核碱基, 不适合于基因编码大分子量蛋白质和多个基因; (3) 由于逆转录病毒基因插入到宿主细胞 DNA 的部位是随机的, 当病毒顺序进入宿主基因细胞敏感部位时有可能诱发突变, 可导致肿瘤基因激活和肿瘤抑制基因功能丧失, 从而诱发恶性肿瘤; (4) 逆转录病毒载体最大缺点是不能转导到不

分裂细胞内, 只有在细胞分裂时病毒 DNA 才能进入细胞核内<sup>[3]</sup>。

腺病毒相关病毒不具有逆转录病毒载体的上述限制<sup>[4]</sup>, 它们是一类细小 DNA 病毒, 人们可获得每毫升  $10^{10}$  以上非常高滴度病毒。它们是非致病性病毒, 将它们的 DNA 插入到宿主细胞基因组某个单链时, 可作用于人染色体<sup>-19</sup>顶点的特异部位。腺病毒相关病毒载体的最大优点是能感染不分裂细胞, 目前已有报告它们能很好地将基因转移到神经细胞<sup>[5]</sup>和气管上皮细胞, 从而显示采用腺病毒相关病毒载体可治疗神经退行性病变和囊性纤维病。腺病毒相关病毒载体的缺点包括 (1) 它们很难增殖成为高滴度重组病毒, 且重组病毒 DNA 顺序可被外源性 DNA 所替代; (2) 重组病毒可失去将自身 DNA 插入宿主细胞基因组特异部位的能力; (3) 这些小颗粒病毒限制了它们最多只能携带大约 4000 碱基的外来 DNA。

腺病毒是一类非整合性病毒, 它们感染细胞后不将自己的遗传物质插入到细胞的染色体上, 在非整合附加基因存在的条件下, 其 DNA 包含在细胞核内, 因而它们是最有发展前途的非整合病毒载体, 目前已用于对囊性纤维病的基因疗法研究中<sup>[6]</sup>。重组腺病毒很容易获得高滴度病毒, 并对分裂和不分裂细胞都具有很高的感染率。腺病毒载体的缺点有 (1) 转移基因的表达可随时间的推移迅速减低; (2) 如果其 DNA 包含在附加基因中便丧失表达能力; (3) 腺病毒蛋白质具有抗原性, 可刺激免疫系统攻击腺病毒感染细胞<sup>[7]</sup>。

单纯疱疹病毒是正在发展的另一种感染不分裂细胞的病毒载体, 其基因组很大, 理论上可携带大片段外源性 DNA。但与腺病毒一样, 单纯疱疹病毒载体也具有细胞毒性和临时性基因表达等问题。其他病毒包括乳头状瘤病毒, 猴猴病毒-40, 多瘤病毒, 牛痘病毒, 细小病毒 (picornavirus) 和某些其他病毒也正在作为基因载体研究中。

非病毒载体通常比病毒副本容易研制, 其具有很大的化学稳定性; 还由于它们不含有外来蛋白质和其他强烈的抗原物质, 所以通常可反复使用。目前临床上已用于囊性纤维病和黑色素瘤基因治疗研究。其他非病毒载体—DNA 配体复合物也正在研究中。非病毒载体利用细胞表面特异受体使目的 DNA 进入细胞, 并促使细胞摄入核内<sup>[8]</sup>。肝细胞表面具有丰富的无唾液酸糖蛋白受体, 因而可采用 DNA—聚赖氨酸—无唾液酸糖蛋白复合物来轰击肝细胞。这种受体介导摄入的基因表达非常有效, 通过掺合腺病毒蛋白将增加基因表达<sup>[9]</sup>。

裸体 DNA 只能在极少数细胞中进行转移和表达, 包括骨—肌肉细胞、皮肤细胞和甲状腺细胞等<sup>[4]</sup>, 其中皮肤和骨—

肌肉细胞中表达时间最长, 甲状腺细胞基因表达半衰期只有 40 小时。注射 DNA 到兔膝关节内也可导致滑膜组织临时性基因表达<sup>[10]</sup>。

在缺乏有效的细胞摄入 DNA 的条件下, 采用基因枪通过微粒射击的方法也可使基因强行进入细胞内。早先人们只介绍采用基因枪将 DNA 射入植物细胞内, 近年来的体内和体外研究显示, 基因枪也可将要转移的 DNA 射入人细胞内。黄金微粒( particles of gold) 大多为 1~7 微米大小, 表面包上 DNA 后使其加速到很高速度, 这时包着 DNA 的黄金微粒可有效地穿透细胞膜并转染细胞。有人报告, 基因枪射入的基因其表达水平是很高的, 但持续时间不长。

## 2 基因转移的方法

基因转移有两个基本方法, 即外源基因通过载体直接进入体内, 或在体外将靶细胞用外源基因转染后再植入体内。前者称谓直接(体内)基因转移法; 后者称谓间接(体外)基因转移法。采用体内方法转移基因的技术相对简单, 而体外方法则复杂得多, 但却有许多优点。首先, 当靶细胞分离出来后, 可在试管控制下操作, 没有病毒颗粒或 DNA 复合物注入体内。此外, 采用体外转移基因的方法还有在体外选择高水平外源基因表达细胞的机会, 这种选择作用是通过选择标记物基因连接和治疗基因的协同转导( *co*transduction) 来完成的, 这种标记物基因的表达将使细胞抵抗某些物质, 如 Neo 基因可抵抗新霉素, 否则这些细胞将死去, 而表达选择性标记物基因的细胞则可存活下来。因为选择性标记 Neo 基因可使得细胞抵抗新霉素和合成 G418 类似物, 经过载体感染的阳性细胞可同时携带被转移的治疗基因和 Neo 基因。当细胞分裂时, 那些不表达 neo 基因的细胞将被 G418 物质杀死, 幸存的细胞不仅有基因的表达, 而且也能表达外源性的治疗基因。在 G418 物质存在的情况下, 转染的细胞继续生长, 从而可提供大量的携带的基因, 遗传信息的选择性细胞克隆。在体外也可采用逆转录病毒将基因转移到细胞中去, 包括软骨细胞、滑膜细胞和骨髓基质细胞等。一般情况下, 这些细胞在体内分裂很慢, 在体外丝裂原作用下则常可出现分裂<sup>[2]</sup>。

采用体内或体外基因转移方法将目的基因固定到病变或其他部位, 若基因产品进入全身循环称谓全身性基因疗法, 若基因产品仅作用于病变部位称谓局限性基因疗法。前者适用于累及多器官或多系统病变的治疗, 但副作用较大; 后者常适用局部单病灶治疗, 但副作用小。目前研究显示, 用于全身性基因治疗有发展前途的细胞包括淋巴细胞、骨髓细胞、肌细胞、肝细胞、皮肤细胞和人工器官移植后出现在胶原中的转导细胞<sup>[11]</sup>。

## 3 基因表达的调控

有效的基因转移到适当的靶细胞后还需要基因有一个适当的表达水平和时间, 这就与基因表达和调节有关。尽管基因表达受到许多复杂机制的控制, 但关键是特异基因启动子( promoters), 它们不仅调节 RNA 的合成, 从而影响基因转录, 在许多情况下, 大多可调节基因表达, 但只适用于高基因表达水平, 而且很快就会使基因表达能力丧失或中止。有人报告, 在体内成纤维细胞中, 采用逆转录病毒长末端重复启动子调节的基因大约 1 个月时间内失去表达能力<sup>[12]</sup>, 当它们在造血

基质细胞中则可使基因持续表达好几个月。此外, 病毒启动子在细胞停止分裂时常可丧失基因表达作用, 这可能是由于甲基化酶的作用, 使细胞内启动子胞嘧啶残端甲基化所致<sup>[13]</sup>。

研究显示, 一些真核细胞启动子具有延长和调节靶细胞基因表达作用, 从而被称为管家基因( house keeping genes), 但真核细胞启动子的表达水平一般都低于病毒启动子。因此, 有人试图从病毒和哺乳动物启动子中设计出一种杂交启动子( hybrid promoters) 作为掺合调节成份, 从而获得高效和长久基因表达功能。另外, 真核细胞基因启动子也可用于组织特异基因表达, 组织特异性启动子可包括肝细胞白蛋白启动子和关节软骨细胞中 II 型胶原启动子。

为了达到基因治疗的目的, 基因表达的水平和时间必须保证, 目前调节基因表达最常用的方法是采用诱导启动子( inducible promoters), 这种启动子具有在疾病不同时期根据外源或内源性刺激物积蓄量来调节基因表达能力。例如金属硫蛋白启动子( metallothionein promoters) 可与重金属发生反应, 激素诱导启动子( steroid inducible promoters) 可与地塞米松发生反应。此外, Wang 等<sup>[14]</sup> (1994) 发现了个复杂的调节因子—基因开关, 基因开关对浓度极低的黄体酮拮抗剂 RU486 发生反应, 在基因开关控制下, 转移到病人体内的基因表达可以被 RU486 诱导。

除启动子外, 某些附加物质( additional elements) 对基因表达也有影响, 包括增强子( enhancers, 增加基因表达物质)、抑制因子( silencers, 减低基因表达物质)、位点控制物质( locus control elements, 控制 DNA 大片区域调节物质) 和染色质的组织结构等。此外, 改变 mRNA 的稳定性( 即改变供翻译蛋白质 mRNA 的数量) 和蛋白质转译能力( 即改变每个 mRNA 分子合成蛋白分子的数量) 都可以增加蛋白质的合成。

## 4 骨—肌肉系统的基因转移

某些骨科遗传性疾病, 获得性疾病和其它骨—肌肉系统疾病都可通过基因疗法进行治疗, 因此必须率先发展滑膜、软骨、韧带、肌腱、骨和肌肉的基因转移技术。有人在兔膝关节模型上, 采用体内和体外基因转移技术将不同的基因转移到滑膜组织, 体外方法已经可使被转移基因出现临时性表达, 其表达强度不超过 6 周。有人将重组腺病毒直接注射到兔膝关节内并使其传染 A 型和 B 型滑膜细胞, 其基因表达持续时间至少可达 8 周。在体内, 大多采用单纯疱疹病毒和脂质体来转染滑膜细胞, 但尚未获得高水平 and 长时间的基因表达效果<sup>[10]</sup>。尽管在体内很容易将基因转移到滑膜细胞, 但丰富的细胞外基质可阻碍基因转移到细胞内, 这种情况对于骨和软骨细胞来说尤为重要, 因为它们都有非常丰富的细胞基质, 而且骨细胞基质是钙化的。

有人发现抽取和静脉会注后, 人造血干细胞可进入血液循环和回归骨髓。人造血干细胞表面含有 CD34 分子, 采用抗 CD34 亲和棒( affinity column) 从周围血中很容易被分离, 并在静脉回归体内之前在体外采用逆转录病毒转导即可达到基因治疗之目的<sup>[13]</sup>。

基因转移到肌肉不仅是治疗肌肉疾病的一条途径, 而且是获得全身性基因产品和注射 DNA 编译免疫受体拮抗蛋白

(immunizing the recipient against the proteins) 的一条途径。当将质粒 DNA 注射到骨骼肌时,就被肌纤维吸取,并被延长基因表达时间。肌肉细胞显示出向免疫系统提呈抗原,这种抗原被发现是由于非常有效注入 DNA 合成的蛋白质,从而提供了强有力的抗原性。这些研究可望用于发展抗感染和抗肿瘤疫苗研究。另外,人们可采用直接基因转移方法将基因转移到成熟的肌纤维,也可采用体外方法将基因转移到肌母细胞。大量肌母细胞可在体外生长,它们很容易被逆转录病毒感染。这种方法的缺点是很难获得足够数量的肌母细胞以满足大量肌群注射的需求,此外是移植细胞的低植入率(1%)。

### 5 基因疗法在骨科疾病的应用

**骨关节炎和类风湿关节炎** 注射的目的是将抗关节炎基因转移到病变的关节,采用局部基因转移到滑膜组织的方法是治疗累及少数关节和不累及关节外组织关节炎的一种方法,但不能治疗与关节炎有关的全身性疾病,如类风湿关节炎<sup>[15]</sup>。有人报告,运用逆转录病毒和 MFG-IRAP 体外转移的人白介素 1(IL-1)受体拮抗基因导致了关节内人 IL-1 受体拮抗剂纤克定量(nanogram quantifies)蓄积,而这已足够抑制注射 IL-1 $\beta$  引起的炎症反应<sup>[16]</sup>。尽管人 IL-1 受体拮抗基因表达随着时间的推移而渐渐减退,但这对于治疗抗原诱发性关节炎的价值已很高,拮抗的时间已足够长了。在抗原诱发性关节炎早期,当投入 IL-1 受体拮抗基因 1 天时,就具有软骨的保护作用和消炎作用,并可持续一周时间。

**骨关节病变的治疗** 可能需要将基因转移到软骨细胞以补偿软骨基质结构蛋白的突变,或转移一些细胞因子基因,例如胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和 $\beta$ -转化生长因子(TGF $\beta$ ),它们可抵制软骨的剥脱,增加软骨基质合成。目前软骨细胞已在体外转导,回植后在体内的基因表达正在研究中。

**Gaucher's 病** Gaucher's 病的基因疗法寄希望于从 cDNA 文库中成功地克隆出人葡萄糖脑苷脂酶基因,然后将该基因转移到 Gaucher's 病患者的成纤维细胞内,并采用逆转录病毒长末端重复核酸结构作为启动子维持葡萄糖脑苷脂酶基因的高表达水平。目前已在鼠造血干细胞获得成功,即将葡萄糖脑苷脂酶基因通过逆转录病毒体外转移细胞表面具有 CD34 抗原的造血干细胞<sup>[17]</sup>。

**成骨不全和其他遗传性疾病** 成骨不全是基因缺陷性疾病,目前正常等量的缺陷胶原基因已被克隆,并已用于鼠模型研究<sup>[18]</sup>。然而,II、III、IV 型成骨不全一般是由于 I 型胶原显性负突变(dominant negative mutation)所致,要求基因疗法前使内源性缺陷基因保持沉默才能获得成功。I 型成骨不全却不存在这些限制,所以目前选择基因疗法更具优越性。最近,正在试图发展一种基因治疗新方法治疗成骨不全,即将目的基因转移到原祖成骨细胞(osteoblast progenitor cells)。

其他类型的遗传性结缔组织病变,包括 Ehlers-Danlos 综合症,各种类型的粘多糖病和软骨营养不良也可采用基因疗法。软骨营养不良,Stickler 综合症,软骨形成不良(achondrogenesis),脊椎骨骺营养不良和低软骨生长病(hypochoondrogenesis)也是由于 II 型胶原基因缺陷所致,因此也可采用基因疗法进行治疗。血友病采用基因疗法是一个良好的选择,因为凝血因子的缺陷已弄清楚,且编码这些缺陷凝血因子的

正常基因已被克隆。这些基因的表达似乎不再需要调节,因为这些凝血因子可在血清中具有很大的浓度范围<sup>[2]</sup>。

**肌营养不良(muscular dystrophy)** 随着肌营养不良因子(dystrophin)的确定及其基因的克隆以及 Duchenne Becker 肌营养不良症缺陷分子的确立,给这些和其他遗传性肌肉病变的基因疗法奠定了基础。尽管 Duchenne 肌萎缩动物模型的建立和研究容易获得成功,但仍有许多难以克服的问题,例如营养不良因子是一个非常大的蛋白质,其 cDNA 长度达 14Kb,远远超过了目前使用的基因载体碱基数。为此,人们研究出一类被称为微小原(minigenes)的物质有助于这些问题的解决。这些微小原含有 DNA 顺序的某些缺失结构,所以可产生更小的包含某些亲代分子生物特性的蛋白质。尽管 DNA 的缺陷是大片段的,但只要这种情况不常发生即可。在肌肉特异启动子和肌酸激酶的控制下,营养不良因子微小原已被用于产生转基因鼠(transgenic mice),这种鼠携带一个矫正营养不良因子基因突变基因,从而导致转基因鼠子代肌异常症得以矫正。将这种技术应用到人体细胞基因疗法中目前还是受到几乎所有肌细胞都被营养不良因子转导这个事实的阻挠,而且该技术目前尚不成熟<sup>[2]</sup>。

**组织愈合** 肌肉-骨骼组织常常不能很好地愈合,某些生长因子目前已在临床使用以促进肌肉-骨骼组织的修复。例如 TGF $\beta$  和碱性成纤维生长因子(bFGF)已有报告可促进软骨愈合,至于其他生长因子促进韧带愈合的作用目前正在研究<sup>[18]</sup>。各种骨形成蛋白(BMP)不久前已在临床试用于骨不连的治疗;IGF-1 可用于预防肌废用性萎缩,采用基因疗法转移有关蛋白质生长因子即可能解决这些问题,且基因表达只需要在组织愈合的时间内即可,从而使临时性基因表达技术用于临床<sup>[19]</sup>。

**其他疾病** 目前发现,软骨发育不全性侏儒,Crouzon 综合症和 Pfeiffer 综合症都是由于成纤维细胞生长因子受体缺乏所致,这种基因缺失导致的发育异常可通过基因疗法加以矫正,相应的技术正趋成熟<sup>[20]</sup>。此外,一旦基因疗法用于癌肿的治疗,骨肉瘤、Ewing's 肉瘤和其他骨-肌肉系统的恶性肿瘤的治疗将获得改进。最后,类风湿病、系统性红斑狼疮和硬皮病也可得益于基因疗法。对于慢性系统性自身免疫性疾病来说,转换编码免疫抑制蛋白基因将具有良好的治疗价值,但这些基因必须有选择性地转移到免疫活性细胞或其他组织,在这些组织和细胞中,基因产物将变成全身性作用。

### 参考文献

- [1] Latchman DS. Germline gene therapy? *Gene Ther*, 1994, 1: 277.
- [2] Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1995, 77: 1103.
- [3] Robbins PD, Tahara H, Mueller G, et al. Retroviral vectors for use in human gene therapy for cancer, Gaucher disease, and arthritis. *Ann New York Acad Sci*, 1994, 716: 72.
- [4] Kotin RM. Prospects for the use of adenovirus associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1994, 5: 793.
- [5] Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, et al. Long term gene expression and phenotypic correction using adenovirus associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genet*, 1994, 8: 148.
- [6] Wilson JM. Cystic fibrosis: strategies for gene therapy. *Sem Resp Crit*

Care Med, 1994, 15: 439.

[ 7 ] Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1 deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 4407.

[ 8 ] Perales JC, Ferkol T, Beegen H, et al. Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor targeted uptake. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 4086.

[ 9 ] Sikes ML, O'Malley BW Jr, Finegold MJ, et al. In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther*, 1994, 5: 837.

[ 10 ] Nita I, Galea Lauri J, Georgescu HI, et al. Direct gene delivery to synovium. *Trans Orthop Res Soc*, 1994, 19: 479.

[ 11 ] Raz E, Carson DA, Parker SE, et al. Intradermal gene immunization, the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 9519.

[ 12 ] Palmer TD, Rosman GJ, Osborne WR, et al. Genetically modified skin fibroblasts persist long after transplantation but gradually inactivate introduced genes. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 88: 1330.

[ 13 ] Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated

with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 2567.

[ 14 ] Wang Y, O'Malley BW Jr, Tsai SY, et al. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91: 8180.

[ 15 ] Evans C, Robbins PD. Prospects for treating arthritis by gene therapy. *J Rheumatol*, 1994, 21: 779.

[ 16 ] Hung GL, Galea Lauri J, Mueller GM, et al. Suppression of intrarticular responses to interleukin 1 by transfer of the interleukin 1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther*, 1994, 1: 64.

[ 17 ] Nimgaonkar MT, Bahnson AB, Boggs SS, et al. Transduction of mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther*, 1994, 1: 201.

[ 18 ] Knillan JS, Li SW, Prockop DJ. Partial rescue of a lethal phenotype of fragile bones in transgenic mice with a chimeric antisense gene directed against a mutated collagen gene. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 8: 148.

[ 19 ] Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, et al. Effect of growth factors on the proliferation of fibroblasts from the medial collateral and anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*, 1995, 13: 184.

[ 20 ] Kolberg R. RAC tiptoes into new territory: in utero gene therapy. *J NIH Res*, 1995, 7: 37.

(收稿: 1997-09-21 编辑: 李为农)

## 《中国骨伤》第五届编委会名单

主 编 尚天裕

常务副主编 胡荫奇

名誉副主编 甄华 陈宝兴 蒋位庄

副 主 编 孟 和 孙树椿 董福慧

编辑委员 (以姓氏笔划为序)

甄华	建忠	王志彬	王和鸣	王坤正	王胜利	韦贵康	冯天有
石印玉	石关桐	孙之镐	孙材江	孙树椿	毕大卫	朱云龙	朱惠芳
刘柏龄	李为农	李尔年	李同生	李国衡	杜 宁	陈宝兴	陈渭良
张安祯	张连仁	张德桂	沈志祥	沈冯君	沈 霖	吴林生	苏玉新
孟 和	尚天裕	周 卫	周永生	周 沛	周福贻	房世源	胡兴山
胡荫奇	施 杞	赵文海	顾云伍	袁 浩	涂 丰	诸方受	梁克玉
郭效东	郭艳幸	蒋位庄	董福慧	阙再忠	黎君若		