

盐酸小檗碱抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及诱导凋亡的作用研究

谢娟, 黄新艳, 许银燕, 陈燕妮, 汤倩*

(南京医科大学附属南京妇幼保健院药剂科, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的: 观察盐酸小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞抑制增殖及诱导凋亡的作用, 并探讨其可能的机制。方法: 不同浓度(0、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$)盐酸小檗碱处理 MDA-MB-231 细胞不同时间(48、72 h), MTT 法检测盐酸小檗碱对细胞的增殖抑制率, 选择盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 作为机制研究浓度, Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测盐酸小檗碱对细胞凋亡的影响; 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针检测盐酸小檗碱对细胞内活性氧簇的影响; 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯丙咪唑羰花青碘化物(JC-1)荧光探针检测盐酸小檗碱对细胞线粒体膜电位的影响; Caspase3 试剂盒检测盐酸小檗碱对细胞内 Caspase3 活性的影响。结果: 盐酸小檗碱作用 MDA-MB-231 细胞 48、72 h, 呈浓度及时间依赖性抑制 MDA-MB-231 细胞增殖。盐酸小檗碱(50 $\mu\text{mol/L}$)呈时间依赖性诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡并诱导 MDA-MB-231 细胞内活性氧簇大量生成, 线粒体膜电位降低, Caspase3 活性增高。结论: 盐酸小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用可能是通过诱导细胞内活性氧簇的生成、降低线粒体膜电位, 升高 Caspase3 活性, 由线粒体途径诱导细胞凋亡。

[关键词] 乳腺癌; 盐酸小檗碱; 线粒体; 活性氧簇

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1220-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130909

Effects of berberine hydrochloride on breast cancer cells (MDA-MB-231)

Xie Juan, Huang Xinyan, Xu Yinyan, Chen Yanni, Tang Qian*

(Department of Pharmacy, Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of berberine hydrochloride on breast cancer cells (MDA-MB-231) and related mechanism. **Methods:** Human breast cancer MDA-MB-231 cells were treated with different concentrations of berberine hydrochloride (0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$), then the proliferation rate of MDA-MB-231 cells was examined by MTT assay after 48 h and 72 h; the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells was detected by staining with Annexin V/PI EGFP and flow cytometry; the level of reactive oxygen species in MDA-MB-231 cells was detected by DCFH-DA staining; the mitochondrial membrane potential was detected by molecular probe JC-1; activity of Caspase3 was detected by Caspase3 Kit. **Results:** Berberine hydrochloride inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner. It also significantly elevated the reactive oxygen species level, reduced mitochondrial membrane potential and activity of Caspase3 in the MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** Berberine can inhibit the proliferation and induce apoptosis of MDA-MB-231 cells through mitochondrial-dependent pathway.

[Key words] breast cancer; berberine hydrochloride; mitochondria; reactive oxygen species

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1220-1225]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 全球每年约有 100 万妇女被诊断为乳腺癌, 50 万妇女死于乳腺癌。自 20 世纪 80 年代以来在加拿大、美国、

新西兰等西欧和北美地区, 乳腺癌的发病率在女性恶性肿瘤中始终居首位, 约占恶性肿瘤的 25%~30%^[1]。我国虽属乳腺癌低发国家, 但近年来其发病率出现明显上升趋势: 在城市中乳腺癌的发病率居于女性恶性肿瘤的第 2 位, 并在一些大城市中已经上升至第 1 位^[2]。化疗是治疗乳腺癌的主要手段之一, 而现行化疗药物均有不同程度的不良反应。

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金面上项目(09NJ-MUM099); 南京市医学科技发展青年启动项目(QYK10156)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jszjxie0306@yahoo.cn

小檗碱是从黄连、黄柏等植物中提取的一种异喹啉类生物碱,作为一种广谱抗菌药其应用有着悠久历史^[3]。现已能够人工合成,临床常用盐酸小檗碱。近年来对其研究发现,盐酸小檗碱除具有清热解毒、抗菌消炎作用外,它对多种肿瘤均有不同程度的抑制作用,但其抗肿瘤的机制尚不明确。本研究以乳腺癌MDA-MB-231细胞为研究对象,观察盐酸小檗碱对MDA-MB-231细胞生长的抑制作用,并探讨其可能与线粒体途径诱导的细胞凋亡有关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌MDA-MB-231细胞株获赠于南京医科大学细胞生物及医学遗传系江苏省人类基因组功能研究重点实验室。高糖DMEM培养基(Gibco公司,美国);胎牛血清(杭州四季青生物技术公司);盐酸小檗碱(武汉福鑫化工公司)纯度97.85%,分子量407.85,以温热去离子水溶解,配置母液浓度5 mmol/L,0.22 μm微孔滤膜过滤灭菌,-20℃冻存,临用前用细胞培养基稀释至所需浓度;MTT及2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)(Sigma公司,美国);5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯丙咪唑羧花青碘化物(JC-1,Invitrogen公司,美国);Caspase3试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人乳腺癌MDA-MB-231细胞株培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于5%CO₂细胞培养箱中,恒温37℃培养。每2 d换液1次,使用胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT检测盐酸小檗碱对细胞生长的抑制率

取对数生长期的细胞进行消化,以4 × 10⁴个/孔将MDA-MB-231细胞接种于96孔培养板,每孔体积为200 μl,在细胞培养箱孵育,镜下观察待细胞80%融合,去除培养基中的血清,给予含不同浓度盐酸小檗碱(0、25、50、75、100 μmol/L)的无血清高糖DMEM培养基,置于细胞培养箱中继续培养48、72 h,每组设4个复孔。到达培养时间后,弃含药培养基,每孔分别加入不含药物的新鲜培养基180 μl,置于细胞培养箱中平衡30 min,每孔加入MTT溶液(5 mg/ml)20 μl,继续正常培养2.5 h,小心吸弃每孔培养基上清,每孔加入150 μl DMSO中止培养,在水平摇床上振荡10 min,使结晶物充分溶解,选

择490 nm波长,在酶标仪上测定各孔吸光值。计算药物对细胞增殖的抑制率(%)=(1-实验孔吸光值/对照孔吸光值)×100%。

1.2.3 Annexin V/PI-EGFP染色,流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞消化,以4.0 × 10⁴个/孔的密度接种于24孔板中,置于细胞培养箱中培养,镜下观察待细胞80%融合,去除培养基中的血清,给予含盐酸小檗碱50 μmol/L的无血清高糖DMEM培养基,置于细胞培养箱中继续培养24、48、72 h,到达培养时间后,吸弃含药物培养基,胰酶消化,收集10⁵个细胞,PBS洗3次,1 000 r/min离心5 min后重悬于500 μl的缓冲液中,加入2 μl的Annexin V-EGFP和5 μl的PI,轻轻混匀,避光室温反应15 min,立即上机检测。

1.2.4 细胞内活性氧簇的水平测定

MDA-MB-231细胞内活性氧簇水平通过DCFH-DA的氧化进行检测,该荧光探针在乙酰乙酸盐的帮助下进入细胞内,在胞内水解、氧化,脱氢后形成荧光素发光,荧光发光强度和细胞内活性氧的水平成正比。因此该荧光探针可定量检测细胞内活性氧簇的水平。荧光探针DCFH-DA溶于DMSO 10 mmol/L,-20℃避光保存,临用前用DMEM稀释500倍至20 μmol/L孵育细胞。取对数生长期细胞消化,以8 × 10⁴个/孔的密度接种于6孔板中,置于细胞培养箱中培养,镜下观察至细胞80%融合,去除培养基中的血清,给予含盐酸小檗碱50 μmol/L的无血清高糖DMEM培养基,置于细胞培养箱中继续培养1、3、6、12、24 h,到达培养时间后,弃含药培养基,加入终浓度为10 mmol/L的DCFH-DA至药物处理后的细胞中,37℃孵育30 min,于6孔板中每孔中加入200 μl细胞裂解液,置于冰上避光震荡孵育10 min,4℃,15 000 r/min离心5 min,将上清150 μl转移至96孔板中,荧光酶标仪读数,取激发波长为490 nm,发射波长为520 nm。

1.2.5 细胞内线粒体膜电位测量

JC-1是一种因光而变化的探针,可以特异性进入线粒体。当线粒体膜电位较低时,JC-1以单体形式存在,呈现绿色荧光;而线粒体膜电位较高时,JC-1以聚集形式存在,呈现红色荧光。因此荧光显微镜下见胞体内荧光由橙色变为绿色,表示线粒体内膜电位降低^[4]。取对数生长期细胞消化,以8 × 10⁴个/孔的密度接种于6孔板中,置于细胞培养箱中培养,镜下观察待细胞80%融合,去除培养基中的血清,

给予含盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 的无血清高糖 DMEM 培养基,置于细胞培养箱中继续培养 1、3、6、12、24 h,到达培养时间后,弃含药培养基,加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 JC-1 至药物处理后的细胞中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,DMEM 培养液洗涤 2 遍,荧光显微镜下成像检测(激发波长为 490 nm,发射波长 520 nm)。

1.2.6 Caspase3 活性测定

采用 Caspase3 试剂盒测定 Caspase3 活性,方法按试剂盒说明书进行。简述如下:1 $\times 10^4$ 个/孔接种于 96 孔板,给予含盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 的无血清高糖 DMEM 培养基孵育细胞 24、48 h 后,按说明书操作裂解细胞,取 50 μl 含 200 μg 蛋白的细胞裂解上清,加入 50 μl 的 2 \times 反应缓冲液、5 μl 的 Caspase3 反应底物 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,酶标仪吸收波长 405 nm 测定吸光值。

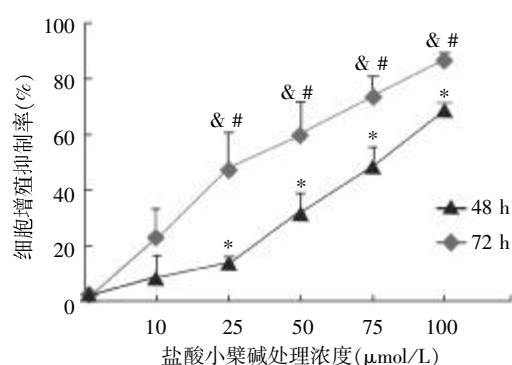
1.3 统计学方法

所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。所有实验数据均采用 SPSS13.0 软件处理。对照组与给药组比较采用完全随机设计方差分析(ANOVA)结合最小显著差数法(LSD)分析,相同给药浓度,孵育不同时间,两组之间比较采用配对 t 检验分析, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 盐酸小檗碱处理后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制率

不同浓度盐酸小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖均显示抑制作用,且这种抑制作用与盐酸小檗碱的浓度和作用时间呈依赖性。随盐酸小檗碱浓度的增加和作用时间的延长,盐酸小檗碱对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用越显著。如图 1 所示,盐酸小檗碱 0 $\mu\text{mol/L}$ 孵育组为对照组,盐酸小檗碱(10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 48 h 后抑制率分别较对照组增加至 8.67%、14.12%、31.38%、48.35% 及 68.32%。盐酸小檗碱(10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 72 h 后抑制率分别较对照组增加至 22.95%、48.08%、60.05%、73.74% 及 86.66%。盐酸小檗碱(10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 48 h 及 72 h 各组细胞增殖抑制率与对照组比均有显著差异($P < 0.05$);相同浓度(25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$) 作用不同时间的细胞增殖抑制率差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。



盐酸小檗碱孵育 48 h 与对照组比较,* $P < 0.05$;盐酸小檗碱孵育 72 h 与对照组比较,* $P < 0.05$;相同浓度盐酸小檗碱孵育 48 h 与孵育 72 h 组间比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 MTT 检测盐酸小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of berberine hydrochloride on the growth of MDA-MB-231 cells assessed by MTT assay

2.2 盐酸小檗碱处理对乳腺癌 MDA-MB-231 凋亡的影响

参照以上实验结果,选择盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进一步探讨其对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长抑制作用机制。盐酸小檗碱孵育 0 h 组为对照组,结果发现盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 作用乳腺癌 MDA-MB-231 24、48、72 h 后,细胞凋亡率显著增加,分别为 19.74%、38.08%、52.98%,呈时间依赖性,与对照组(7.20%)比较差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.3 盐酸小檗碱处理对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内活性氧簇生成的影响

以 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)探针检测盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 MDA-MB-231 细胞不同的时间(0、1、3、6、12、24 h),胞浆内活性氧簇生成的变化。盐酸小檗碱孵育 0 h 组为对照组,盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 MDA-MB-231 细胞,胞浆内活性氧簇的生成显著增多,并在 6 h 达高峰,较对照组增至 257.39%(图 3)。

2.4 盐酸小檗碱诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位降低

盐酸小檗碱孵育 0 h 组为对照组,如图 4 所示对照组的 MDA-MB-231 细胞主要表现为橙色荧光,表明细胞线粒体处于高能量状态。盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 1、3、6、12、24 h,镜下可见胞体由橙色荧光转变为绿色荧光,表示线粒体膜电位降低(图 4)。

2.5 盐酸小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Caspase3 相对活性的影响

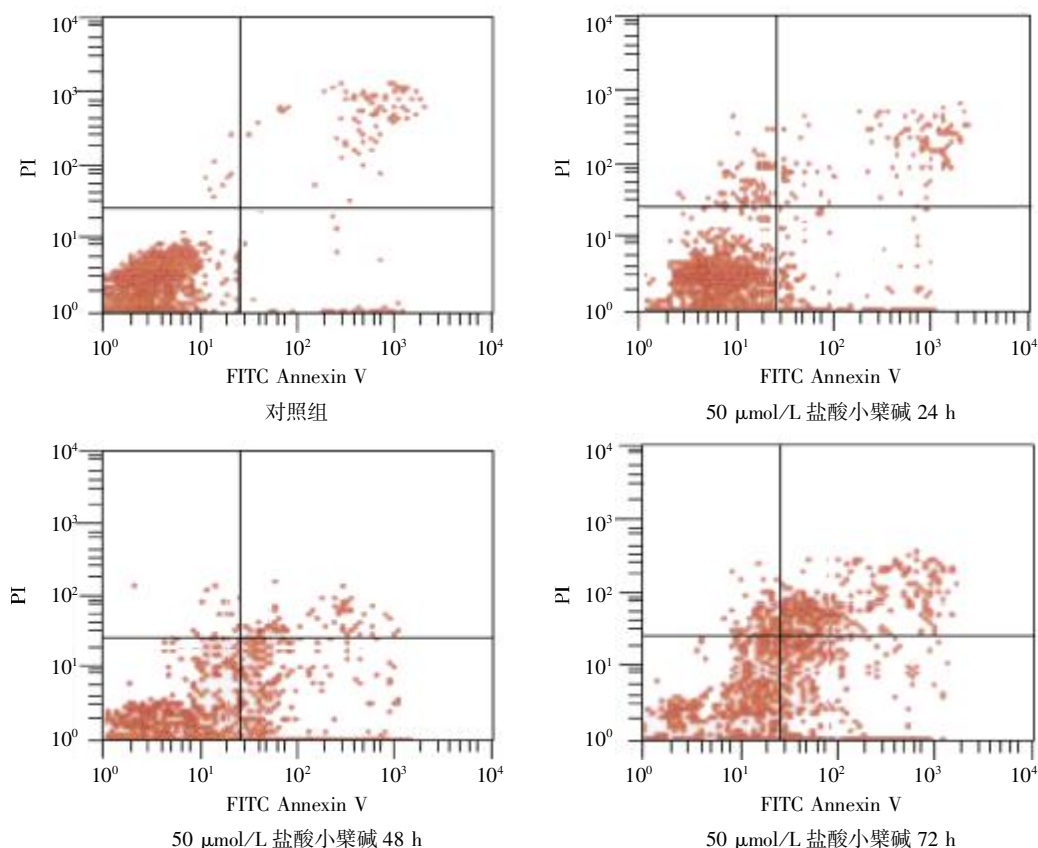


图 2 流式细胞仪检测盐酸小檗碱对 MDA-MB-231 细胞凋亡率的影响

Figure 2 Effect of berberine hydrochloride on the apoptosis of MDA-MB-231 cells observed by flow cytometry

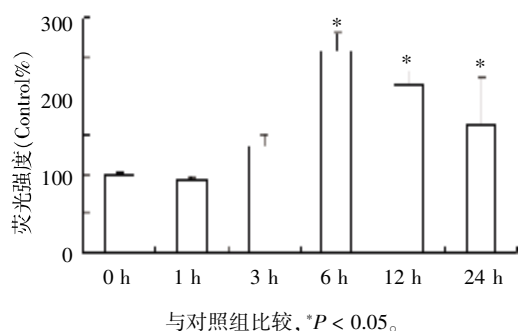


图 3 盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 对 MDA-MB-231 细胞内活性氧簇生成的影响

Figure 3 Effect of berberine hydrochloride 50 $\mu\text{mol/L}$ on the level of intracellular reactive oxygen species in MDA-MB-231 cells

如图 5 所示,盐酸小檗碱孵育 0 h 组为对照组,与对照组比较,盐酸小檗碱 50 $\mu\text{mol/L}$ 孵育 MDA-MB-231 细胞 24、48 h 后,Caspase3 活性显著增加,分别增加至 172.23% 及 250.03%, 呈现时间依赖关系,结果表明盐酸小檗碱对乳腺癌 MDA-MB-231 的生长抑制作用与凋亡途径的激活有关。

3 讨论

小檗碱是从黄连、黄柏等植物中提取的一种异喹啉类生物碱,传统医学对其描述为“性味苦寒,归心、脾、胃、肝、胆、大肠经”,功能清热燥湿、泻火解毒,多用于湿热痞满、呕吐、泻痢、黄疸等^[5]。现已能够人工合成,临床常用的盐酸小檗碱,具有抗菌谱较广、毒性和不良反应较小等特点,常作为抗肠道细菌感染类药物应用^[6]。近年来随着药理学及生物学的发展,关于盐酸小檗碱的研究发现其对许多肿瘤均有治疗作用,包括结肠癌^[7]、胃癌^[8]、前列腺癌^[9]等,但其抗肿瘤机制尚不明确。本文采用培养的 MDA-MB-231 细胞为研究对象,应用 MTT 法、Annexin V/PI 双标活细胞流式细胞仪技术,细胞内活性氧簇、线粒体膜电位检测及 Caspase3 活性的检测等方法观察了盐酸小檗碱对 MDA-MB-231 细胞诱导凋亡作用。

活性氧簇是线粒体氧化磷酸化系统的副产物,生理水平的活性氧簇与细胞的分裂和增殖有关^[10],但细胞内过量的活性氧簇亦对生物膜产生脂质过氧化作用,使生物膜受损,线粒体膜通透性增加,电子

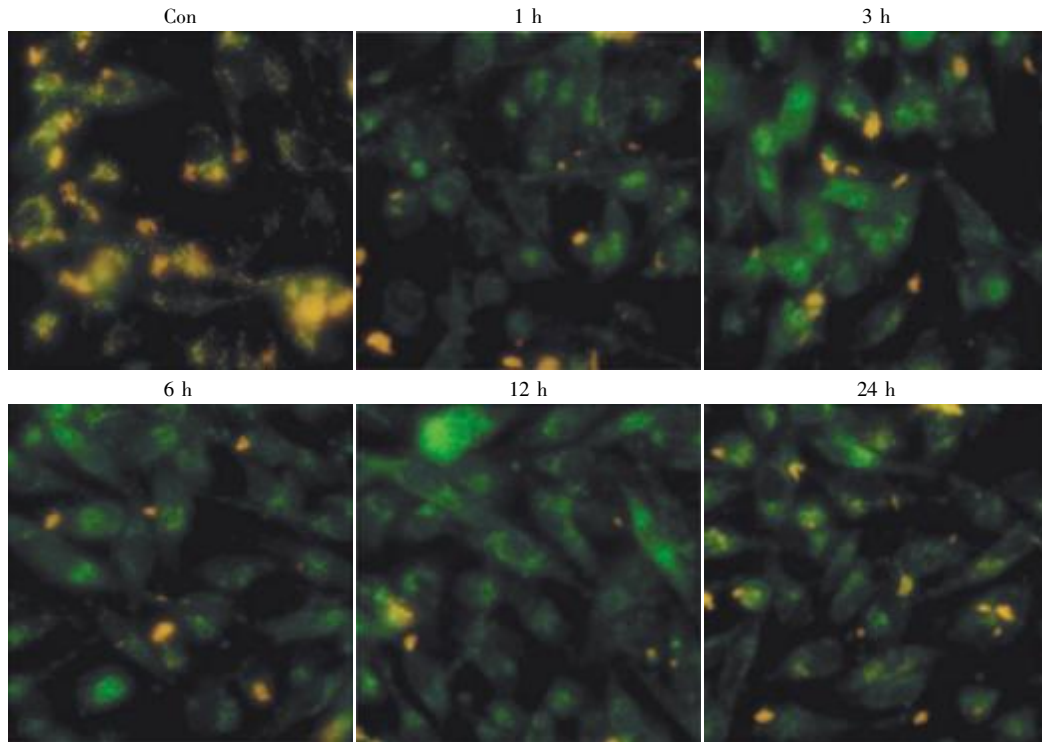
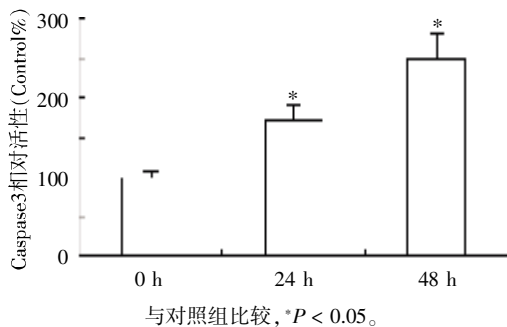


图 4 盐酸小檗碱 50 μmol/L 对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响(JC-1 荧光图片, × 400)

Figure 4 Effect of berberine hydrochloride 50 μmol/L on the level of mitochondrial membrane potential in MDA-MB-231 cells



与对照组比较, *P < 0.05。

图 5 盐酸小檗碱 50 μmol/L 对 MDA-MB-231 细胞 Caspase3 活性的影响

Figure 5 Effect of berberine hydrochloride 50 μmol/L on the level of caspase3 activity in MDA-MB-231 cells

传递链被打破,氧化磷酸化解偶联,线粒体膜电位降低^[11]。Barreto 等^[12]报道盐酸小檗碱带有的季氨基团利于其穿透生物膜,使药物在细胞器,特别是线粒体内聚积。本研究发现盐酸小檗碱可诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞内活性氧簇生成显著增加,细胞线粒体膜电位降低及 Caspase3 活性增高。这可能与线粒体内高浓度盐酸小檗碱抑制 NADH 氧化酶和琥珀酸脱氢酶活性,使线粒体呼吸链受阻,细胞利用

氧障碍,最终导致大量的活性氧簇持续不断地产生、积聚。线粒体既是 ROS 生成的主要部位,同时也是 ROS 攻击的主要靶标,线粒体内的 ROS 生成过多,ROS 大量聚积,最终导致线粒体氧化损伤,线粒体膜电位丢失。线粒体与 Caspase 蛋白酶家族被认为是凋亡过程中的两个调控点,其中线粒体膜电位和 Caspase3 在线粒体途径诱导细胞凋亡过程中极为重要。在凋亡的早期,线粒体在形态学观测中尚无明显变化时,线粒体内跨膜电位的降低被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,出现在细胞核变化(染色质浓缩、DNA 断裂)之前^[13]。一旦线粒体膜电位发生剧变,随之线粒体内外膜间的凋亡因子,如细胞色素 C、凋亡诱导因子释放到胞质,激活 Caspase3 蛋白酶,启动凋亡级联反应则细胞凋亡将不可逆转^[14-16]。

本实验研究结果证实,盐酸小檗碱呈浓度及时间依赖性抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,诱导其凋亡。盐酸小檗碱对 MDA-MB-231 细胞的作用可能是通过诱导细胞内活性氧簇的生成、降低线粒体膜电位,升高 Caspase3 活性,由线粒体途径诱导细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Xu X, Chen J. One-carbon metabolism and breast cancer: an epidemiological perspective [J]. *J Genet Genomics*, 2009, 36(4):203-214
- [2] Kim K, Zang R, Choi SC, et al. Current status of gynecological cancer in China [J]. *J Gynecol Oncol*, 2009, 20(2):72-76
- [3] Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(8):999-1012
- [4] Eom KS, Kim HJ, So HS, et al. Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10):1644-1649
- [5] 缪刚刚, 朱一帆, 陈文, 等. 小檗碱对肾动脉粥样硬化发生、发展的干预作用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(2):172-176
- [6] 杨萍. 黄连素临床应用及研究的新进展 [J]. *天津药学*, 2011, 23(3):69-72
- [7] Wu K, Yang Q, Mu Y, et al. Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1):292-298
- [8] Lin JP, Yang JS, Lee JH, et al. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(1):21-28
- [9] Wang Y, Liu Q, Liu Z, et al. Berberine, a genotoxic alkaloid, induces ATM-Chk 1 mediated G2 arrest in prostate cancer cells [J]. *Mutat Res*, 2012, 734(1-2):20-29
- [10] Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, et al. Redox regulation of cell survival [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(8):1343-1374
- [11] Shabaik YH, Millard M, Neamati N. Mechanistic evaluation of a novel small molecule targeting mitochondria in pancreatic cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54346
- [12] Barreto MC, Pinto RE, Arrabaca JD, et al. Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids [J]. *Toxicol Lett*, 2003, 146(1):37-47
- [13] 王嘉宁, 郭宁. 细胞凋亡的检测技术与方法 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2005, 19(6):466-470
- [14] Bulat N, Widmann C. Caspase substrates and neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Bull*, 2009, 80(4-5):251-267
- [15] Chiappini F, Pontillo C, Randi AS, et al. Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediate hexachlorobenzene-induced cell death in FRTL-5 rat thyroid cells [J]. *Toxicol Sci*, 2013, [Epub ahead of print]
- [16] Pradelli LA, Bénateau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent an-independent cell death [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(10):589-1597

[收稿日期] 2013-04-09

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)