

· 论著 ·

ICOS 基因转染对 CIK 细胞杀伤胆管癌细胞作用的研究

王坚 何敏 王颖 沙慧芳 冯久贤 施毓谦 陈涛 施维锦

【摘要】 目的 探讨转染可诱导共刺激分子(inducible co-stimulator, ICOS)基因对细胞因子诱导杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞杀伤胆管癌细胞的作用。**方法** 构建含 ICOS 基因的腺病毒载体并转染给 CIK 细胞(CIK-ICOS 细胞组),单纯 CIK 及 CIK-EGFP 细胞为对照组,观察 3 组 CIK 细胞体外增殖与凋亡情况以及对胆管癌细胞的杀伤作用;ELISA 法检测 3 组 CIK 细胞上清液中 IFN- γ 、IL-2 及 TNF- α 的表达。建立胆管癌移植瘤的 SCID 小鼠模型,按随机数字表法将 40 只 SCID 小鼠分为生理盐水对照组、CIK、CIK-EGFP、CIK-ICOS 细胞治疗组,观察转染 ICOS 基因的 CIK 细胞对小鼠胆管癌细胞的杀伤作用。**结果** CIK-ICOS 细胞组体外增殖明显强于 CIK 及 CIK-EGFP 细胞组;培养第 20 天 CIK-ICOS 与 CIK 细胞凋亡率分别为 0.69% 和 2.90%,第 23 天分别为 0.89% 和 4.92%;在不同效靶比 CIK-ICOS 细胞组杀伤效应均显著高于 CIK 与 CIK-EGFP 细胞组($F=13.37, 6.46, 25.51, P<0.05$);CIK-ICOS 细胞组上清液中 IFN- γ 的浓度为 $(49.50 \pm 4.73) \mu\text{g/L}$, 显著高于 CIK 细胞组 $(30.53 \pm 3.73) \mu\text{g/L}$ 及 CIK-EGFP 细胞组 $(30.12 \pm 2.64) \mu\text{g/L}$ ($F=38.89, P<0.05$)。CIK-ICOS 细胞治疗组小鼠肿瘤生长速度明显低于 CIK 与 CIK-EGFP 细胞治疗组,肿瘤坏死面积明显大于 CIK 与 CIK-EGFP 细胞治疗组,瘤内 CIK 细胞数量最多。**结论** CIK 细胞在体内外均具有杀伤胆管癌细胞的作用。转染 ICOS 基因后,CIK 细胞体外存活时间延长、增殖能力增强、IFN- γ 的表达增多,其在体内外抗胆管癌作用明显增强。

【关键词】 胆道肿瘤; 可诱导共刺激分子; 细胞因子诱导杀伤细胞

【中图分类号】 R735.8

【文献标识码】 A

Effects of inducible co-stimulator gene on the cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells against cholangiocarcinoma cells WANG Jian*, HE Min, WANG Yin, SHA Hui-fang, FENG Jiu-xian, SHI Yu-qian, CHEN Tao, SHI Wei-jin. * Department of General Surgery, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of inducible co-stimulator (ICOS) gene on the cytotoxic activity of cytokine-induced killer (CIK) cells against cholangiocarcinoma cells. **Methods** CIK-ICOS cells were obtained by stable transfecting ICOS genes into CIK cells through the adenovirus vector whereas untransfected and EGFP-transfected CIK cells were treated as controls. The proliferation and apoptosis of different CIK cells, as well as their cytotoxicity against cholangiocarcinoma cells in the three groups were detected. The expressions of IFN- γ , IL-2 and TNF- α in the supernatant of different CIK cells were measured by ELISA. SCID mice with cholangiocarcinoma were randomly divided into CIK group, CIK-EGFP group, CIK-ICOS group and normal saline group. The cytotoxic activity of CIK-ICOS cells against cholangiocarcinoma cells *in vivo* was observed. **Results** CIK-ICOS cells displayed better proliferation than CIK cells and CIK-EGFP cells. At day 20 and 23 of culture, the apoptosis rate of CIK-ICOS cells was 0.69% and 0.89%, respectively, while that of the CIK cells was 2.90% and 4.92%. The cytotoxic effect of CIK-ICOS cells at different E:T ratio against cholangiocarcinoma cells was significantly stronger than that of CIK cells and CIK-EGFP cells ($F=13.37, 6.46, 25.51, P<0.05$). The concentration of IFN- γ in CIK-ICOS cultured supernatant was $(49.50 \pm 4.73) \mu\text{g/L}$, which was significantly higher than that in the cultured supernatant of CIK cells [$(30.53 \pm 3.73) \mu\text{g/L}$] and CIK-EGFP cells [$(30.12 \pm 2.64) \mu\text{g/L}$] ($F=38.89, P<0.05$). The growth of cholangiocarcinoma was significantly slower in CIK-ICOS group than that in CIK group and CIK-EGFP group, whereas the necrosis area of tumor was larger and the CIK cells in CIK-ICOS group was more than those in the other two groups. **Conclusions** CIK cells had the function of killing cholangio-

基金项目: 上海交通大学医学院自然科学基金资助项目(04XJ21018)

作者单位: 200127 上海交通大学医学院附属仁济医院普外科(王坚、何敏、施毓谦、陈涛、施维锦); 200025 上海交通大学医学院免疫研究所(王颖); 200030 上海交通大学医学院附属胸科医院肺癌研究所(沙慧芳、冯久贤)

carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. After ICOS genes were transfected into CIK cells, the survival time of CIK cells *in vitro* was prolonged and the proliferation of CIK cells was enhanced, as well as the secretion of IFN- γ was increased so that the cytotoxicity of CIK cells against cholangiocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo* was enhanced.

【Key words】 Cholangiocarcinoma; Inducible co-stimulator; Cytokine-induced killer cells

目前肿瘤免疫治疗作为恶性肿瘤的辅助治疗方法,在临床上已逐渐开始应用。细胞因子诱导杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞作为一种新型的过继免疫治疗细胞,能有效地杀灭残留的肿瘤细胞及防止或延迟肿瘤的复发^[1-3]。可诱导共刺激分子(inducible co-stimulator, ICOS)主要在活化或记忆 T 细胞表面表达,能促进活化的 T 细胞增殖、增加细胞因子的分泌及提高 T 细胞抗肿瘤活性^[4-6]。本研究通过细胞与动物实验,探讨 CIK 细胞在抗胆管癌方面的作用;将 ICOS 基因转染给 CIK 细胞,探讨 ICOS 基因对 CIK 细胞的增殖、细胞因子的分泌以及对胆管癌细胞杀伤作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ICOS 的一抗及二抗分别购自美国 Biolegend 公司及 Kirkegaard & Perry Laboratories 公司;细胞因子 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α 的 ELISA 试剂盒购自上海元象医疗器械有限公司;凋亡试剂盒 Annexin V-FITC Kit 购自奥地利 Bender Medsystems 公司。CIK 细胞由上海胸科医院惠赠;人胆管癌细胞株 QBC₉₃₉ 由上海同济大学生命科学院提供。40 只雌性 SCID 小鼠,体质量(25 $\pm$ 5)g,由上海市肿瘤细胞研究所提供。

1.2 ICOS 基因病毒上清液的制备

RT-PCR 获得 ICOS 基因的 cDNA,分别以 5'-TGTGAAGATCTTGACCAATG-3' 及 5'-GCTCTATACTGCAAATGCTA-3' 作为上游及下游引物进行 PCR 扩增,多种酶切酶及连接酶作用后获得质粒 pSG502- Δ CR2-ICOS,与含有 5 型腺病毒右臂的质粒 PBH-GE3 通过 Lipofectamine 2000 共转染至 293 细胞,经超速离心后裂解 293 细胞,获得含 ICOS 基因的病毒上清液,含荧光蛋白的 EGFP 基因作为对照基因。

1.3 ICOS 基因的转染及鉴定

ICOS 基因的病毒上清液与 CIK 细胞在无血清的 RPMI 1640 培养液中共同培养 2 h(病毒滴度为 1.14×10^{13} /L)进行转染,培养环境 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 的 CO₂ 培养箱,离心弃去上清液,获得含 ICOS 基因的 CIK 细胞作为 CIK-ICOS 细胞组,单纯 CIK 细胞和 CIK-EGFP 细胞作为对照组。将含不同基因的 CIK 细胞分别与 ICOS 基因的一抗及二抗混合后,行二

氨基联苯胺染色,观察胞质及胞核的染色情况。用 1 ml Trizol 抽提获得 CIK-ICOS 细胞总 RNA,取 1.0 μl mRNA 加入 10 mmol/L dNTP 5.0 μl , Oligo(dT) 5.0 μg 等进行 RT-PCR。

1.4 CIK 细胞凋亡检测

培养第 20 天用流式细胞仪检测 CIK 细胞的凋亡情况,每组 CIK 细胞数为 5×10^5 个。

1.5 细胞毒作用检测

以 CIK-ICOS、CIK-EGFP 及 CIK 细胞作为效应细胞,以胆管癌细胞作为靶细胞,在效靶比分别为 20:1、10:1、5:1 时,用 MTT 法测定细胞毒作用^[7]。公式:细胞杀伤活性 = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{效应细胞 OD 值}) / \text{靶细胞 OD 值}] \times 100\%$,实验组 OD 值为靶细胞与效应细胞共同培养值。

1.6 CIK 细胞分泌细胞因子检测

3 组 CIK 细胞培养 3 d,提取上清液,用 ELISA 试剂盒检测 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 3 种细胞因子的浓度。

1.7 动物实验

40 只 SCID 小鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组、CIK、CIK-EGFP 及 CIK-ICOS 细胞治疗组,每组 10 只。每只以 3×10^6 个胆管癌细胞皮下致瘤。致瘤后第 7 天注射 2 ml 经 DIL 荧光标记的不同 CIK 细胞(细胞浓度为 1×10^6 /ml),隔天观察肿瘤的生长变化,9 d 后取出移植瘤。用荧光显微镜观察瘤内 CIK 细胞的存活情况,病理检查观测肿瘤细胞的坏死情况,比较治疗前后肿瘤大小的变化(肿瘤体积 = $1/2a \times b^2$, a 为肿瘤长径, b 为肿瘤宽径)。

1.8 统计学分析

应用 SAS 6.12 统计软件对所得数据进行单因素方差分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICOS 基因的表达

CIK-ICOS 细胞组的胞核、胞质及胞膜均呈现明显棕色(图 1a), CIK-EGFP 细胞组则显示为蓝色(图 1b)。这提示 CIK-ICOS 细胞中检测到 ICOS 基因蛋白的表达。PCR 显示 600 bp 条带,与设计合成 ICOS 基因时的条带一致(图 1c)。

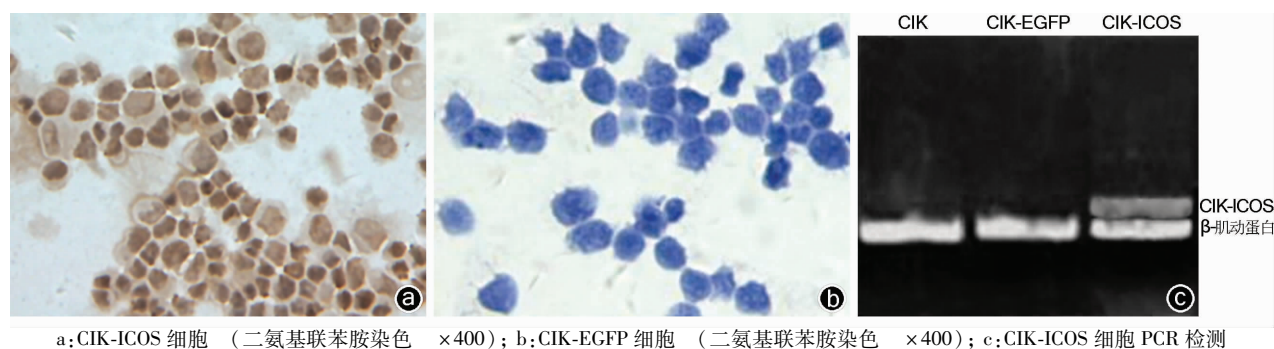


图 1 可诱导共刺激分子基因的表达

2.2 CIK 细胞体外增殖及凋亡

从培养第 4 天起, CIK-ICOS 细胞组的体外增殖数量为 1.15×10^6 , 明显多于 CIK 细胞组 (0.98×10^6) 和 CIK-EGFP 细胞组 (1.01×10^6)。培养第 20 天, CIK 与 CIK-ICOS 细胞组的凋亡率分别为 2.90% 和 0.69%, 第 23 天两组分别为 4.92% 和 0.89%。

2.3 CIK 细胞体外杀伤胆管癌细胞的作用

在不同的效靶比, CIK-ICOS 细胞组杀伤活性均显著高于其余两组(表 1)。

表 1 3 组 CIK 细胞在不同效靶比胆管癌细胞的杀伤活性 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	5:1	10:1	20:1
CIK 细胞组	32.60 ± 2.15	37.10 ± 2.18	40.90 ± 4.82
CIK-EGFP 细胞组	33.10 ± 2.65	36.80 ± 1.03	41.20 ± 1.75
CIK-ICOS 细胞组	39.60 ± 2.98^{ab}	41.40 ± 3.55^{ab}	54.10 ± 3.71^{ab}
F 值	13.37	6.46	25.51
P 值	<0.05	<0.05	<0.05

a: $P < 0.05$, 与 CIK 细胞组比较; b: $P < 0.05$, 与 CIK-EGFP 细胞组比较

2.4 CIK 细胞分泌的细胞因子表达

CIK-ICOS 细胞组上清液中 IFN- γ 的表达量为 (49.50 ± 4.73) $\mu\text{g/L}$, 显著高于其余两组; IL-2 及 TNF- α 的表达 3 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组 CIK 细胞分泌的细胞因子表达 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	IFN- γ	IL-2	TNF- α
CIK 细胞组	30.53 ± 3.73	40.25 ± 3.89	33.26 ± 2.75
CIK-EGFP 细胞组	30.12 ± 2.64	42.18 ± 4.16	34.35 ± 3.53
CIK-ICOS 细胞组	49.50 ± 4.73^{ab}	41.56 ± 4.02	32.18 ± 3.26
F 值	38.89	0.61	1.03
P 值	<0.05	>0.05	>0.05

a: $P < 0.05$ 与 CIK 细胞组比较; b: $P < 0.05$, 与 CIK-EGFP 细胞组比较

2.5 小鼠移植瘤模型观察 CIK 细胞的抗肿瘤作用

3 组 CIK 细胞治疗组的肿瘤生长速度显著低于生理盐水对照组 ($P < 0.05$); CIK-ICOS 细胞治疗组肿瘤生长速度显著低于其余两组 ($P < 0.05$)。见表 3。

CIK-ICOS 细胞治疗组瘤体内带荧光的 CIK 细胞数量明显多于其余两组(图 2)。病理检查发现, CIK-ICOS 细胞治疗组胆管癌移植瘤坏死面积最大(图 3)。

表 3 小鼠移植瘤模型 CIK 细胞组抑制胆管癌细胞生长情况 ($\bar{x} \pm s, \text{cm}^3$)

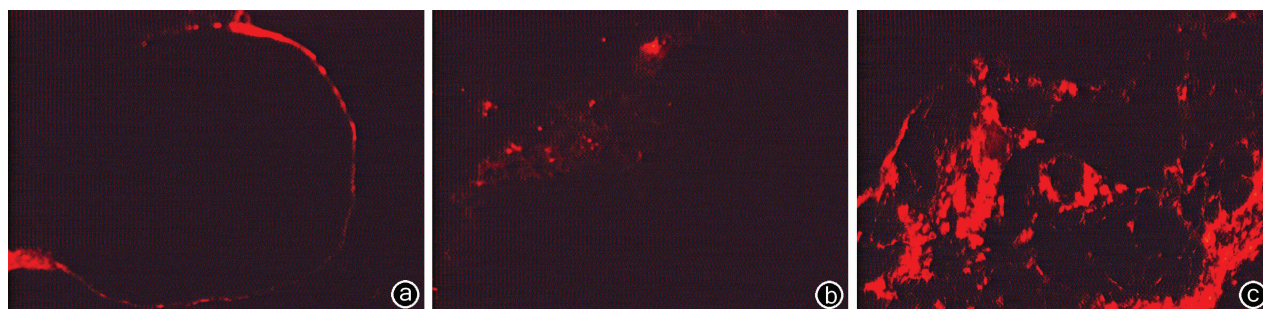
组别	肿瘤体积
生理盐水对照组	2.127 ± 0.680
CIK 细胞治疗组	0.143 ± 0.141^a
CIK-EGFP 细胞治疗组	0.135 ± 0.133^a
CIK-ICOS 细胞治疗组	0.007 ± 0.002^{ab}
F 值	57.69
P 值	<0.05

a: $P < 0.05$, 与生理盐水对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 CIK 及 CIK-EGFP 细胞治疗组比较

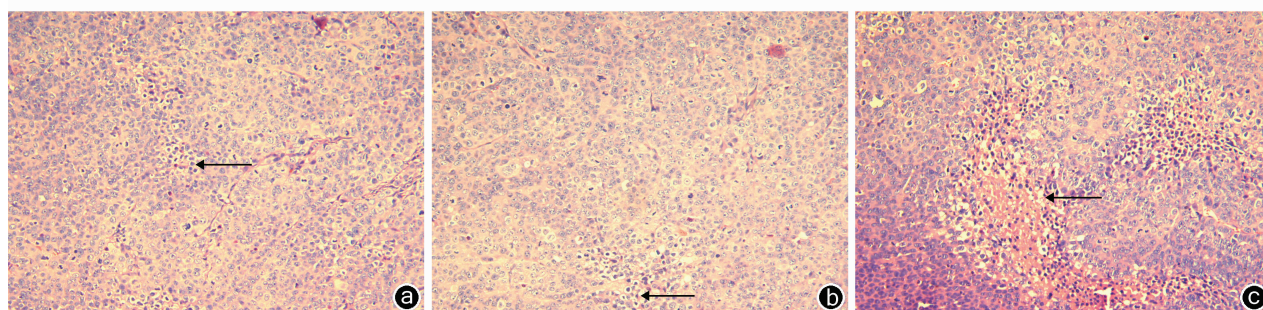
3 讨论

3.1 CIK 细胞对胆管癌细胞的杀伤作用

淋巴因子活化性杀伤细胞、肿瘤浸润淋巴细胞及 CIK 细胞等在延长晚期肿瘤患者生存期及提高生活质量有一定的作用^[8-10]。CIK 细胞因其增殖能力强、杀瘤活性高、体外获取便捷、对患者无明显毒副作用等特点, 被认为是免疫效应最强的过继免疫治疗细胞。Zhang 等^[11]报道用 CIK 细胞联合树突状细胞治疗肺癌转移灶能明显抑制肿瘤的生长。Leembuis 等^[12]报道 CIK 细胞在治疗复发性霍奇金及非霍奇金淋巴瘤有很强作用。本研究通过离体细胞与移植瘤模型实验均证实 CIK 细胞能有效杀伤胆管癌细胞。CIK 细胞杀伤肿瘤细胞的机制主要是通过细胞间直接接触、分泌穿孔素对肿瘤细胞直



a:CIK 细胞治疗组; b:CIK-EGFP 细胞治疗组; c:CIK-ICOS 细胞治疗组
图 2 不同治疗组荧光观察结果(红色荧光代表瘤体内 CIK 细胞 ×100)



a:CIK 细胞治疗组; b:CIK-EGFP 细胞治疗组; c:CIK-ICOS 细胞治疗组
图 3 不同治疗组病理检查结果(←表示坏死区域) (苏木精-伊红染色 ×100)

接杀伤及通过表达 FasL 与肿瘤细胞表面的 Fas 结合,诱导肿瘤细胞凋亡。另外,CIK 细胞还能通过分泌 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 等来进一步促进 CIK 细胞的增殖,上调主要组织相容性复合物 I、II 类分子的表达以刺激自身免疫应答,并通过诱导多种凋亡相关因子促进肿瘤细胞的凋亡。本研究发现在 3 组 CIK 细胞上清液中均能测量到 IL-2、TNF- α 及 IFN- γ 等细胞因子,与文献报道一致^[13]。但 CIK 细胞存在体外存活时间有限的缺点。因此,能否延长 CIK 细胞的存活时间,延缓凋亡进程对提高其临床应用有重要意义。

3.2 ICOS 的共刺激作用

ICOS 作为共刺激分子家族的成员,在 T 细胞的增殖、活化及增强其免疫效应方面具有重要意义。在 T 细胞激活的早期,主要通过 CD28/B7 产生共刺激作用为其提供第二信号,而随着 CD28 的负反馈抑制因子 CTLA-4 表达增多,其作用被竞争性抑制,此时若缺乏共刺激作用,则 T 细胞逐渐凋亡或处于无功能状态,其免疫效应也随之降低。ICOS 由于与 CTLA-4 配体不同,故不会受其负反馈抑制。在 CD28 的共刺激作用受抑制后继续刺激 T 细胞增殖,调节细胞因子分泌,并启动后阶段的免疫反应,在 T 细

胞的后续活化中发挥重要作用。

3.3 ICOS 对增强 CIK 细胞免疫杀伤效应的作用

本研究发现 ICOS 基因转染至 CIK 细胞后,在 CIK 细胞的胞核、胞质与胞膜上均有 ICOS 的表达。这与 ICOS 基因转染初期存在过表达有关。随着时间的推移,其表达主要集中在细胞膜而发挥作用。我们发现转染 ICOS 基因后,CIK 细胞体外增殖能力明显增强。细胞凋亡减少,同时在离体细胞与移植瘤模型中转染 ICOS 基因后,CIK 细胞杀伤胆管癌细胞的免疫效应也得到明显增强。这与 ICOS 发挥共刺激作用有关。ICOS 的共刺激作用与 PI3K/Akt 及 ERK 两条信号转导途径有关。通过与抗原递呈细胞表面的配体结合后,上述信号通路被激活,T 细胞增殖能力增强。同时,通过抑制下游多个凋亡基因,抑制活化的 T 细胞凋亡。另外,上述两种信号转导通路的活化,还能促进多种细胞因子如 IL-10、IFN- γ 等的表达^[14]。本研究发现转染 ICOS 基因后的 CIK 细胞表达 IFN- γ 的量显著高于其余两组。而 IFN- γ 不仅可以直接抑制肿瘤细胞生长,还可以通过提高 CIK 细胞的免疫活性来增强其抗肿瘤细胞的作用。这证实了 ICOS 基因在增强 CIK 细胞抗胆管癌细胞作用中的重要意义。

参考文献

- [1] Kim HM, Lim J, Park SK, et al. Antitumor activity of cytokine-induced killer cells against human lung cancer. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(13): 1802-1807.
- [2] 周启明, 吴沛宏, 赵明, 等. 原发性肝癌经综合微创治疗后联合细胞因子诱导杀伤细胞灌注的近期疗效观察. *癌症*, 2006, 25(11): 1414-1418.
- [3] 杨新静, 黄建安, 雷伟, 等. 共培养的树突细胞和 CIK 细胞对肺癌的体内外抑癌作用. *癌症*, 2006, 25(11): 1329-1333.
- [4] Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, et al. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells. *Eur J Immunol*, 2007, 37(7): 1796-1808.
- [5] Wilson EH, Zaph C, Mohrs M, et al. B7RP-1-ICOS interactions are required for Opti-m1 infection induced expansion of CD4 + Th1 and Th2 responses. *J Immunol*, 2006, 177(4): 2365-2372.
- [6] Mesturini R, Nicola S, Chiochetti A, et al. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4 + T cells. *Eur J Immunol*, 2006, 36(10): 2601-2612.
- [7] 应学翔, 邹强, 徐永华, 等. 负载 Her-2 多肽的 DCIK 细胞对乳腺癌细胞杀伤作用研究. *分子细胞生物学报*, 2007, 40(4): 193-198.
- [8] Chan JK, Hamilton CA, Cheung MK, et al. Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: A preclinical study. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(6): 1859-1867.
- [9] Savas B, Kerr PE, Pross HF. Lymphokine-activated killer cell susceptibility and adhesion molecule expression multidrug resistant breast carcinoma. *Cancer Cell Int*, 2006, 6: 24.
- [10] Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Anna Surg*, 2006, 244(6): 986-992.
- [11] Zhang S, Jiang SJ, Zhang CQ, et al. Antitumor activities of cytokine-induced killer cells and dendritic cells in vitro and in vivo. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(15): 1308-1312.
- [12] Leembuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(3): 181-187.
- [13] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(6): 1345-1353.
- [14] Akbari O, Stock P, Meyer EH, et al. ICOS/ICOSL interaction is required for CD4 + invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J Immunol*, 2008, 180(8): 5448-5456.

(收稿日期: 2008-03-14)

(本文编辑: 陈敏)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊读者问卷调查获奖名单

为了进一步提高杂志的学术质量,更好地为读者服务。《中华消化外科杂志》读者问卷调查表从 2008 年 1 月 18 日通过邮寄、E-mail 等形式开始发放,截至 2008 年 3 月 26 日,共收回读者问卷调查表 1935 份。我们采取公开、公正的方式,从中抽取了 112 名读者进行奖励。现将获奖读者名单公布如下。奖品将于近期寄出。衷心感谢广大读者的大力支持和积极参与!

北京市	曹克宁	张珂	李强	杨光	侯文英	王亚军	焦华波	初向阳	李坪	上海市	沈英皓	沈志勇
	崔龙	陈大伟	陈晓军	赵登秋	胡贵辰	廖范丰	天津市	邓靖宇	重庆市	戚跃勇	李琼	何渝军
	邓晓艳	杨驰	文灿	孙刚	龚建平	庞勇	江苏省	李俊生	嵇武	高健	陶国全	于仁
	李德春	李瑞红	徐庆祥	唐理	葛恒发	山东省	朱金明	刘利东	崔艺	栗洪升	江四锋	龙厚勇
	王玲君	李鹏	湖北省	何凡	曾少波	董朝富	谢涛	菅志远	张敏	杨盛力	刘利平	胡绪凌
	杨爱国	周彦明	涂小煌	邱明链	林科灿	李灵	李仲	朱代全	四川省	黎冬暄	张光全	张林
	陈安平	肖仕明	姜淮芜	吴宸	广东省	赵晓雷	梁启廉	邱奕雁	陈晓东	吕会增	龚瑾	李玺
	杨波	张雪峰	卜献民	孟强	鹿晓理	凌光烈	山西省	刘立新	张骞骞	郭晓红	王英斌	浙江省
	金平	陆贝	安徽省	茆家定	韩文秀	孙登群	湖南省	陈晚平	邓宏军	何建军	云南省	樊献军
	耿协强	陕西省	张谓丰	郑鑫	河南省	朱长举	王涛	甘肃省	李斌	吉林省	孙立波	江西省
	广西壮族自治区	陈右江	内蒙古自治区	乔建梁	新疆维吾尔自治区	周黎黎						