

病毒性心肌炎差异表达蛋白 MYL4 的筛选鉴定及表达研究

刘 明¹, 许心舒², 乔东访³, 汪冠三², 郑丽霞¹, 王慧君^{3*}

(¹广州医学院第一附属医院呼吸疾病研究所, 呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510120; ²广州市公安局刑事科学技术研究所, 广东 广州 510030; ³南方医科大学法医学研究所, 广东 广州 510515)

[摘要] **目的:** 调查心肌肌球蛋白轻链 4(myosin light polypeptide 4, MYL4)在病毒性心肌炎损伤中的作用。**方法:** 随机将 Balb/c 小鼠分为实验组($n = 30$)和对照组($n = 10$), 实验组用于建立柯萨奇病毒 B3 病毒性心肌炎小鼠模型, 分别在病毒感染后第 3、7、14 天留取心脏及血清标本。利用差异蛋白质组学的方法鉴定了部分的病毒性心肌炎差异表达蛋白, 并对其中一个分子 MYL4 在病毒性心肌炎发病中的作用进行研究。**结果:** 质谱鉴定 6 个差异表达分子分别为: MYL4、热休克蛋白 B1、异柠檬酸脱氢酶 a 亚单位、电压依赖的阴离子通道蛋白、蛋白酶体 a 亚单位 1 型和巨噬细胞封端蛋白。Western blot 及 ELISA 验证发现 MYL4 在病毒性心肌炎小鼠心脏组织及血清中表达明显升高($P < 0.01$), 且 ELISA 结果显示 MYL4 的表达与疾病严重程度呈正相关($r = 0.97, P < 0.00$)。**结论:** MYL4 在病毒性心肌炎组织及血清中表达升高, 参与了病毒性心肌炎的发生发展。

[关键词] 柯萨奇病毒 B3; 心肌炎; 蛋白质组学; 肌球蛋白轻链 4

[中图分类号] R542.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-604-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130508

Identification and evaluation of the role of MYL4 in viral myocarditis in mice

Liu Ming¹, Xu Xinshu², Qiao Dongfang³, Wang Guansan², Zheng Lixia¹, Wang Huijun^{3*}

(¹Guangzhou Institute of Respirator Disease, Stat Key Laboratory of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120; ²Guangzhou Criminal Science and Technology Institute, Guangzhou 510030; ³Department of Forensic Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanism of myosin light polypeptide 4 (MYL4) on injury caused by viral myocarditis in mice. **Methods:** The experimental animals were randomly divided into the viral myocarditis group ($n = 30$) and the control group ($n = 10$). The viral myocarditis models were achieved by infection with coxsackievirus B3 (CVB3). The proteomics assay was performed to identify the different proteins involve in the pathogenesis of viral myocarditis. The expression and the role of one identified protein MYL4 were evaluated by Western blot and ELISA. **Results:** Six proteins were successfully identified by MS: MYL4, heat shock protein $\beta 1$, isocitrate dehydrogenase subunit α mitochondrial precursor, voltage dependent anion-selective channel protein 2, proteasome subunit α type 1 and macrophage capping protein. The expression of MYL4 was higher in the heart tissue and serum of VMC mice ($P < 0.01$), and ELISA results showed that the expression of MYL4 was related to the severity of disease ($r = 0.97, P < 0.00$). **Conclusion:** The MYL4 expression of VMC was higher than that of the control group, and also could indicate the injury degree, which suggesting that MYL4 might be involved in the pathogenesis of VMC.

[Key words] Coxsackievirus group B type 3; myocarditis; proteomics; myosin light polypeptide 4

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 604-609]

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是一种常见心血管系统疾病, 可从无症状的亚临床型到心力衰竭、恶性心率失常和猝死等, 严重危害人类生命健康^[1-2]。VMC 主要是由肠道病毒引起, 尤其以 B3 型柯萨奇病毒(coxsackievirus group B type 3, CVB3)

[基金项目] 国家自然科学基金(30370588, 81200050); 呼吸疾病国家重点实验室青年项目(2011-A8)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hjwang@fimmu.com

最为常见,可侵犯心脏引起心肌局限性或弥漫性的急性、亚急性炎症,以心肌炎性坏死和间质单个核细胞浸润为主要病理变化,其确切的发病机制至今还不十分清楚,深入探讨 VMC 发病过程中的关键分子机制显得尤为迫切。一般认为病毒性心肌炎的发病过程包括两个阶段:早期病毒直接侵犯心肌引起心肌损伤和功能障碍,后期是继发性自身免疫反应阶段,其针对的抗原主要是心肌肌球蛋白。研究表明,内源性肌球蛋白的释放是继发性自身免疫反应的原因之一^[3-6]。本研究利用差异蛋白质组学的方法鉴定了部分病毒性心肌炎差异表达蛋白,并对其中一个分子——肌球蛋白轻链 4 (myosin light polypeptide 4, MYL4) 进行研究,探索 MYL4 在病毒性心肌炎自身免疫发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG) 胶条 (pH4~7, 3~10 L, 3~10 NL, 7~10, 17 cm), 等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 溶液 (pH3~10, pH7~10), 磷酸三丁酯 (tributylphosphine, TBP) 均为美国 Bio-Rad 公司产品; Tris、尿素、二硫苏糖醇 (DTT)、四甲基乙二胺 (TEMED)、丙基硫酸盐 (CHAPS)、碘乙酰胺、丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、过硫酸铵、甘氨酸、矿物油、甘油均为美国 Sigma 公司试剂; 乙腈 (ACN) 购自美国 Fisher 公司。低分子量蛋白标记物 (Marker) 购自上海西巴斯生物公司, 其余试剂均为国产分析纯。

等电聚焦仪, 垂直电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司; Milli-Q 超纯水系统购自美国 Millipore 公司; 高速低温离心机和分光光度计为美国 Beckman 公司产品; 图像分析软件 (Melanie4.0)、透射扫描仪 (Umax PowerLook 1100)、质谱仪 (DE STR MALDI-TOF) 均为美国 ABI 公司产品。兔抗 MYL4 抗体 (13229-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒性心肌炎模型的建立及实验分组

40 只 4~5 周龄 SPF 级 Balb/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心。严格饲养在恒温 (20~26℃)、恒湿 (50%~56%) 的空气洁净层流架内; 小鼠盒、空气过滤罩、垫料、饲料和饮水等均经高压蒸汽灭菌, 并在无菌条件下适时更换。CVB3 (Nancy 株) 由美国辛辛那提大学王淑云教授惠赠。在 HeLa 细胞 (本实验室保存) 内传代增殖, 测病毒半数组织感染率

(TCID₅₀) 为 1×10^5 /ml。将小鼠随机分为 VMC 模型组和对照组。参照既往已建立的方法, 复制 VMC 模型^[7], VMC 模型组腹腔注射病毒液 0.1 ml, 对照组腹腔注射 0.1 ml 不含病毒的 Eagle's MEM 液。对其心脏、组织学、免疫学指标进行检测。心肌病理学评分参照如下标准^[8]: 0 分: 无炎症或可疑炎症; 1 分: 1 个或 2 个小的变性、炎症灶; 2 分: 多个小炎症灶或数个大的炎症灶、小坏死灶; 3 分: 多个大的炎症、坏死病灶; 4 分: 弥漫性炎症浸润、坏死、钙化。

1.2.2 样品制备

脱臼法处死小鼠, 立即解剖, 取心脏。4℃ 预冷的山梨醇 Tris 溶液冲洗干净, 4℃ 3 000 r/min 离心 10 min, 用滤纸吸去多余的液体, 研磨法将心脏组织研成粉末, 移入 1.5 ml EP 管; 加入 1 ml 裂解液, 混匀 2 min; 4℃ 15 000 r/min 离心 1 h; 取上清分装, -80℃ 保存。Bradford 法测蛋白浓度。

1.2.3 双向凝胶电泳

将适量蛋白样品溶液 (银染加样量 200 μg, 考马斯亮蓝染色加样量 1 000 μg) 与适量泡胀液混匀, 总体积为 350 μl。IPG 干胶条均匀加入 IPG 干胶条容器; 依次进行重水化、等电聚焦、平衡、垂直电泳、染色、成像。通过软件分析比较两组混合样品图谱, 找出差异蛋白质点。分析两组个体标本, 统计混合标本的差异点在个体标本中的出现情况。选取在个体标本中也同时出现的差异蛋白质点, 作为最终质谱鉴定对象。

1.2.4 胶内酶切

沿边缘切取考染凝胶上的差异蛋白质点, 置于 1.5 ml EP 管。依次经水洗、脱色、还原及烷基化、胶内酶切、萃取等步骤, 处理待检样品以备质谱鉴定。

1.2.5 MALDI-TOF-MS 检测

1 μl 肽混合物样品点样于样品盘, 加 1 μl 基质液, 自然干燥。加入 1 μl 0.1 % TFA, 5 s 后吸去。利用质谱仪进行质谱分析。采用反射模式, 正离子谱测定, 离子源加速电压为 20 kV, 反射电压为 23 kV, N₂ 激光波长 337 nm, 脉冲宽度为 3 ns, 离子延迟提取 100 ns, 真空度为 4×10^{-7} Torr, 质谱信号单次扫描累加 50 次, 使用基质峰和胰酶自降解离子峰作为内部标准校正。

1.2.6 数据库检索

利用软件 Mascot distiller 过滤基线峰、识别信号峰。利用美国 Matrixscience 公司的 Mascot 软件搜索 NCBI 数据库 (<http://www.matrixscience.com>); 或用 Peptide 搜索软件在欧洲分子生物学

实验室(EMBL)的数据库 SWISS-PROT/TrEMBL (http://www.expasy.ch)中搜索;或用 NIH 和 NSF 的 ProFound 软件搜索 NCBI/nr 数据库 (http://prowl.rockefeller.edu/),寻找匹配的相关蛋白质,同时查询其功能。

1.2.7 Western blot 检测

用 RAPA 裂解液裂解各组心脏组织,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经 10%SDS-PAGE 胶分离后湿转至 PVDF 膜,洗涤后加 5%脱脂奶粉 37℃封闭 1 h,再分别加入兔抗 MYL4 抗体(1:1 000 稀释)和鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:2 000 稀释),4℃孵育过夜,TBST 洗涤后,再加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:1 000 稀释),室温孵育 1 h,TBST 洗涤,ECL 化学发光试剂显影。蛋白相对含量用 MYL4/GAPDH 灰度比值表示。

1.2.8 血清 ELISA 检测

按试剂盒说明书,用 ELISA 法检测小鼠血清中 MYL4 和心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T,cTnT)的含量。

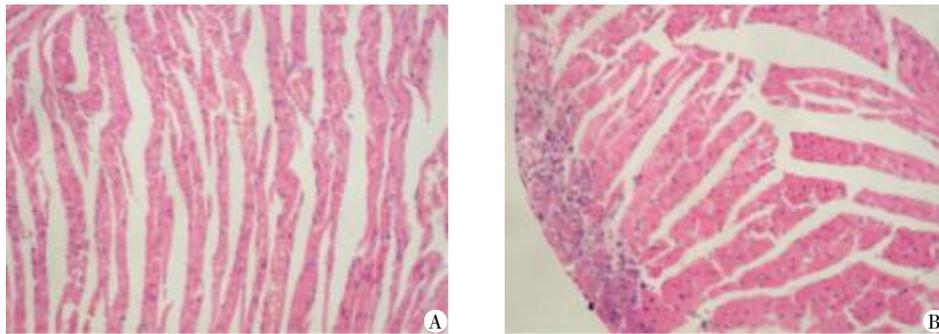
1.3 统计学方法

运用 SPSS13.0 软件对数据进行四格表卡方检验、两组均数比较的 *t* 检验、多组等级/频数表资料比较的秩和检验,及 Nemenyi 法两两比较等统计学方法处理,显著性水平 $\alpha=0.05$,并绘制相应图表。

2 结果

2.1 VMC 模型小鼠心肌组织学改变

在 VMC 模型组小鼠病毒接种 1 周后,开始呈现不同程度的炎症病理改变,镜下可见心肌细胞变性坏死,部分心肌纤维断裂,并伴有局灶性炎症细胞浸润,之后部分心肌出现不同程度的纤维增生;正常对照小鼠心肌组织未见异常改变(图 1)。



A:正常对照组小鼠心肌形态结构未见异常;B:VMC 模型组小鼠,病毒感染第 7 天,部分心肌呈灶性坏死,并伴炎细胞浸润。

图 1 VMC 小鼠心肌病理学改变(HE,×200)

Figure 1 Pathological change of VMC mice(HE,×200)

2.2 双向电泳差异蛋白分析及筛选

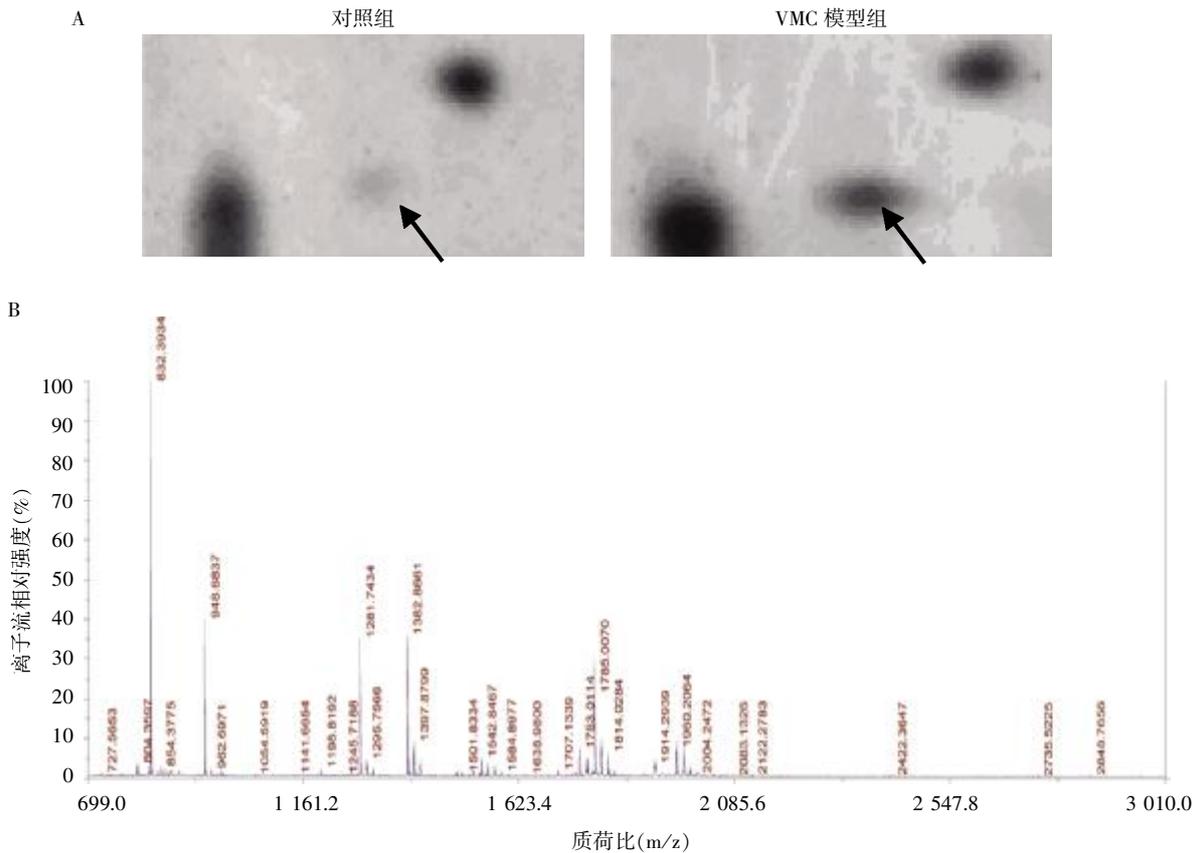
按照前述小鼠心肌双向电泳优化方案,获得了具有较好重复性和分离效果的双向电泳图谱^[9]。Melaina4.0 分析软件进行初步分析结果显示,与正常小鼠心肌图谱相比,病毒性心肌炎图谱上,28 个蛋白表达上调(灰度值在 5 倍以上),13 个蛋白表达

明显降低(灰度值在 5 倍以下),6 个蛋白点消失,新出现 12 个蛋白点。随机从分析图谱中找出 8 个差异点进行鉴定,6 个被成功鉴定:肌球蛋白轻链 4 (MYL4,MLC1A)、热休克蛋白 B1、异柠檬酸脱氢酶 a 亚单位、电压依赖的阴离子通道蛋白、蛋白酶体 a 亚单位 1 型、巨噬细胞封端蛋白(表 1,图 2)。

表 1 MALDI-TOF-MS 鉴定差异表达蛋白检索结果

Table 1 Identification results of proteins differentially expressed by MALDI-TOF-MS

蛋白中文名称	英文名称	分子量	等电点	匹配率(100%)	VMC 中表达
肌球蛋白轻链 4	Myosin light polypeptide 4, MYL4, MLC1A	21 014.5	4.96	100	上升
热休克蛋白 B1	Heat shock proteinβ1	22 999.7	6.12	98	上升
异柠檬酸脱氢酶 a 亚单位	Isocitrate dehydrogenase subunit α mitochondrial precursor	39 613.1	6.27	100	下降
电压依赖的阴离子通道蛋白	Voltage dependent anion-selective channel protein2	31 712.6	7.44	100	下降
蛋白酶体 a 亚单位 1 型	Proteasome subunit α type 1	29 527.8	6	100	上升
巨噬细胞封端蛋白	Macrophage capping protein	39 512.9	6.73	96	上升



A: 对照组和 VMC 模型组双向电泳差异图谱部分区域放大图, 箭头所指为差异表达蛋白点 MYL4; B: 差异蛋白点 MYL4 蛋白质谱鉴定图谱。

图 2 双向电泳分离差异蛋白点及质谱鉴定 MYL4 蛋白

Figure 2 2DE images and MALDI-TOF-MS spectrum results of MYL4

2.3 VMC 小鼠心肌 MYL4 的表达

利用 Western blot 对小鼠心肌标本检测发现, 各时间点 MYL4 蛋白在损伤心肌组织中的表达水平均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$, 图 3)。

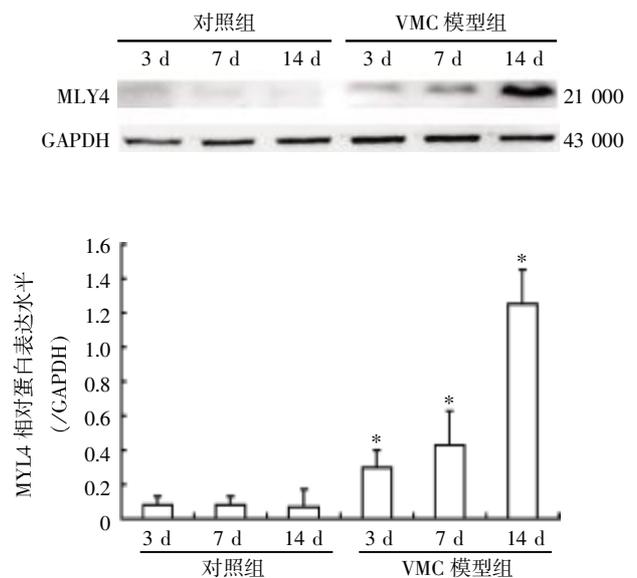
2.4 VMC 血清 MYL4 表达与心肌病变的关系

血清中 MYL4 的表达与心肌病变的严重程度呈正相关 ($r = 0.97, P < 0.001$, 图 4)。MYL4 在病变的第 3 天已明显上升, 第 7 天达到高峰, 且一直持续至 14 d。而 CTnT 则在第 3 天开始升高, 之后逐步下降 (表 2)。

3 讨论

VMC 发病机制不清, 目前通常认为, 心肌损伤的机制可能与病毒在心肌细胞内大量复制造成的直接损伤、炎性因子对心肌的损伤和心肌损伤后自身抗原暴露而诱发的自身免疫反应等有关^[4-6], 进一步探讨自身免疫反应在发病中的作用具有重要意义。

本研究中, 本课题组在既往已建立的小鼠心肌蛋白质组学基础之上, 比较分析了 VMC 和正常小



与同时时间点对照组相比, $*P < 0.01$ 。

图 3 Western blot 检测 MYL4 蛋白在正常及 VMC 小鼠心肌组织中的表达

Figure 3 Different expression of MYL4 in the control and VMC group showed by Western blot assay

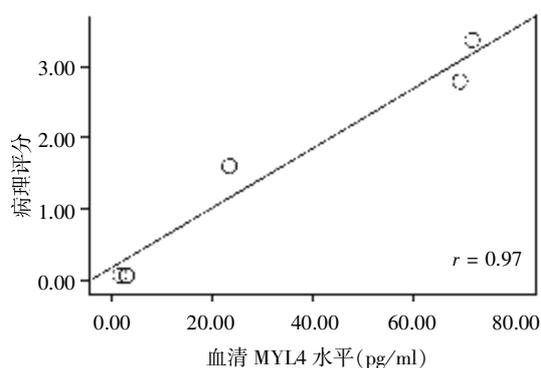


图4 心脏病变病理评分与 MYL4 表达水平的相关性

Figure 4 The correlation between the pathological evaluation score and the expression of MYL4

表2 小鼠血清 MYL4 和 cTnT ELISA 检测结果及与心肌病变的关系

Table 2 ELISA results of mouse serum MYL4 and cTnT, and the relationship with pathological lesions ($\bar{x} \pm s$)

观察指标	对照组			VMC 模型组		
	3 d(n=4)	7 d(n=3)	14 d(n=3)	3 d(n=10)	7 d(n=8)	14 d(n=7)
病理评分	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	1.60 ± 0.30	3.30 ± 0.40	2.80 ± 0.40
MYL4(pg/ml)	1.36 ± 0.16	0.95 ± 0.28	1.43 ± 0.25	23.63 ± 3.12*	72.52 ± 8.13*	69.78 ± 5.14*
cTnT(ng/ml)	0.26 ± 0.12	0.42 ± 0.20	0.35 ± 0.24	6.38 ± 1.36*	5.32 ± 2.45*	3.66 ± 3.12*

与同时时间点对照组比较,* $P < 0.01$ 。

抗原为心肌肌球蛋白(cardiac myosin, CM)。CM 是心肌细胞的重要结构和收缩蛋白之一,是构成肌原纤维粗丝的主要成分,约占心肌总蛋白量的 35%。它具有收缩功能和 ATP 酶活性作用。由两条重链(myosin heavy chain, MHC)和两对轻链(myosin light chain, MLC)构成,是肌球蛋白具有重要生物活性的重要结构。肌球蛋白具有 2 个生物学作用:一是具有 ATP 酶活性,能裂解 ATP,释放化学能;二是具有与肌动蛋白结合的能力^[10]。CM 在酸性 pH 下发生裂解,其 MLC 和 MHC 分离,由于 MLC 分子量较小,易逸出细胞到血液中。心肌细胞损伤越严重,血清 MLC 水平越高。因其免疫学的特异性强,所以 MLC 的测定是迄今为止诊断 AMI 和研究心肌损伤及保护较特异的生化指标^[11]。研究进步发现,肌球蛋白轻链 1 可提示心肌坏死^[12],而肌球蛋白轻链 2 则与心脏发育及心肌收缩力有关^[13]。然而 MYL4 在心肌损伤中的作用却尚不十分明确。本研究通过双向电泳差异筛选及质谱鉴定,发现了心肌 MYL4 在 VMC 小鼠心肌中表达中的明显上调,进一步 Western blot 结果也证实,MYL4 蛋白在损伤心肌组织中的表达水平明显高于正常对照组,提示 MYL4 参与了 VMC 的发生发展。

Neumann 等^[14]曾研究发现,CM 和某些攻击心

鼠心肌双向电泳图谱,并随机选择差异蛋白质点进行了 MALDI-TOF-MS 鉴定,获得了 6 个与 VMC 发生、发展相关的蛋白质。进一步对其中的 MYL4 在 VMC 心肌组织及血清中的表达研究发现,MYL4 在 VMC 心肌组织及血清中均异常高表达,特别是血清中 MYL4 在病毒感染的第 3 天已明显上升,第 7 天达到高峰,且一直持续至 14 d,其表达与心肌病变的严重程度呈正相关。

临床研究发现 VMC 患者血清中可检测到多种自身免疫抗体,而一些 VMC 患者心肌中已无病毒感染时,血清中仍有大量自身抗体存在,其中主要

脏的病毒蛋白具有类似片段,在人患病毒性心肌炎、病毒性肝炎等疾病时,CM 有可能引导人体自身免疫造成“敌我不分”,使人体产生的抗病毒抗体,既对抗病毒,又攻击人体正常心肌组织,从而发生自身免疫性心肌损害。本研究中发现 MYL4 在 VMC 中表达升高,提示其可能在 VMC 自身免疫方面起着重要作用。CVB3 入侵心肌细胞后引起细胞损伤,CM 从受损的心肌细胞中释放出来,被抗原提呈细胞如树突状细胞等识别,从而激起自身免疫应答。在针对自身免疫性心肌炎的研究中已经证实 CM 能够引起小鼠和大鼠急性心肌炎和慢性心肌炎,其病理特征均为心肌细胞变性、坏死,淋巴细胞浸润以及心肌纤维化,血清中也可检出抗 CM 抗体,这些研究结果均表明病毒感染后机体发生了针对 CM 这一特异性抗原成分的自身免疫应答。

综上所述,本研究运用蛋白质组学的方法鉴定了 6 个 VMC 差异表达蛋白,探讨了其中 1 个蛋白 MYL4 在 VMC 的表达及作用,结果显示 MYL4 在 VMC 小鼠心脏中异常高表达,其表达量与心肌损害严重程度呈正相关,提示 MYL4 在 VMC 心肌损伤中起一定作用,这种内源性肌球蛋白的释放可能是 VMC 继发性自身免疫反应的原因之一。本研究结果为进一步阐明 VMC 发病机制提供了实验依

据,为探索 VMC 新的免疫学治疗途径提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Cooper LT. Myocarditis[J]. N Engl J Med, 2009, 360 (15):1526-1538
- [2] Sagar S, Liu PP, Cooper LT Jr. Myocarditis [J]. Lancet, 2012, 379(9817):738-747
- [3] Metzger TC, Anderson MS. Myocarditis;a defect in central immune tolerance? [J]. J Clin Invest,2011, 121(4): 1251-1253
- [4] Guglin M, Nallamshetty L. Myocarditis;diagnosis and treatment[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2012, 14(6):637-651
- [5] Gaaloul I, Riabi S, Harrath R, et al. Sudden unexpected death related to enterovirus myocarditis;histopathology, immunohistochemistry and molecular pathology diagnosis at post-mortem[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12:212
- [6] Rose NR. Myocarditis;infection versus autoimmunity [J]. J Clin Immunol, 2009, 29(6):730-737
- [7] 刘 明,许心舒,乔东访,等. 力竭性运动对病毒性心肌炎小鼠心脏功能及结构的影响[J]. 中国急救医学, 2012,32(6):519-522
- [8] Ezkalla SJ, Kloner RA, Khatib G. et al. Effect of metoprolol in acute coxsackie virus B3 murine myocarditis [J]. J Am Coll Cardiol,1988, 12 (2):412-414
- [9] 刘 明,王慧君,李学锋,等. 小鼠心肌蛋白质组双向电泳技术的建立及其优化[J]. 中国临床康复,2006,10 (28):174-176
- [10] Alpert NR, Brosseau C, Federico A, et al. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2002,283(4):H1446-H1454
- [11] Seguin JR, Saussine M, Ferriere M, et al. Myosin;a highly sensitive indicator of myocardial necrosis after cardiac operations[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,1989,98 (3): 397-401
- [12] Berna MJ, Zhen Y, Watson DE, et al. Strategic use of immunoprecipitation and LC/MS/MS for trace-level protein quantification;myosin light chain 1, a biomarker of cardiac necrosis[J]. Anal Chem, 2007, 79(11):4199-4205
- [13] Moss RL, Fitzsimons DP. Myosin light chain 2 into the mainstream of cardiac development and contractility [J]. Circ Res, 2006, 99(3):225-227
- [14] Neumann DA, Rose NR, Ansari AA, et al. Induction of multiple heart autoantibodies in mice with coxsackievirus B3- and cardiac myosin-induced autoimmune myocarditis [J]. J Immunol, 1994, 152(1):343-350

[收稿日期] 2012-12-14

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, $(2\sim6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$,30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)