

周瑶佳, 涂尊方, 税斐, 等. 温度对锦鲤疱疹病毒体外培养和致病性的影响[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(4): 20-24.

温度对锦鲤疱疹病毒体外培养和致病性的影响

周瑶佳¹, 涂尊方¹, 税斐¹, 阳瑞雪¹, 汪开毓¹, 耿毅¹, 黄小丽², 欧阳萍¹
(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130; 2 四川农业大学 动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要:【目的】证实温度对锦鲤疱疹病毒 CyHV-3 体外增殖和致病性的影响。【方法】选用 CyHV-3-EGFP 病毒株为研究对象, 采用间接免疫荧光染色法测定病毒滴度, 使用荧光显微镜观察病毒体外增殖, 研究病毒的热稳定性、以及温度对病毒的体外培养和体内致病性的影响。【结果】CyHV-3 在 4~36 ℃ 条件下具有很好的稳定性, 温度超过 36 ℃ 后, 病毒活力随着温度升高而降低, 50 ℃ 时病毒活力完全丧失。感染温度对 CyHV-3 病毒活力影响不大, 高温 (37 ℃) 和低温 (4 ℃) 时病毒都具有感染能力。但是, 孵育温度明显影响病毒活力, 温度高于 30 ℃ 时, CyHV-3 的增殖能力减退甚至消失。鲤鱼感染 CyHV-3 病毒后, 低温组 (15 ℃) 的死亡率为 26.67%, 常温组 (25 ℃) 的死亡率为 73.33%, 高温组 (30 ℃) 和对对照组的死亡率均为 0。【结论】证实了 CyHV-3 病毒在低温下能够增殖并且具有致病性, 解释了近年来锦鲤疱疹病毒 (KHVD) 的暴发及流行不再受限于春秋季节的现象。

关键词: 锦鲤疱疹病毒Ⅲ型; 鲤鱼; 锦鲤疱疹病毒病; 温度; 致病性; 增殖; 感染
中图分类号: S941 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-411X(2018)04-0020-05

Effects of temperature on culture *in vitro* and pathogenicity of Cyprinid herpesvirus 3

ZHOU Yaojia¹, TU Zunfang¹, SHUI Fei¹, YANG Ruixue¹, WANG Kaiyu¹, GENG Yi¹, HUANG Xiaoli², OUYANG Ping¹
(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: 【Objective】To confirm the effect of temperature on proliferation *in vitro* and pathogenicity of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). 【Method】CyHV-3-EGFP strain was used in this study. Viral titer was measured by the indirect immunofluorescence staining assay. The proliferation of virus *in vitro* was observed using a fluorescence microscope. The thermal stability, and the effect of temperature on proliferation *in vitro* and pathogenicity *in vivo* of virus were studied. 【Result】CyHV-3 had good thermal stability at 4-36 ℃. The viability of CyHV-3 decreased with the increase of temperature when the temperature exceeded 36 ℃. The virus viability was completely lost at 50 ℃. The infection temperature had little effect on the viability of CyHV-3, and the virus showed infectivity at both high (37 ℃) and low (4 ℃) temperatures. However, incubation temperature significantly affected the virus viability. CyHV-3 proliferation capacity decreased or even disappeared when the temperature exceeded 30 ℃. After CyHV-3 infection, the mortality rates for the carps at low temperature (15 ℃) and room temperature (25 ℃) were 26.67% and 73.33% respectively, and the mortality rates for the carps at high temperature (30 ℃) and in the control group with no virus infection were 0. 【Conclusion】The results confirm that CyHV-3 can proliferate and has pathogenicity at low temperature,

which explain the phenomenon that the outbreak and rapid spread of KHVD in recent years are no longer restricted in spring and autumn seasons.

Key words: Cyprinid herpesvirus 3; *Cyprinus carpio*; koi herpesvirus disease; temperature; pathogenicity; proliferation; infection

锦鲤疱疹病毒病 (Koi herpesvirus disease, KHVD) 是由锦鲤疱疹病毒 (Cyprinid herpesvirus 3, CyHV-3) 感染引起鲤鱼 *Cyprinus carpio*、锦鲤 *Cyprinus carpiod* 以及普通变种鳃坏死、间质性肾炎的一种高致病性、高传染性、高死亡率的疾病。该病发病率高、流行范围广,致死率高达 80%~100%^[1-2]。自 1998 年以来, KHVD 时常在世界范围内的许多鲤鱼和锦鲤养殖场发生^[3],死亡率极高,该病的暴发给鲤鱼和锦鲤养殖业造成了严重的经济损失^[4-8]。因此, KHVD 是世界动物卫生组织必须申报的疾病,是中国农业部规定的 II 类动物疫病,是全世界进出口必检的病原。

KHVD 多发于春秋季节,导致 KHVD 发病和严重程度的主要环境因素是水体温度^[9-10]。水温在 23~28 ℃ 时 KHVD 易暴发流行^[11-12]。先前报道 CyHV-3 的体外增殖温度范围是 15~25 ℃,当温度低于 10 ℃ 或大于 30 ℃ 时,病毒不复制,不能造成疾病暴发^[13-14]。2014 年 4 月,吉林省白山地区报道了 1 例冰下低温条件下暴发的 KHVD,造成了鲤鱼的大量死亡,发病时的水温为-2~5 ℃^[15]。因此, CyHV-3 是否能够在低温条件下复制和具有致病性还需要进一步的研究。本研究选用 CyHV-3-EGFP 病毒株为研究对象,从病毒在培养基中的热稳定性、温度对病毒的体外培养和体内致病性的影响共 3 个方面开展研究,旨在为 CyHV-3 的致病机制研究和防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和试验动物

普通鲤鱼脑细胞 (Common carp brain cell, CCB) 系由深圳出入境检验检疫局刘荭研究员馈赠;CCB 细胞用含体积分数为 10%FBS 的 MEM 培养基培养,置于 25 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的恒温培养箱中;CyHV-3-EGFP 病毒株由比利时列日大学 Alain Vanderplasschen 教授提供;健康鲤鱼 (体长 10~15 cm)60 条,购自四川省成都市某鲤鱼养殖场;细胞培养板,购自上海索宝生物科技有限公司。

1.2 主要试剂

MEM 和 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Sigma 公司;鼠抗 CyHV-3 单抗 2F12 WD1000 由比利时列

<http://xuebao.scau.edu.cn>

日大学 Alain Vanderplasschen 教授提供;荧光二抗 Alexa 488 标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) 购自 Santa Cruz 公司。

1.3 病毒滴度的测定

采用间接免疫荧光染色法测定 CyHV-3 病毒滴度^[16]。以无血清培养基将待测的 CyHV-3 病毒液从 10⁻² 梯度稀释到 10⁻⁶。取对数生长期 CCB 细胞,胰酶消化、计数,铺 24 孔板,每孔 250 μL (含 4×10⁵ 个细胞)。每个病毒梯度设 3 个重复,每孔滴加 250 μL 待测病毒样品。25 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱培养 5 d。培养后的 CCB 细胞置于丙酮-乙醇 (体积比 50:50) 固定液中-20 ℃ 固定 10 min,加入一抗 (2F12 WD1000, 1:1 000 稀释) 置于 25 ℃ 孵育 45 min 后,使用含体积分数为 10%FBS 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min,加入荧光二抗 (Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG, 1:1 000 稀释) 25 ℃ 孵育 30 min,使用含体积分数为 10%FBS 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 5 min 后,加入适量含体积分数为 10%FBS 的 PBS 缓冲液,荧光显微镜下直接计数每孔中荧光细胞数。以每孔荧光细胞数 30~300 个为最佳。测得病毒滴度以每毫升的绿色荧光形成单位 (PFU·mL⁻¹) 表示,每个荧光细胞对应 1 个绿色荧光形成单位。依公式计算病毒滴度:病毒滴度=绿色荧光细胞数/(微孔×病毒量×稀释倍数)。

1.4 病毒热稳定性的测定

为研究 CyHV-3 在培养基中的热稳定性,分别将病毒液置于 4、10、15、20、25、30、40 和 50 ℃ 条件下 1 h。将处理后的病毒样品进行 10 倍梯度稀释,接种至对数生长期的单层 CCB 细胞中,使用 12 孔细胞培养板,每孔加 0.2 mL 病毒液,25 ℃ 条件下于无 FBS 的 DMEM 培养液中攻毒 2 h,去除上清,添加 2 mL 含体积分数为 10%FBS 的 DMEM 培养液中,置于 25 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的恒温培养箱中,培养 5 d 后采用间接免疫荧光蛋白法进行病毒滴度计数。为了进一步研究温度对病毒稳定性的影响,在 30~40 ℃ 之间分别设置了 6 个温度梯度 (30、32、34、36、38、40 ℃),重复以上试验步骤,计算病毒滴度。

1.5 温度对 CyHV-3 体外增殖的影响

1.5.1 感染温度对 CyHV-3 体外增殖的影响 取 100 μL CyHV-3-EGFP 病毒液,加入 200 μL 无血清 DMEM 培养液,混匀,静置 15 min 后加入 1.7 mL 无血清的 DMEM 培养液,所有病毒液感染对数生长期的 CCB 细胞后,将平板置于 4、15、25、30 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下感染 2 h,去掉上清液,添加新的 DMEM 液,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为 5% 的培养箱中继续培养 5 d,利用荧光显微镜观察,研究感染温度对 CyHV-3 体外增殖的影响。

1.5.2 孵育温度对 CyHV-3 体外增殖的影响 将 CyHV-3-EGFP 病毒在 15、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别感染 CCB 细胞 2 h 后,再将这 3 组不同感染温度的 CCB 细胞分别置于 15、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养 5 d,利用荧光显微镜观察,研究孵育温度对 CyHV-3 体外增殖的影响。

1.6 温度对 CyHV-3 致病性的影响

皮肤是 CyHV-3 感染的主要途径,人工动物感染试验采用浸泡法。健康鲤鱼经过 2 周环境适应后随机分成 4 组,每组 15 尾。处理组共设 3 个温度梯度,分别为 15、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$,采用 400 $\text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的病毒悬液浸泡 2 h 攻毒;对照组温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,没有加入病毒悬液浸泡,而加入等量的 DMEM 培养液。攻毒后每天观察 2 次,记录临床症状、死亡时间和数量,连续观察 6 周。

2 结果与分析

2.1 CyHV-3 热稳定性研究

为研究 CyHV-3 在培养基中的热稳定性,分别将病毒液置于不同温度下 1 h 后,通过间接免疫荧光法测定病毒滴度。通过计算绿色荧光形成单位(PFU)可知,在 4、10、15、20、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 1 h 后,病毒的滴度都超过 $10^5 \text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,说明 CyHV-3 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的热稳定性良好。但是当培养温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,病毒滴度明显降低,仅为 $10 \text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 1A)。

为了进一步研究温度对 CyHV-3 稳定性的影

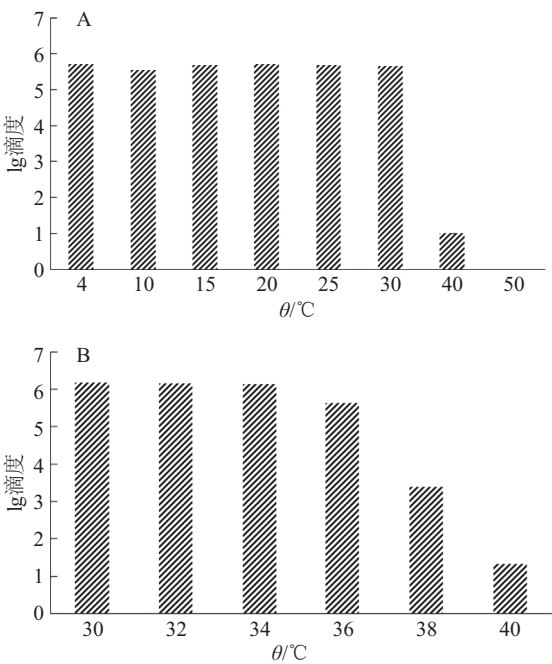


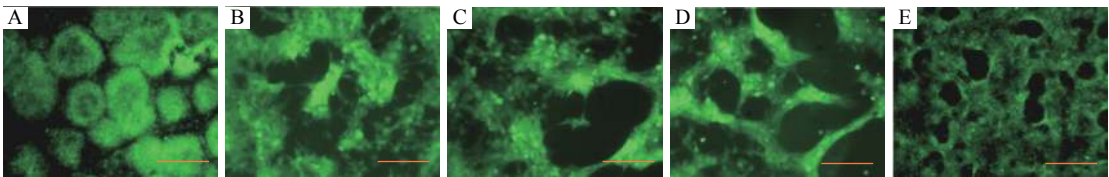
图 1 不同温度下 CyHV-3 病毒液的病毒滴度

Fig. 1 Viral titers of CyHV-3 viral fluid under different temperature

响,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 至 40 $^{\circ}\text{C}$ 之间设置了 6 个温度梯度 (30、32、34、36、38 和 40 $^{\circ}\text{C}$)。经过计算 PFU 可知,温度低于 36 $^{\circ}\text{C}$ 时,病毒滴度都超过了 $10^5 \text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,但是呈现递减趋势。温度高于 36 $^{\circ}\text{C}$ 时病毒滴度明显减少,38 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 时的滴度分别为 $10^{3.7}$ 、 $10^{1.30} \text{PFU}\cdot\text{mL}^{-1}$,病毒滴度大幅度的降低 (图 1B)。试验结果说明 CyHV-3 在 4~36 $^{\circ}\text{C}$ 时具有很好的热稳定性,温度高于 36 $^{\circ}\text{C}$ 时病毒活力降低,温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时病毒活力完全丧失 (图 1)。

2.2 感染温度对 CyHV-3 体外增殖的影响

CyHV-3 病毒分别在 4、15、25、30 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下感染对数生长期的 CCB 细胞 2 h 后,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中继续培养 5 d,荧光显微镜观察结果显示,在这 5 个不同感染温度中,CyHV-3-EGFP 对 CCB 细胞都具有感染力,能大量增殖。因此,4~37 $^{\circ}\text{C}$ 范围内的感染温度对病毒活力无影响 (图 2)。



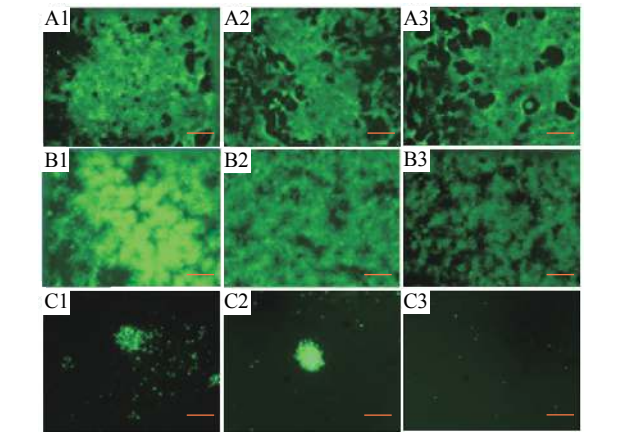
A:4 $^{\circ}\text{C}$, B:15 $^{\circ}\text{C}$, C: 25 $^{\circ}\text{C}$, D: 30 $^{\circ}\text{C}$, E: 37 $^{\circ}\text{C}$; 标尺=200 μm

图 2 不同感染温度下 CyHV-3 体外增殖的荧光显微镜观察结果

Fig. 2 Observation of CyHV-3 proliferation *in vitro* under different temperature using fluorescence microscope

2.3 孵育温度对 CyHV-3 体外增殖的影响

CyHV-3 分别在 15、25、30 ℃ 温度下感染 2 h 后, 分别置于 15、25、30 ℃ 恒温培养箱中继续孵育 5 d, 荧光显微镜观察显示, 孵育温度为 15 和 25 ℃ 时, 3 个感染温度下的 CCB 细胞中都出现病毒的大量增殖。其中感染温度为 15 ℃, 孵育温度为 25 ℃ 时, 病毒增殖量最多。当孵育温度为 30 ℃ 时, 3 个感染温度下的 CCB 细胞中病毒的增殖量都很少, 感染温度为 30 ℃ 时, 病毒没有增殖 (图 3)。



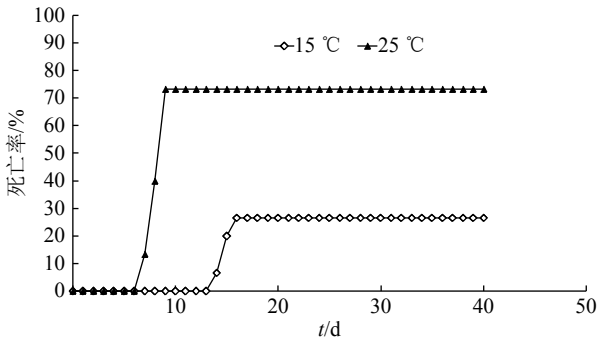
A1、A2 和 A3 的感染温度分别为 15、25 和 30 ℃, 孵育温度为 15 ℃; B1、B2 和 B3 的感染温度分别为 15、25 和 30 ℃, 孵育温度为 25 ℃; C1、C2 和 C3 的感染温度分别为 15、25 和 30 ℃, 孵育温度为 30 ℃; 标尺=200 μm

图 3 不同感染和孵育温度下 CyHV-3 体外培养的荧光显微镜观察结果

Fig. 3 Observation of CyHV-3 culture *in vitro* under different infection and incubation temperatures using fluorescence microscope

2.4 温度对 CyHV-3 致病性的影响

通过浸泡法进行人工感染动物试验, 在 15、25 和 30 ℃ 温度条件下饲养, 观察鲤鱼的死亡情况。通过 40 d 的观察, 15 ℃ 饲养条件下, 攻毒 9 d 后鲤鱼开始表现出临床症状, 14 d 开始有鲤鱼死亡, 累积死亡 4 尾, 死亡率为 26.67%; 25 ℃ 饲养条件下, 攻毒 4 d 后出现临床症状, 7 d 后鲤鱼开始死亡, 累积死亡 11 尾, 死亡率为 73.33%。30 ℃ 条件下, 在攻毒 4 d 后部分鱼表现轻微临床症状, 几天后症状消失, 没有发生死亡; 对照组饲养温度为 25 ℃, 没有临床症状, 死亡率为 0 (图 4)。因此, 温度能够影响 CyHV-3 的致病力, 温度为 15 ℃ 时病毒存在致病性, 但是致病力比 25 ℃ 时减弱; 温度为 30 ℃ 时, CyHV-3 的致病力降低至消失 (图 4)。



30 ℃ 条件下和对照组的死亡率在整个试验期均为 0

图 4 温度对 CyHV-3 致病性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on CyHV-3 pathogenicity

3 讨论与结论

自然条件下的水体温度是水生动物疾病暴发的一个重要诱因, 也是影响病毒在水体存活的重要因素。鱼类是变温动物, 免疫反应等生理机能直接受环境温度的影响, 所以小范围的温度变化会改变鱼的代谢和生理机能, 鱼类免疫反应和病原复制都与水温有关^[17-18]。同时, 水温的变化还会影响病原与宿主之间的平衡, 从而改变疾病的发生率及分布。病毒性疾病具有严格的发病温度, 对温度范围要求非常高, 发病高峰在水温 25 ℃ 左右, 水温突然升到 35 ℃, 并维持 24 h, 很多病症就会消失; 水温突然降到 15 ℃, 并维持 24 h, 很多病毒病症也会消失, 死亡率大幅减少。

锦鲤疱疹病毒 CyHV-3 自 1997 年首次被报道至今, 虽然只有近 20 年的时间, 却已经在全球多个国家传播及流行, 遍布亚洲、欧洲及北美, 非洲也偶有报道, 几乎每年都有国家暴发该疾病, 给鲤鱼及锦鲤养殖业造成巨大的经济损失。CyHV-3 对温度有很强的依赖性, 多发于春秋季节, 适宜的温度为 18~28 ℃ 范围之内, CyHV-3 的潜伏期为 14 d, 在限制存活的温度下, CyHV-3 能处于一种潜伏状态在鱼体内持续存活, 当鱼转入到适合其生长的温度时 CyHV-3 会再次恢复活力^[19-20]。Ronen 等^[21]将健康的鱼苗和患病的成鱼在适合病毒复制的温度 (22~24 ℃) 下共同饲养 3~5 d, 然后通过提高温度 (约 30 ℃) 的方法抑制病毒复制, 饲养 25~30 d, 保护率可达 60%。近年来, CyHV-3 有低温下发病的趋势^[22]。2014 年 4 月, 吉林省白山地区报道了一例冰下低温条件下暴发的 KHVD, 造成了鲤鱼的大量死亡, 发病时的水温为 -2~5 ℃。

为了证实温度对 CyHV-3 体外培养和致病性的影响, 本研究设计试验检测 CyHV-3 在 18 ℃ 以下

或者 28 ℃ 以上的温度条件下的稳定性、体外增殖能力以及致病性。通过试验数据得知 CyHV-3 在 15 ℃ 条件下也具备很强的增殖能力和感染力,能对鲤鱼造成感染并致死。并且在 4~36 ℃ 范围内都有很好的热稳定性,能保持病毒的毒力,一旦温度达到合适的范围,就会恢复感染力,侵袭宿主,但是高温条件会对 CyHV-3 产生抑制。本试验研究了温度对 CyHV-3 体外培养和致病性的影响,证实了 CyHV-3 能够在低温增殖并且具有致病性,解释了近年来 KHVD 的流行及暴发不再受限于春秋季节的现象。此外, CyHV-3 为了适应低温而感染宿主,自身结构功能是否发生改变还需要验证。通过研究温度对 CyHV-3 体外增殖和致病力的影响,对控制 KHVD 的暴发和治疗提供新的思路。

致谢: 感谢深圳出入境检验检疫局刘荭研究员提供 CCB 细胞,感谢比利时列日大学 Alain Vanderplasschen 教授提供病毒株。

参考文献:

- [1] RAKUS K, OUYANG P, BOUTIER M, et al. Cyprinid herpesvirus 3: An interesting virus for applied and fundamental research[J]. Vet Res, 2013, 44(1): 85.
- [2] ANTYNCHOWICZ J, REICHERT M, MATRAS M, et al. Epidemiology, pathogenicity and molecular biology of koi herpesvirus isolated in Poland[J]. B Vet I Pulawy, 2005, 49(4): 367-373.
- [3] HEDRICK R P, GILAD O, YUN S, et al. A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp[J]. J Aquat Anim Health, 2000, 12(1): 44-57.
- [4] TU C, WENG M C, SHIAU J R, et al. Detection of koi herpesvirus in koi *Cyprinus carpio* in Taiwan[J]. Fish Patho, 2009, 39(2): 109-110.
- [5] SANO M, ITO T, KURITA J, et al. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan[J]. Fish Patho, 2004, 39(39): 165-167.
- [6] 刘荭, 史秀杰, 高隆英, 等. 进口锦鲤暴发病病原的 nested-PCR 鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5): 414-418.
- [7] 朱霞, 李新伟, 王好, 等. 一株锦鲤疱疹病毒的分离与鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(5): 340-343.
- [8] 李莹莹, 王庆, 曾伟伟, 等. 锦鲤疱疹病毒 GZ1301 株的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2014, 38(8): 1159-1166.
- [9] HARAMOTO E, KITAJIMA M, KATAYAMA H, et al. Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan[J]. J Fish Dis, 2007, 30(1): 59-61.
- [10] MINAMOTO T, HONJO M N, UCHII K, et al. Detection of Cyprinid herpesvirus 3 DNA in river water during and after an outbreak[J]. Vet Microbiol, 2009, 135(3/4): 261-266.
- [11] MINAMOTO T, HONJO M N, YAMANAKA H, et al. Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan[J]. Res Vet Sci, 2012, 93(1): 508-514.
- [12] MINAMOTO T, HONJO M N, KAWABATA Z. Seasonal distribution of Cyprinid herpesvirus 3 in lake Biwa, Japan[J]. Appl Environ Microb, 2009, 75(21): 6900-6904.
- [13] PIKARSKY E, RONEN A, ABRAMOWITZ J, et al. Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus[J]. J Virol, 2004, 78(17): 9544-9551.
- [14] 郑树城, 王庆, 李莹莹, 等. 鲤疱疹病毒 3 型研究进展[J]. 病毒学报, 2016(1): 108-120.
- [15] 邢程, 王好, 周井祥等. 一例冰下低温爆发的锦鲤疱疹病毒病的鉴定[J]. 水产学杂志, 2014(1): 46-49.
- [16] COSTES B, RAJ V S, MICHEL B, et al. The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin[J]. J Virol, 2009, 83(7): 2819-2830.
- [17] 张奇亚. 水生低等脊椎动物病毒生态学研究[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 277-281.
- [18] 温周瑞. 气候变化对鱼类病毒病和细菌病的影响[J]. 当代水产, 2013(8): 76-77.
- [19] RAKUS K L, IRNAZAROW I, ADAMEK M, et al. Gene expression analysis of common carp (*Cyprinus carpio* L.) lines during Cyprinid herpesvirus 3 infection yields insights into differential immune responses[J]. Dev Comp Immunol, 2012, 37(1): 65-76.
- [20] 罗丹, 梁利国, 谢骏, 等. 鲤疱疹病毒 I、II、III 型研究进展[J]. 水生态学杂志, 2014, 35(3): 94-100.
- [21] RONEN A, PERELBERG A, ABRAMOWITZ J, et al. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*[J]. Vaccine, 2003, 21(32): 4677.
- [22] 高立容, 于慧, 周井祥, 等. 白山市鸭绿江网箱养鲤冰下爆发锦鲤疱疹病毒病的鉴定[J]. 水产养殖, 2017, 38(4): 7-11.

【责任编辑 庄 延】