

· 基础研究 ·

PKC α 在不同转移潜能的人肺癌细胞株中的分布和激活转位变化

聂强 朱文 刘伦旭 付军科 李定彪 李印 陈军 吴志浩 周清华

【摘要】背景与目的 PKC是信号转导通路中发挥关键作用的蛋白激酶之一,继往对其在细胞增殖方面的作用研究较多,而对PKC在影响肿瘤的侵袭与转移方面的研究相对较少,这方面的作用机理也不清楚。本研究通过检测不同转移潜能的人高转移大细胞肺癌细胞株中PKC α 亚型在胞内的分布和激活转位情况,以探讨PKC在肺癌侵袭转移中的分子机制。方法 应用Western blot方法、激光扫描共聚焦显微镜观察PKC抑制剂Calphostin C 处理前后具有不同转移潜能的人高转移大细胞肺癌细胞株L9981(原代细胞株)、L9981-PLXSN(空载体细胞株)和L9981-nm23-H1(转基因细胞株)中PKC α 在不同的亚细胞区域的分布、定位和激活转位变化。结果 L9981和L9981-PLXSN中PKC α 主要分布在胞膜,其胞浆蛋白含量明显较L9981-nm23-H1细胞株低($P<0.001$); L9981-nm23-H1细胞中PKC α 主要分布在胞浆,其胞膜蛋白含量明显较L9981和L9981-PLXSN细胞低($P=0.001$);激光扫描共聚焦显微镜观察L9981和L9981-PLXSN细胞中PKC α 主要定位于胞核及核周,处于活性状态;L9981-nm23-H1细胞中PKC α 主要定位于胞浆,处于激活转位前状态;PKC特异抑制剂Calphostin C作用后所有细胞中的PKC α 均主要位于胞浆中,处于未激活状态。结论 PKC亚型的胞内分布和激活转位变化同肺癌细胞的侵袭和转移潜能密切相关。

【关键词】蛋白激酶C 肺肿瘤 蛋白激活转位 细胞株

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.03.034

The variation of intracellular distribution and translocation of the protein kinase C α among human lung cancer cell line with different metastasis potential

NIE Qiang^{* Δ} , ZHU Wen^{*}, LIU Lunxu^{*}, FU Junke^{*}, LI Dingbiao^{*}, LI Yin^{*}, CHEN Jun^{*}, WU Zhihao^{*}, ZHOU Qinghua^{*}

^{*}Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Anshan Road No.154, Heping District, Tianjin 300052, China; ^{Δ} Guangdong

Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

【Abstract】 Background and objective Protein Kinase C (PKC) is one of the key kinases in the cell signal transduction passway. There are more reports about it's ability on cell proliferation, but fewer on invasion and metastasis in the past; and it's mechanisms are unclear. The aim of this study is to analyze the variation of intracellular distribution and translocation of the protein kinase C α among human high-metastatic large cell lung cancer cell line with different metastasis potential, in order to investigate the correlation between the lung carcinoma invasion and metastasis and the PKC isoforms. **Methods** Using Western blot and laser scanning confocal microscope (LSCM) method. The distribution of PKC α in cytosol and plasma membrane and translocation were detected among different metastatic potential human pulmonary carcinoma cells L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 before and after treatment with PKC inhibitor Calphostin C, by Western blot and LSCM. **Results** PKC α in L9981 and L9981-pLXSN was mainly expressed on membrane, which was remarkably higher than those in L9981-nm23-H1 cell line ($P=0.001$); while expression of PKC α in cytosol in L9981 and L9981-pLXSN cell lines, was lower than those in L9981-nm23-H1 cell line ($P<0.001$). The expression of PKC α in cytosol in L9981-nm23-H1 cell line was remarkably higher than those in L9981 and L9981-pLXSN cell lines ($P<0.001$), while expression of PKC α in plasma membrane in L9981-nm23-H1 cell line, was significantly lower than those in L9981 and L9981-pLXSN cell lines ($P=0.001$). PKC α is mainly located in nucleus

本研究受国家自然科学基金重点项目(No.30430300),天津市科技支撑计划重点项目(No.06YFSZSF05300)资助

作者单位: 300052 天津,天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室,天津医科肿瘤医院,天津医科大学总医院(聂强,朱文,刘伦旭,付军科,李定彪,李印,陈军,吴志浩,周清华); 510080 广州,广东省人民医院肿瘤中心肿瘤综合科(聂强)(通讯作者:周清华, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn)

and perinucleus in L9981 and L9981-pLXSN cells, which was in active status. In L9981-nm23-H1 cell line, PKC α is mainly located in soluble cytosolic section, which was in inactive status. After treated with PKC inhibitor Calphostin C, the expression of PKC α in membrane in L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 was downregulated, and PKC α were observed mainly located in cytosolic site in all the three cell lines, which was mainly in inactive status. **Conclusion** The study suggests that PKC isoforms is closely correlated with human lung cancer invasion and metastasis.

【Key words】 Protein Kinase C Lung neoplasms Protein translocation Cell line

This work was supported by a key project of the National Natural Science Foundation of China (No. 30430300) (to ZHOU Qinghua) and Key Project of Tianjin Sci-Tech Support Programme (No.06YFSZSF05300) (to ZHOU Qinghua).

蛋白激酶 (protein kinase C, PKC) 是一族Ca²⁺、磷脂和二酰甘油依赖的丝/苏氨酸蛋白激酶家族, 它是细胞活化包括肿瘤细胞转化的重要信号分子, 在介导细胞的生长、分化和死亡等信号传导中发挥重要作用, 并与肿瘤的发生、发展和侵袭转移等过程密切相关。但有关PKC影响肿瘤细胞侵袭转移的分子机理, 报道较少。本研究比较了不同转移潜能的人肺癌细胞株中PKC α 胞内分布变化和激活转位情况, 以探讨PKC在肺癌侵袭转移中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及仪器 兔源多克隆PKC α 抗体及PKC特异抑制剂Calphostin C (Sigma公司), RPMI1640培养基 (GIBICO产品), 新生小牛血清 (成都哈里生物有限公司), PVDF膜购自Millipore公司, 免疫化学发光的ECL试剂购自Santa Cruz公司, 余试剂均为国产分析纯。细胞培养超净工作台(AIR TECH, 苏净集团), 细胞培养孵箱 (JOUAN), 多光子激光共聚焦显微镜 (美国Bio-rad公司, MRC-1024型), 低温超速冷冻离心机 (美国Beckman), 电泳仪及电转仪 (美国BioRad产品)。

1.1.2 细胞株 人高转移大细胞肺癌细胞株L9981 (nm23-H1基因缺失), 人高转移大细胞肺癌细胞株L9981-pLXSN (转染空载体), 人高转移大细胞肺癌细胞株L9981-nm23-H1-EGFP (转染nm23-H1基因), 均由天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室提供。经实验证实, 前两株细胞的侵袭和转移潜能明显高于后者^[1]。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将上述三株细胞在无菌条件下, 使用RPMI1640培养基, 含有10%的新生小牛血清, 以及链霉素100 μ g/mL和青霉素100 U/mL, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的孵箱培养, 并用0.25%胰酶消化, 进行常规的传代。

1.2.2 细胞分组 三株肺癌细胞株分为两个组。对照组: 三株肺癌细胞株不施加任何处理因素; Calphostin C处理

组: 三株肺癌细胞株分别加入浓度为1.0 μ M的PKC特异抑制剂Calphostin C作用24 h。

1.2.3 胞浆、胞膜蛋白的提取 上述三种细胞生长至对数期并铺满培养皿瓶底后 (细胞数约 1×10^7), 倾去培养液, 用冰预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 将细胞淋洗三遍, 然后加入1 mL预冷的细胞裂解液 I (25 mmol/L Tris PH7.5, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.2 g/L Triton X-100, 5 mg/L Aprotinin, 5 mg/L Leupeptin, 1 mmol/L PMSF), 冰上放置30 min后, 将细胞刮入匀浆器匀浆30次, 100 000g 超离心30 min, 所得上清即为胞液组分。吸去上清, 将沉淀用0.5 mL裂解液 II (25 mmol/L Tris PH7.5, 2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 10 g/L Triton X-100, 5 mg/L Aprotinin, 5 mg/L Leupeptin, 1 mmol/L PMSF) 悬浮, 超声波增溶10 s, 冰上放置30 min, 再次用100 000 g超离心30 min, 所得上清即为膜组分。各组分蛋白质浓度用Brandford方法测定并使其标准化。

1.2.4 Western blot方法测定PKC 将2 \times SDS凝胶加样缓冲液 (0.1 mMol Tris-Cl, PH6.8, 2M DTT, 4%SDS, 0.2%溴酚兰, 20%甘油) 与蛋白质样品等体积混合均匀, 然后将混合好的样品置于沸水中煮沸5 min, 离心后上样。浓缩胶电压为60 V, 电泳20 min。分离胶电压为90 V, 电泳100 min。将电泳后凝胶取下, 置于电转液在恒压60 V下电转100 min。电转完后, 取出PVDF膜, 加入封闭液 (5%脱脂奶粉, TBS, 0.05% Tween-20), 置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。然后用含0.05% Tween-20的TBS (TBS-T) 洗涤。加入稀释的一抗 (1:100, 溶于TBS-T中), 常温下摇动温育2 h, TBS-T洗。加入稀释的二抗 (1:8000溶于TBS-T中), 常温下摇动温育2 h, TBS-T洗涤。在暗室中, 将ECL混合液倒入PVDF膜上, 行底片显影、曝光。应用Bio-rad2000凝胶成像仪将X线胶片上的Western blot阳性信号条带进行灰度扫描, 以其积分吸光值IOD大小反映信号的相对强弱。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜观察三株癌细胞中PKC激

活转位情况 三株细胞在盖玻片上正常生长48 h后, 经10%甲醛固定, 100%甲醇打孔, 0.1%BSA作用1 h后加入兔源多抗(稀释度为1:100) PKC α , 4 $^{\circ}$ C过夜, PBS洗3次, 加入FITC标记的二抗IgG(1:50稀释), 37 $^{\circ}$ C暗处1 h, 90%甘油封片, 镜检, 以PBS代替一抗作为阴性对照。多光子激光共聚焦显微镜下观察PKC α 的转位情况。共聚焦显微镜扫描参数为: 激发波长488 nm, 发射波长522 nm, Iris 6.5, Pixel Size 1.29/ μ m, Power 30%, Gain 1300。实验均重复三次。

1.3 统计学处理 本实验数据为计量资料, 应用方差分析或*t*检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 三株细胞中胞膜、胞浆PKC的表达 Western blot结果显示: 原代细胞株L9981和空载体细胞株L9981-PLXSN中PKC α 主要分布在胞膜, 其胞浆PKC α 含量明显较转染nm23-H1基因的人肺癌细胞株L9981-nm23-H1低($F=47.026, P < 0.001$); L9981-nm23-H1细胞中PKC α 主要分布在胞浆, 其胞膜PKC α 含量明显较L9981和

L9981-PLXSN细胞低($F=12.178, P=0.001$), 而L9981和L9981-PLXSN间胞膜、胞浆PKC α 含量差异无统计学意义($P=0.192; P=0.547$) (图1、图2)。

2.2 三株细胞中PKC转位情况 激光扫描共聚焦显微镜观察L9981和L9981-PLXSN细胞中PKC α 主要定位于核及核周, 尤以胞核明显, 处于活性状态(图3A); L9981-nm23-H1细胞中PKC α 主要定位于胞浆, 在胞浆中呈弥漫分布, 核周表达极少, 处于激活转位前状态(图3A)。

2.3 Calphostin C作用后, 三株细胞中胞膜、胞浆PKC表达变化 加入PKC特异抑制剂Calphostin C作用后, L9981和L9981-PLXSN两株细胞中胞膜PKC α 较作用前明显减少($t=10.775, P=0.009; t=6.223, P=0.025$), 而胞浆PKC α 较作用前明显增加($t=17.530, P=0.003; t=19.235, P=0.028$); L9981-nm23-H1细胞中胞膜PKC α 的减少和胞浆PKC α 的增加较作用前比较变化无统计学意义($t=2.090, P=0.172; t=3.237, P=0.351$) (图4, 图5, 表1); 激光扫描共聚焦显微镜观察PKC特异抑制剂Calphostin C作用后三株细胞中的PKC α 均主要

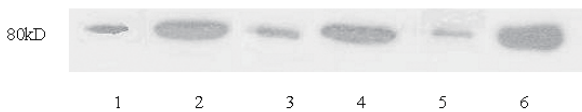


图1 L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1肺癌细胞株胞浆、胞膜PKC α 蛋白表达

Fig 1 Expression of PKC α in cytosol and cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines
1: L9981-cytosol; 2: L9981-cytosol; 3: L9981-pLXSN- cytoplasm;
4: L9981-pLXSN- cytosol; 5: L9981-nm23-H1-cytosol;
6: L9981-nm23-H1-cytosol

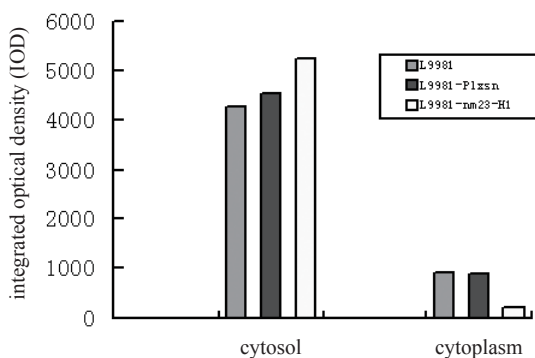


图2 人高转移大细胞肺癌细胞株L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1胞浆、胞膜PKC α 蛋白表达量(IOD值)的比较

Fig 2 Comparison of PKC α expression in cytosol and cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines

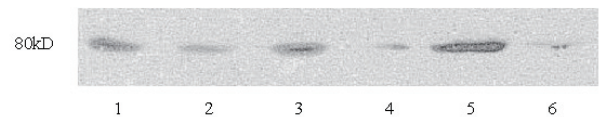


图4 1.0 μ M Calphostin C处理人肺癌细胞株L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1 24 h后PKC α 蛋白表达

Fig 4 Expression of PKC α in cytosol and cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines after treated with 1.0 μ M Calphostin C for 24 h
1: L9981-cytosol; 2: L9981-cytosol; 3: L9981-pLXSN- cytosol;
4: L9981-pLXSN- cytoplasm; 5: L9981-nm23-H1-cytosol;
6: L9981-nm23-H1-cytoplasm

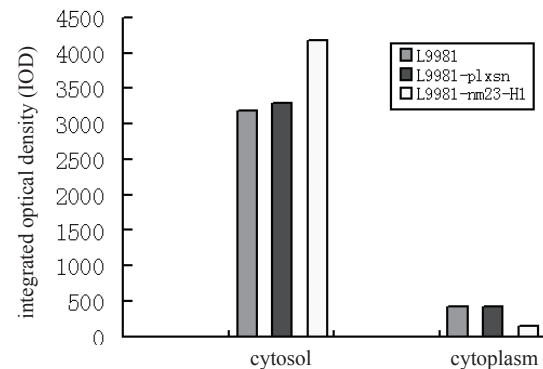


图5 1.0 μ M Calphostin C处理人肺癌细胞株L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1 24 h后胞浆、胞膜PKC α 蛋白表达量(IOD值)的变化

Fig 5 The change of PKC α located in cytosol and cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines after treated with 1.0 μ M Calphostin C for 24 h

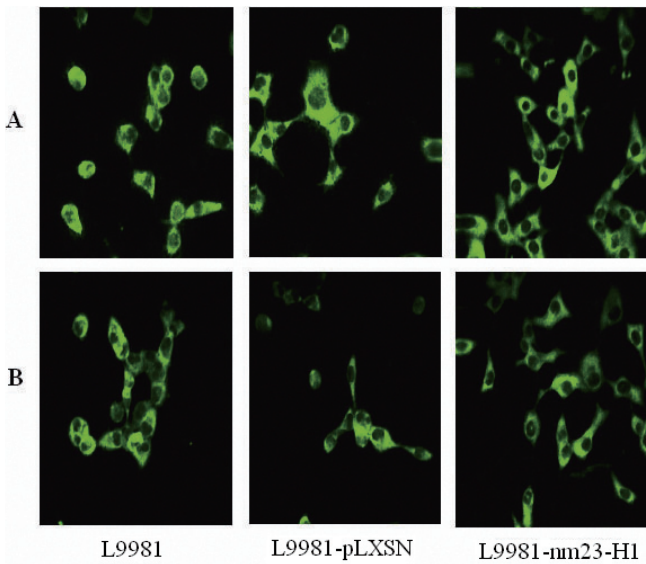


图3 PKC抑制剂Calphostin C处理前后L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1人肺癌细胞株细胞中PKC α的表达变化
A: 对照组; B: 处理组

Fig 3 The change of PKC α located in cytosol and cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines before and after treated with 1.0 μM Calphostin C for 24 h (FITC-mouse anti rabbit second antibody; ×200)
A: untreated; B: treated

表1 1.0 μM Calphostin C处理前后人肺癌细胞株L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1胞膜PKC α蛋白表达量(IOD值)的百分比比较

Tab 1 Comparison of the ratio of PKC α expression in cytoplasm among L9981, L9981-pLXSN and L9981-nm23-H1 lung cancer cell lines before and after treated with 1.0 μM Calphostin C

Cell lines	Ratio of PKC α expression (cytoplasm / cytosol+cytoplasm, %)		t	P
	untreated	treated		
	L9981	17.5		
L9981-pLXSN	16.3	11.3	6.223	0.025
L9981-nm23-H1	3.9	3.5	2.090	0.172

位于胞浆中，处于未激活状态（图3B）。

3 讨论

侵袭、转移是恶性肿瘤基本特征之一，现在已明确PKC在这一过程中起关键性作用。Takuwa 等^[2]发现PKC的活化可增加SCLC细胞对细胞外基质蛋白（ECM）的粘附，增加β-整合素的结合活性，导致SCLC细胞粘附于ECM蛋白，提示PKC与肿瘤的起源发生和转移有关。但PKC调节肺癌细胞侵袭转移的详细机

制尚不清楚。

研究表明^[3,4]：PKC某些亚型的活性、含量及细胞内的分布改变是跨膜信息传递中异常调控信息的一种表征。LaPorta等^[5]研究了PKC亚型在亚细胞结构的分布和表达在肝癌细胞肺转移灶中的作用，发现在肿瘤细胞和肺癌淋巴结转移病灶中PKC α表达明显增加，肿瘤细胞核PKC β的活性增加且在转移淋巴结中表达明显增加，这一结果表明：胞核PKC β可能在继发性肿瘤的发展中起一定作用。赵冬梅等^[6]分析比较了肺恶性肿瘤及正常肺组织中PKC亚型的分布变化，发现PKC α、PKC β在恶性肿瘤中的含量较正常有不同程度的增加，而且PKC α在膜上的表达明显较正常肺组织高。说明了PKC亚型的分布变化是PKC调控肺癌发生的分子机制之一。那么，在对肺癌的侵袭转移的调控过程中，PKC是否也存在着同样的变化呢？

本研究经Western blot检测，发现高侵袭转移性能的人高转移大细胞肺癌细胞株L9981和L9981-pLXSN胞膜中PKC α蛋白的表达量显著高于低侵袭转移性能的人大细胞肺癌细胞株L9981-nm23-H1 PKC α蛋白的表达量；L9981-nm23-H1胞浆中PKC α蛋白表达量显著高于L9981和L9981-pLXSN肺癌细胞株，而L9981与L9981-pLXSN胞浆、胞膜中PKC α蛋白表达量比较无统计学差异；用PKC的抑制剂Calphostin C处理L9981、L9981-pLXSN和L9981-nm23-H1肺癌细胞株细胞后，PKC α在胞浆、胞膜的蛋白表达量均显著下降，其中胞膜的蛋白表达量下降尤其明显。上述结果表明PKC亚型在亚细胞区域的分布变化可能是PKC调控肺癌侵袭转移的分子机制之一。

研究发现，只有膜转位的PKC同功酶，才与肿瘤侵袭与转移能力有关^[7]。因为静息状态下，细胞中PKC几乎是以无活性的形式存在于胞浆中，而只有处于活性状态的PKC，才能发挥其相应功能。Rayadu^[7]报道：当促癌剂TPA处理B16黑色素瘤细胞株，则引起PKC膜转移，同时证明发生膜转移的PKC能够促进肿瘤细胞的移行转移。膜PKC活性涉及诱导肿瘤转移表型，而且高转移细胞膜PKC活性明显高于低转移细胞^[8,9]。本实验发现：高侵袭和转移能力的人肺癌细胞株L9981和L9981-pLXSN细胞中膜PKC α蛋白表达量明显较低侵袭和转移能力的人肺癌细胞株L9981-nm23-H1胞膜PKC α蛋白表达量高，说明在L9981和L9981-pLXSN细胞中PKC α的活性明显高于L9981-nm23-H1细胞中PKC α的活性；激光扫描共聚焦显微镜观察见L9981和L9981-PLXSN

细胞中PKC α 主要定位于胞核及核周,处于活性状态;L9981-nm23-H1细胞中PKC α 主要定位于胞浆,处于激活转位前状态;PKC特异抑制剂Calphostin C作用后,三株肺癌细胞株中膜PKC α 含量均较处理前明显下降,所有细胞中的PKC α 均主要位于胞浆中,处于未激活状态。随后的实验也证实抑制剂处理后L9981和L9981-PLXSN的侵袭转移能力明显降低。这进一步表明肺癌侵袭转移主要同其膜PKC α 活性相关;不同侵袭转移潜能的肺癌细胞PKC α 的激活转位情况不同。因此,PKC亚型的激活转位变化也是PKC调控肺癌侵袭转移的分子机制之一。

参 考 文 献

- Zhou QH, Che GW, Qin Y, et al. Experimental study on the nm23-H1 gene reversing for metastatic phenotype of lung cancer. *Chin J Lung Cancer*, 2003, 6(2):141-143. [周清华, 车国卫, 覃杨, 等. nm23-H1基因逆转肺癌转移表型及其分子机制的实验研究. *中国肺癌杂志*, 2003, 6(2): 141-143.]
- Takuwa N, Zhou Wei, Takuwa Y. Activator of protein kinase C induce P34cdc2 histone H1 Kinase stimulation is swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 188(3): 1084-1089.
- Borner C. Transformation of a ras oncogene causes increased expression of protein kinase C α and decreased expression of protein kinase C- ϵ . *Cell Growth Differ*, 1990, 1(12): 653-658.
- Delage S. Increased protein kinase C- ϵ expression in human colonic caco-2 cells after insertion of human Ha-ras or ppyoma virus middle T oncogenes. *Cancer Res*, 1993, 53(12): 2767-2774.
- La-Porta CAM, Tossitore L, Comolli R. Changes in protein kinase C and in nuclear isoform expression in tumor and lung metastatic nodules induced by diethylnitrosamine in the rat. *Carcinogenesis*, 1997, 18(4): 715-719.
- Zhao DM, Xu XZ, Xue HH, et al. A study on the change of protein kinase C and its subtype in lung cancer. *J Chin Med Univ*, 1996, 25(4): 373-376. [赵冬梅, 许秀珍, 薛海晖, 等. 蛋白激酶C及其亚型在肺癌恶性肿瘤中变化的研究. *中国医科大学学报*, 1996, 25(4): 373-376.]
- Gopalakrishna R, Barsky SH. Tumor promoter-induced membrane-bound protein kinase C regulated hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(2): 612-617.
- Liu B, Renaud C, Nelson KK, et al. Protein kinase C inhibitor calphostin C reduces B16 amelanotic melanoma cell adhesion to endothelium and lung colonization. *Int J Cancer*, 1992, 52(1): 147-152.
- Peng T, Yao C, Xue L. Inhibition of experimental metastasis and cell adhesion of B16 murine melanoma cells by protein kinase C inhibitor CJ9111. *Chin J Oncol*, 1996, 18(3):177-180. [彭涛, 姚晨, 薛岚, 等. 蛋白激酶C抑制剂CJ9111抑制小鼠黑色素瘤B16细胞粘附和实验性转移. *中华肿瘤杂志*, 1996, 18(3): 177-180.]

· 启 事 ·

《中国肺癌杂志》自2008年应用DOI系统

DOI (Digital Object Identifier) 意为“数字对象标识符”,是一种对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的工具,被形象地称为数字资源的条形码。DOI是一个永久性的标识号,由International DOI Foundation (IDF) 管理。目前,西文DOI的发展已经比较成熟。多数西文出版社和全文数据库均采用DOI作为文章的唯一标识。

应用中文DOI的意义可以概括为以下几点:

- (1) 为中文数字资源提供符合国际标准和规范的唯一标识,有利于中文数字资源的长期保存和定位;
- (2) 通过DOI与外部资源,包括中文资源和外文资源,一次文献和二次文献,科技文献和科学数据的链接,建立动态的、开放的、互动的知识链接体系,整体提升数字信息资源的数用率,促进行业共赢;
- (3) 通过DOI的引入,逐步实现中西文数字资源的链接,为建立统一的中英文知识链接系统提供技术标准和平台;
- (4) 为国家科技基础条件平台建设提供支撑,在标识体系的层面实现包括科技文献和科学数据在内的资源整合,从而建立一个基于分布式环境的科技基础条件平台;
- (5) 为标识数字对象的版权状态提供基础。

《中国肺癌杂志》2008年文章DOI标识规则为: 10.3779/j.1009-3419.2008.**.***

通过doi查找原始文献的方法

国际: <http://dx.doi.org/>, <http://www.crossref.org>

国内: <http://www.chinadoi.cn/>