

·技术研究·

中国人视神经脊髓炎疾病谱 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体检测方法学的比较

孙巧松, 刘俊秀, 丰岩清*, 国 宁, 陈 曦, 赖 蓉, 黄 帆
(中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】建立 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体检测的间接免疫荧光法(IIF), 细胞分析法(CBA)和荧光免疫沉淀法(FIPA)法; 研究并比较不同的检测方法对中国人群 NMO 疾病谱的检测效率。【方法】建立 3 种检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体的方法, 包括 IIF、CBA 和 FIPA。应用盲法检测病人血清 106 例, 其中视神经脊髓炎(NMO)组 24 例, 纵形扩展性脊髓炎(LETM)组 22 例, 多发性硬化(MS)组 30 例, 健康对照(HC)组 30 例; 对其检测的阳性率进行分析。【结果】通过 3 种方法检测, 发现 NMO 组 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体阳性率分别为 IIF (62.5%, 15/24), CBA (91.7%, 22/24) 及 FIPA (75.0%, 18/22), LETM 组为 IIF (59.1%, 13/22), CBA (86.4%, 19/22) 及 FIPA (72.3%, 16/22), MS 组 IIF、CBA 及 FIPA 均为 (3.3%, 1/30)。正常对照组未见该抗体阳性表达。NMO 组及 LETM 组血清 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体阳性率明显高于 MS 和健康对照组。【结论】在中国人群 NMO 疾病谱患者中, IIF、CBA 和 FIPA 的检测效率基本和美欧报道一致。IIF 是该抗体检测的基础方法; CBA 法看起来最为敏感; FIPA 检测可以量化该抗体, 可用于临床高通量大样品筛查。

关键词: 视神经脊髓炎; NMO-IgG; 抗水通道蛋白 4 抗体; 荧光免疫沉淀; 细胞法; 间接免疫荧光法

中图分类号: R744.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3544(2010)06-0872-06

Comparison Study on Anti-aquaporin 4 Antibodies Detection by Different Techniques in Chinese Neuromyelitis Optica Spectrum

SUN Qiao-song, LIU Jun-xiu, FENG Yan-qing*, GUO Ning, CHEN Xi, LAI Rong, HUANG Fan
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To compare the performance of different assays (indirect immunofluorescence, cell-based assay, fluoroimmunoprecipitation assay) to detect anti-AQP4 antibodies in Chinese patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. 【Methods】Three assays have been set to detect anti-AQP4 antibodies, including Indirect immunofluorescence (IIF) assay with a composite substrate of mouse tissues, AQP4-transfected cell-based assay (CBA), and a fluoroimmunoprecipitation assay (FIPA). These assays were used in parallel to test seropositivity of masked serum samples from patients with neuromyelitis optica (NMO, 24), longitudinally extensive transverse myelitis (LETM, 22), multiple sclerosis (MS, 30) and healthy controls (HC, 30). 【Results】NMO-IgG, based on the conventional NMO-IgG assay by IIF, was detected in 15 of 24 (62.5%) in NMO. Antibodies against aquaporin-4 (AQP4-Ab) were found in 22 of 24 NMO patients (91.7%) by using CBA, in 18 of 22 (75.0%) by using FIPA. Seroprevalence in LETM patients were 13/22 (59.1%) by IIF, 19/22 (86.4%) by CBA, 16/22 (72.3%) by FIPA separately. MS patients were 1/30 (3.3%) by three methods, while any of HC patient was positive. 【Conclusions】The frequency of NMO-IgG/anti-AQP4 antibodies detected by IIF, CBA and FIPA among Chinese patients with NMO spectrum disorders had similar performance with western published literature. IIF assay for NMO-IgG allows the detection of antibodies in routine screening, but the CBA for AQP4 antibodies seems the most sensitive, and FIPA is suitable for high-throughput test for identifying positive sera and for serial estimations of antibody levels.

Key words: neuromyelitis optica; anti-AQP4 antibody; NMO-IgG; indirect immunofluorescence assay; Cell-based assay; immunoprecipitation assay

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(6): 872-877]

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 广东省自然科学基金(2004B33801006); 广东省医学科研基金(B2009056)

作者简介: 孙巧松, 硕士, 研究方向: 神经免疫学, E-mail: dsunsong@126.com; * 通信作者: 丰岩清, 副教授, 硕士生导师, E-mail: fyqgz@sohu.com

视神经脊髓炎(neuromyelitis optica, NMO), 又称 Devic 综合征, 是一种中枢神经系统炎症脱髓鞘疾病, 常同时或先后累及视神经和脊髓, 临床表现以视神经炎和横贯性脊髓炎为特征^[1]。2004 年 Lennon 等^[2]使用间接免疫荧光方法(indirect immunofluorescence, IIF)在 NMO 患者的血清中发现了一种和小鼠小脑、中脑组织选择性结合的自身抗体, 称为 NMO-IgG。当前认为该抗体是诊断 NMO 特异性的血清学标记, 因此 2006 年, Wingerchuk 等^[3]将该抗体血清阳性列入 NMO 修订的诊断标准中。后来的研究证实, NMO-IgG 特异性结合到水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4), 因此也称为 anti-AQP4 抗体^[4]。目前国内仅有使用 IIF 及细胞分析法(Cell-based assay, CBA)检测该抗体的报道, 未对抗体滴度进行检测; 国内也无使用荧光免疫沉淀法(fluorescence-based immunoprecipitation assay, FIPA)进行该抗体检测的报道。本研究通过建立 3 种检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体的方法(IIF、CBA、FIPA), 首次对中国人群视神经脊髓炎疾病谱中该抗体的检测行方法学的比较。

1 材料与方法

1.1 患者来源

我们检测了 106 例临床确诊病人的血清, 患者来自 2009 年 1 月至 2010 年 4 月中山大学附属第一医院神经内科住院及门诊患者, 其中视神经脊髓炎 24 例, 纵形扩展性脊髓炎 22 例, 多发性硬化 30 例。同时选取健康对照 30 例。纳入标准: NMO 的诊断符合 2006 年 Wingerchuk 的诊断标准^[3](除外 NMO-IgG 阳性); LETM 病人不符合 NMO 诊断标准, 脊髓磁共振显示至少有三个阶段的连续的信号异常; MS 的临床诊断标准符合 McDonald 的标准^[5](其中原发进展型 5 例, 复发缓解型 19 例, 继发进展型 6 例)。

1.2 主要材料与试剂

雌性 6 ~ 8 周的 C57BL/6 小鼠, 体质量 16 ~ 20 g, 由中山大学动物实验中心提供。手术切除的成人脑膜瘤患者的小脑组织, 由中山大学附属第一医院神经外科提供。pEGFP 质粒、HEK293 细胞为本实验室保存; 总 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司; cDNA 合成试剂盒、Pfu DNA 聚合酶购自 Takara 公司; G418、Lipofectamine 2000 试剂盒购

自 Invitrogen 公司; DMEM、胎牛血清、2.5 g/L 胰蛋白酶、Opti-MEM 培养液购于 Gibco 公司; 兔抗人 AQP4 多克隆抗体、CY3 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗人 IgG 均购自 Sigma 公司; Protein G Agarose 购于 Pierce 公司。

1.3 方 法

1.3.1 间接免疫荧光法(IIF)检测 NMO-IgG 应用 Lennon 等^[4]的方法进行 NMO-IgG 的检测。取 C57 成年小鼠, 水合氯醛腹腔注射麻醉, 生理盐水灌注, 快速取脑, OCT 包埋, 投入液氮速冻。冰冻切片机切片, 厚度约 10 μm , 冷丙酮固定, 山羊血清封闭 30 min。为消除非特异染色, 应用小鼠肝粉(1:60)预处理, 加入血清(1:60)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗片, 加荧光素标记抗体 FITC 羊抗人 IgG(1:100)。PBS 漂洗后, 荧光显微镜下观察。分别设立阳性和阴性对照。阳性标本二倍倍比稀释进行梯度滴度检测。为进一步确定阳性标记物是 AQP4-Ab, 本实验采用抗体双标验证的方法。大体步骤: 冰冻切片固定后, 加入血清过夜, 洗涤后加兔抗人 AQP4 多克隆抗体(1:200), 室温 2 h, 加二抗 FITC 标记山羊抗人 IgG(1:100)及 CY3 标记的羊抗兔 IgG(1:100)室温孵育 1 h, 洗涤后荧光显微镜下观察。

1.3.2 细胞分析法(CBA)检测 AQP4 抗体 参照 Matsuoka 等^[6]的方法检测血清中 AQP4-Ab。应用总 RNA 提取试剂盒从人小脑组织中提取总 RNA, RT-PCR 逆转录合成 cDNA 第一链。AQP4 分 M1 和 M23 两个亚型, 分别设计引物进行 PCR 扩增。引物分别为: 上游 M1 5'-CTAGCTAGCATGAGTGA CAGACCCACAG-3', M23 亚型的为 5'-CTAGCTA GCATGGTGGCTTTCAAAGGGGTC-3'。下游引物: 5'-GAAGATCTTACTGAAGACAATACCTCT-3'。扩增产物 M1 和 M23 分别克隆到 pEGFP-N3 上, 构建 pEGFP-N3-AQP4 重组质粒, 双酶切和基因测序鉴定。转染 HEK293 细胞, G418 筛选稳定表达 AQP4 的细胞株。培养表达 AQP4 的 EGFP-AQP4/HEK293 细胞及空转 EGFP/HEK293 细胞。24 h 后, 中性甲醛固定细胞 5 min, PBS 漂洗; 山羊血清室温封闭 1 h; 加入血清(1:60), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 加入 CY3 标记的羊抗人 IgG(1:100), 室温 1 h, PBS 漂洗, 荧光显微镜下观察。

1.3.3 荧光蛋白免疫沉淀法(FIPA)检测 AQP4 抗体 参照 Waters 等^[14]的方法, 收集上述稳定表达 EGFP-AQP4 蛋白的 HEK293 细胞, 去除细胞培养

液,用冷 PBS 洗涤干净,往细胞沉淀(约含 1×10^7 细胞)中加入 1 mL 细胞裂解液(10 mmol/L TRIS, 100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,1% Triton X-100,pH 7.5,新鲜加入蛋白酶抑制剂),4 ℃ 1 h;细胞裂解混合物加入 1.5 mL 离心管 15 682 $\times g$,4 ℃ 6 min,上清转移到新离心管中。血清样品 20 μ L 加入 200 μ L 细胞裂解液,4 ℃ 过夜;往血清细胞裂解液加入 Protein G 50 μ L,室温摇动 2 h;2 320 $\times g$ 离心 1 min,使琼脂珠沉淀,去上清。往沉淀物加裂解液 1 mL,振荡混匀,2 320 $\times g$ 离心 1 min,去上清,此步骤重复 3 次洗净,每次 5 min;120 μ L 裂解液重悬 IP 复合物,加入 96 孔荧光读数板中,酶标仪检测。Excitation 光设为 472 nm, Emission 光设为 512 nm。

1.4 统计分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。血清阳性率的比较采用 Fisher 精确检验,各组之间抗体滴度的比较采用 Mann-Whitney 秩和检验。 $P \leq 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 间接免疫荧光法

通过检测发现 NMO-IgG 在 24 例 NMO 中 15 例阳性(62.5%),22 例 LETM 中 13 例阳性(59.1%),30 例 MS 中 1 例阳性 (3.3%),30 例 HC 未检测到 NMO-IgG(表 1)。免疫双标证实 NMO-IgG 同 AQP4 在微血管上分布一致,重合良好(图 1)。应用倍比稀释法对各组病人血清 NMO-IgG 抗体滴度分布(图 2)。各组之间抗体滴度的比较采用 Mann-Whitney 秩和检验,NMO 组和 LETM 组抗体滴度比较 $P = 0.269$,差异无统计学意义。

2.2 细胞法

以稳定表达 AQP4 的 EGFP-AQP4/HEK293 细胞为底物检测血清中是否存在 AQP4-Ab。蓝光(420 ~ 490 nm)激发下,GFP 呈绿色,明显定位于细胞膜区域;而空转 EGFP/HEK293 细胞内 EGFP 充满整个细胞。应用 CY3 标记人 IgG,在绿光(535 ~ 550 nm)激发下,间接免疫荧光法检测。当存在阳性 AQP4 抗体时,Cy3 标记二抗呈红色;重合的图片显示,GFP 和 AQP4 表达的位置一致并都位于细胞膜处,重合后呈黄色(图 3)。应用该方法检测结果显示 24 例 NMO 中 22 例阳性(91.7%),

表 1 三种方法检测血清中 NMO-IgG/anti-AQP4 antibody

Table 1 Frequency of the NMO-IgG/anti-AQP4 antibody in serum detected by 3 methods
Frequency (%)

	NMO spectrum disorders		Controls	
	NMO	LEMT	MS	HC
N	24	22	30	30
NMO-IgG(IHC)	15/24(62.5)	13/22(59.1)	1/30(3.3)	0
AQP4-Ab(CBA)	22/24(91.7)	19/22(86.4)	1/30(3.3)	0
AQP4-Ab(FIPA)	18/24(75.0)	16/22(72.3)	1/30(3.3)	0

NMO: neuromyelitis optica; LETM: longitudinally extensive transversemyelitis; MS: multiple sclerosis; HC: healthy controls; IHC: immunohistochemistry; CBA: cell based assay; FIPA: fluoroimmunoprecipitation assay

22 例 LETM 中 19 例阳性(86.4%),30 例 MS 中 1 例阳性(3.3%),30 例 HC 未检测到 AQP4 抗体(表 1)。视神经脊髓炎组阳性率同组织法采用 Fisher 精确检验比较, $P = 0.036$,差异有统计学意义,由此推断细胞法检测血清中 NMO-IgG/AQP4 抗体的敏感性高于组织法。

2.3 免疫沉淀物镜下观察结果及读数

将与免疫复合物结合后的 Protein G 琼脂珠沉淀物置于倒置荧光显微镜下观察,在蓝光(420 ~ 490 nm)激发下,琼脂珠边上结合的 GFP 呈绿色。如图 4 所示:A 为阴性样品,B 及 C 均为 NMO 样品,其中 B 较 C 的亮度强,在荧光酶标仪上显示 B 样品读数高,而细胞法也显示 B 样品的滴度高。本试验证实加入抗体量与相对应的荧光读数成正相关,荧光读数随抗体量增加而增加,而健康对照则无明显增多。表明 FIPA 检测法可以量化 anti-AQP4 抗体。

使用 FIPA 检测各组血清,NMO 组有 18 例为阳性(75.0%),LETM 组有 16 例为阳性(72.7%),MS 组仅有 1 例为阳性(3.3%)。视神经脊髓炎组中采用 Fisher 精确比较荧光免疫沉淀同鼠脑组织法的阳性率, $P = 0.534$;同细胞法比较, $P = 0.245$,均大于 0.05,差异无统计学意义。

3 讨 论

近年来 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体的检测获得了很大进展,目前 AQP4 抗体的检测方法包括:IIF 法、CBA 法、FIPA 法、放射免疫沉淀法(radioimmu-

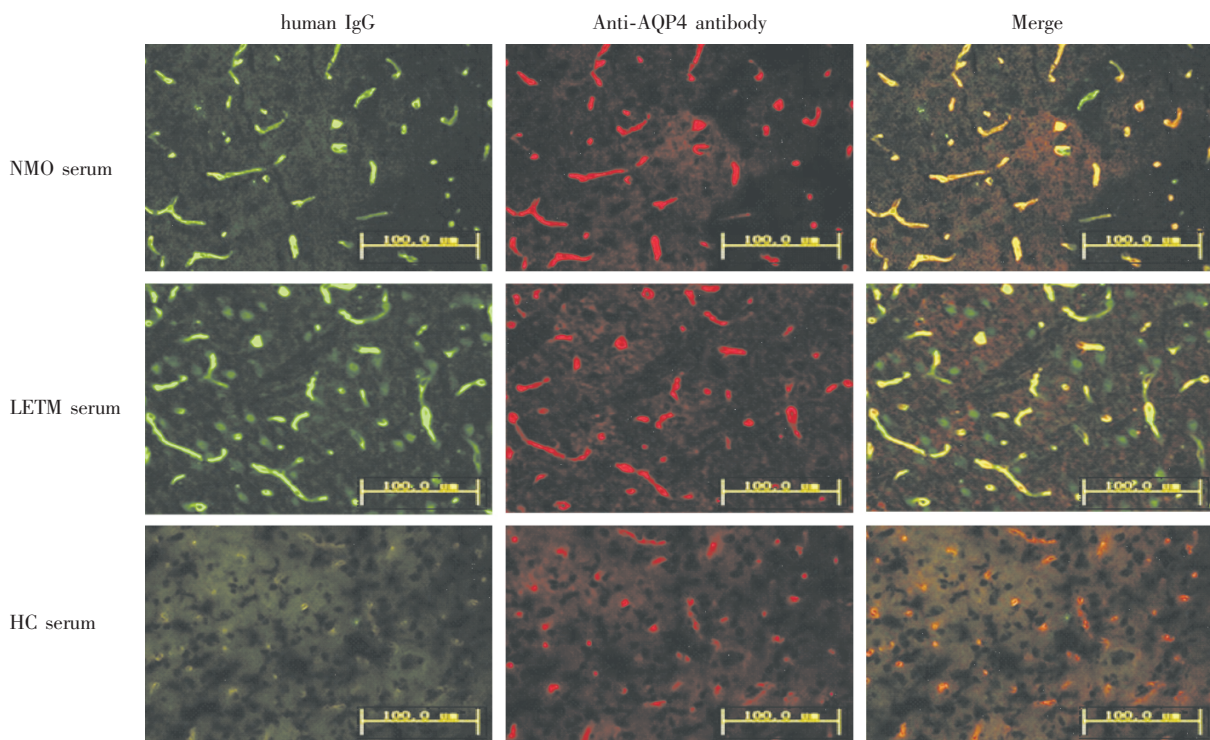


图 1 鼠脑法检测血清中 NMO-IgG

Fig.1 NMO-IgG measured by indirect immunofluorescence based on the mouse brain

The first column showed single-immunofluorescence staining in the serum. The serum of patient with NMO or LETM is positive. The last three columns showed Dual-immunofluorescence staining. FITC (green) labelling human serum IgG, Cy3 (red) labeling anti-AQP4 antibody. NMO-IgG colocalization with AQP4 in merged images (yellow). × 200; NMO; neuromyelitis optica; LETM; longitudinally extensive transverse myelitis; HC; healthy control

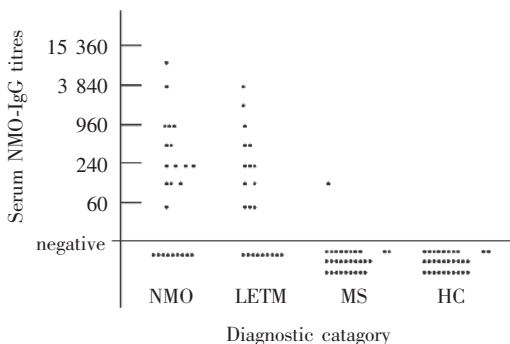


图 2 各组患者血清中 NMO-IgG 滴度分布

Fig.2 The distribution of the serum NMO-IgG titres in each patient group

NMO; neuromyelitis optica; LETM; longitudinally extensive transverse myelitis; MS; multiple sclerosis; HC; healthy control

noprecipitation assay, RIPA)、ELISA 法等, 但各种方法之间的特异性及敏感性仍存在争议, 尚未形成统一标准。IIF 是检测 NMO-IgG 的原始和基础的检测手段, 主要用成年小鼠脑冰冻切片和稀释后的病人血清进行抗原抗体结合反应, 使用荧光素

标记的抗 IgG 标记 NMO-IgG, 通过荧光显微镜进行检测。Lennon 等^[2]应用此方法, 检测 NMO 患者 NMO-IgG 阳性率为 71%, 检测特异性为 91%。后续各国的研究报道此方法检查的敏感性在 19% ~ 76% 之间, 相对于 MS 的特异性为 91% ~ 100%^[2,7-9], 我们使用 IIF 法检测了中国人群 24 例视神经脊髓炎患者血清, 阳性率为 65.4%, 相对 MS 特异性为 96.3%, 与国内外报道基本一致。

CBA 法是通过使用稳定表达人 AQP4 蛋白的细胞作为底物, 进行细胞间接免疫荧光, 来检测 anti-AQP4 抗体。该方法首次由 Takahashi 等^[10]发展, 其对 148 例患者的研究表明 CBA 法诊断 NMO 的敏感度和特异度分别为 91% 和 100%, 该方法的特异性和敏感性均高于鼠脑法, 其他学者的研究也支持这个结论^[11-13], 后来被广泛应用。本研究通过成功构建稳定表达 AQP4 的 HEK293 细胞系检测患者血清中 NMO-IgG 发现国人视神经脊髓炎患者中使用该方法检测的血清阳性率为 92.3%, 血清阳性率在三种方法中最高。其血清阳性率高

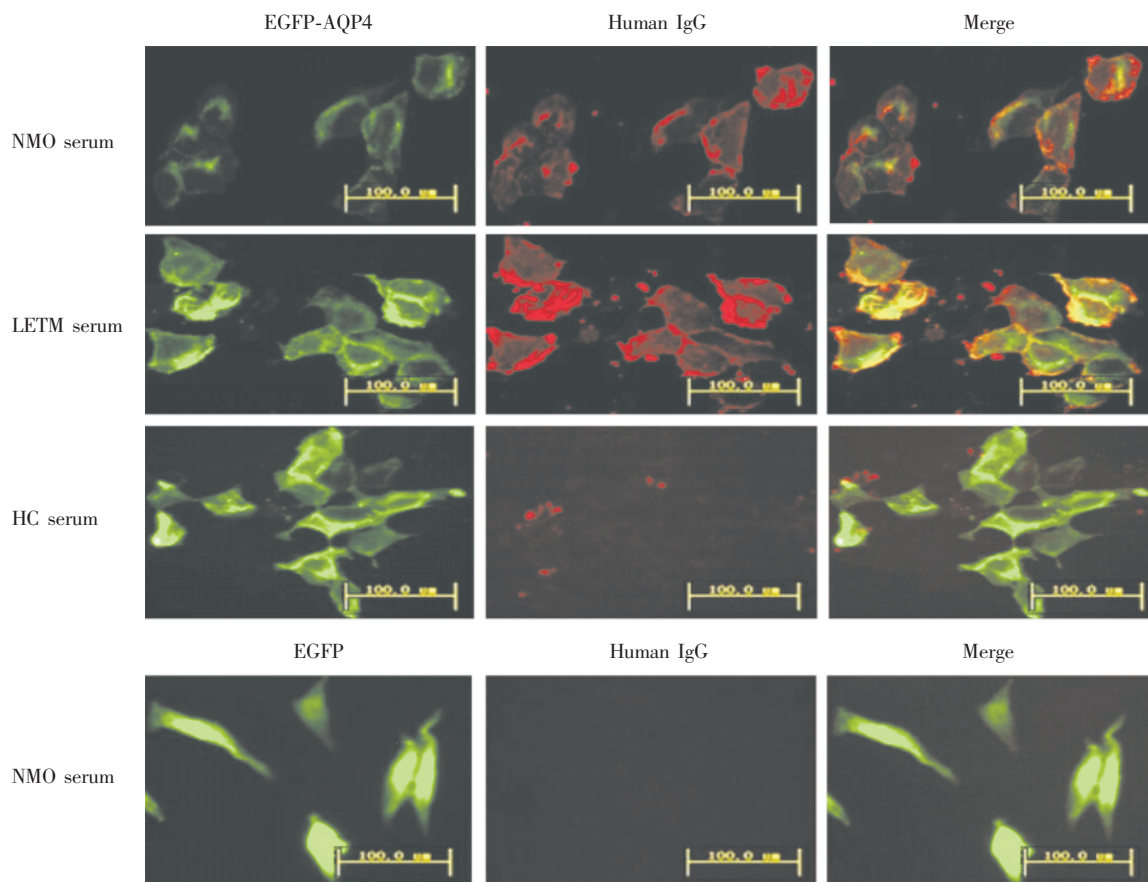


图 3 以细胞为底物检测血清中 AQP4 抗体

Fig.3 Serum anti-AQP4 antibody measured by the cell-based assay

The figure showed that the transfected cells well expressed AQP4 is green in the fluorescent microscope. Cy3 (red) labelling human serum IgG. Overlap staining is yellow in the merged images. If the red fluorescence and the green fluorescence merged well, we judge it positive. × 200; NMO; neuromyelitis optica; LETM; longitudinally extensive transverse myelitis; HC: healthy control

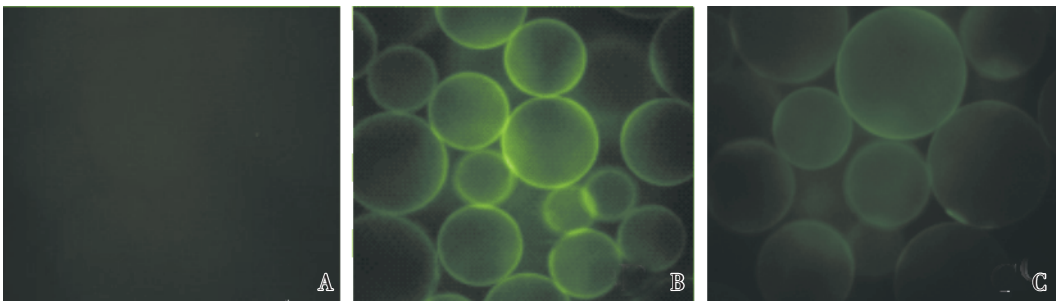


图 4 Protein G 琼脂珠沉淀后荧光镜下图

Fig.4 Protein G Agarose combined the IgG read in the fluorescent microscope.

A: The negative serum; B,C: NMO patient serum; B is brighter than C; × 200

的原因可能在于 CBA 法通过构建稳定表达人 AQP4 的细胞株做为反应底物,消除了种属之间的差异,提高了抗体检测的敏感性。

FIPA 法则首次由 Waters 等^[13]建立,是通过建立可表达 AQP4-EGFP 融合蛋白的 HEK293 细胞,

采集并裂解细胞,得到含有 AQP4-EGFP 融合蛋白的细胞裂解液作为底物,与血清中 anti-AQP4 抗体进行抗原抗体免疫反应,并通过 Protein A/G 琼脂珠把该免疫复合物沉淀下来,进而可通过荧光酶标仪间接把 anti-AQP4 抗体数值量化。Waters 等^[13]

检测了 25 例 NMO 患者,其中 19 例为阳性,其敏感性为 76%,特异性为 100%。但该方法敏感性各国学者报导有差异较大,在 33% ~ 83%^[12-14]。而该研究在中国人群中采用此方法检测 anti-AQP4 抗体,发现 NMO 的血清阳性率为 76.9%,相对 MS 的特异性为 96.6%。

本课题组研究发现,在中国人群中 IIF 法、CBA 法及 FIPA 法检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体显示了良好的一致性,三种方法均可以临床应用检测该抗体。IIF 法仍然是国际上广泛采用的 NMO-IgG 的常规检测方法;CBA 法对同一批血液标本检测的阳性率最高,然而容易受到实验条件的限制;而 FIPA 法相对于前两者,可以量化和批量检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体,且步骤简单,判断不受观察人员的技术和主观判断的影响,适合于高通量大样本临床筛查。三种方法在少数病例检测方面存在不一致现象,本研究中有 1 例 NMO 患者 IIF 法阳性,但 CBA 及 FIPA 法均未能检出。亦出现了 1 例 NMO 患者其 CBA 法显示低滴度,而 FIPA 法读数相对偏高,造成该现象的具体原因尚不清楚。本研究首次在中国人 NMO 疾病谱中应用 IIF、CBA、FIPA 三种方法检测 NMO-IgG/anti-AQP4 抗体,并进行比较,初步结果显示和欧美报道基本一致。然而,应该注意到目前国内外对该抗体的特异性和敏感性的检测方面,主要针对是 NMO、MS 等相关性疾病。已有报道发现其在急性播散性脑脊髓炎、病毒性脑炎、副肿瘤综合征等亦能检测出该抗体。因而仍需要对多种疾病进行大样品检测,进一步验证其特异性。

参考文献:

- [1] Cree BA, Goodin DS, Hauser SL. Neuromyelitis optica [J]. *Semin Neurol*, 2002, 22(2): 105-122.
- [2] Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis [J]. *Lancet*, 2004, 364 (9451): 2106-2112.
- [3] Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica [J]. *Neurology*, 2006, 66(10): 1485-1489.
- [4] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water [J]. *J Exp Med*, 2005, 202(4): 473-477.
- [5] McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis [J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(1): 121-127.
- [6] Matsuoka T, Matsushita T, Kawano Y, et al. Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese [J]. *Brain*, 2007, 130(5): 1206-1223.
- [7] Littleton ET, Jacob A, Boggild M, et al. An audit of the diagnostic usefulness of the NMO-IgG assay for neuromyelitis optica [J]. *Mult Sclerosis*, 2006, 12(1): 156-156.
- [8] Marignier R, De seze J, Vukusic S, et al. NMO-IgG and Devic's neuromyelitis optica: a French experience [J]. *Mult Scler*, 2008, 14(4): 440-445.
- [9] Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R, et al. NMO-IgG in the diagnosis of neuromyelitis optica [J]. *Neurology*, 2007, 68(13): 1076-1077.
- [10] Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, et al. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2006, 210(4): 307-313.
- [11] Fazio R, Malosio ML, Lampasona V, et al. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients [J]. *Mult Scler*, 2009, 15(10): 1153-1163.
- [12] Waters P, Jarius S, Littleton E, et al. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis [J]. *Arch Neurol*, 2008, 65(7): 913-919.
- [13] Waters P, Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays [J]. *Int MS J*, 2008, 15(3): 99-105.
- [14] McKeon A, Fryer JP, Apiwattanakul M, et al. Diagnosis of neuromyelitis spectrum disorders: comparative sensitivities and specificities of immunohistochemical and immunoprecipitation assays [J]. *Arch Neurol*, 2009, 66(9): 1134-1138.

(编辑 刘清海)