

siRNA 沉默肾癌细胞 EGFR 基因对放疗敏感性影响的研究*

褚晗¹ 于德新¹ 张志强¹ 黄韵² 谢栋栋¹ 王毅¹ 张涛¹
陈磊¹ 丁德茂¹ 邹慈¹ 闵捷¹ 王大明¹

[摘要] 目的:探讨 siRNA 沉默 ACHN 肾癌细胞的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)对放疗敏感性的影响。方法:免疫组化及细胞免疫荧光技术证明组织水平及细胞水平 EGFR 的表达,化学合成针对 EGFR 的小干扰 RNA,通过脂质体转染法转染进 ACHN 肾癌细胞中,利用 Western blot 技术检测细胞中 EGFR 蛋白的表达,然后分别用 0、2、4、6、8Gy 剂量的 X 线对 5 组肾癌细胞(每组包含空白对照组、非特异性 RNA 干扰组、特异性 RNA 干扰组)进行照射,光学显微镜下观察细胞凋亡情况,采用台盼蓝拒染法检测细胞凋亡率。结果:靶向 EGFR 序列的特异性干扰 RNA 可明显抑制 EGFR 蛋白的表达,光学显微镜下观察到 RNAi 联合放疗组细胞死亡情况明显,台盼蓝拒染法检测特异性干扰 EGFR 基因组可显著提高 ACHN 肾癌细胞对放疗的敏感性($P < 0.05$)。结论:体外研究表明,siRNA 沉默 ACHN 肾癌细胞的 EGFR 可明显提高肾癌细胞对放疗的敏感性,为肾癌放射治疗提供了新思路。

[关键词] 肾癌;表皮生长因子受体(EGFR);RNAi;放疗

[中图分类号] R737.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)04-0246-05

The effects of EGFR gene RNAi on the radiosensitivity of renal cell carcinoma

CHU Han¹ YU Dexin¹ ZHANG Zhiqiang¹ HUANG Yun² XIE Dongdong¹ WANG Yi¹
ZHANG Tao¹ CHEN Lei¹ DING Demao¹ ZOU Ci¹ MIN Jie¹ WANG Daming¹

(¹Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, 230601, China; ²Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale and School of Life Sciences, University of Science and Technology of China)

Corresponding author: YU Dexin, E-mail: yudx_urology@yahoo.com

Abstract Objective: To study the effects of down regulation of epidermal growth factor receptor(EGFR)gene on the radiosensitivity of renal cell carcinoma. **Method:** We used immunohistochemical and immunofluorescence to examine the level of EGFR expression in renal cell carcinoma. ACHN cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) by Liposome transfection reagent targeting human EGFR. The expression level of EGFR was detected by Western blot analysis. The ACHN cells are divided into two groups, 1): single radiotherapy and 2): RNAi combined with radiotherapy. Both of the groups were irradiated with 0, 2, 4, 6, 8 Gy X-ray. We observed cell morphology under opti-microscope. The cell death curves were determined by trypan blue staining. **Result:** Sequence-specific shRNA targeting EGFR gene could suppress the expression of EGFR gene remarkably; Cell death were more prominent in group 2) than in group 1). **Conclusion:** EGFR RNAi significantly enhanced radiosensitivity of renal carcinoma cells.

Key words renal cell carcinoma; EGFR gene; RNA interference; radiotherapy

肾癌(renal carcinoma)是泌尿系常见肿瘤之一,其中肾细胞癌(renal cell carcinoma)占 70%~80%,发病率和死亡率也逐年上升。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在肾细胞癌中高表达^[1]。肾癌对放、化疗敏感性差,对免疫治疗的有效率也偏低,外科手术仍然为治疗

肾癌的主要手段。EGFR 在肿瘤中的高表达与肿瘤放化疗敏感性差存在一定相关性,研究报道应用 EGFR 的靶向治疗药物联合放疗或其他化疗药物可提高对肿瘤细胞的杀伤力^[2,3]。本实验应用 RNAi 技术,沉默 ACHN 肾癌细胞的 EGFR,联合放射治疗,研究 EGFR 基因与肾癌放疗敏感性的关系,为肾癌的基因联合放射治疗提供理论基础,为晚期肾癌的治疗提供新的手段。

1 资料及方法

1.1 临床资料

肾癌组织标本取自 2011 年 1 月~12 月安徽

*基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号 ZD200907)

¹安徽医科大学第二附属医院泌尿外科(合肥,230601)

²合肥微尺度物质科学国家实验室 中国科技大学生命科学院分子细胞遗传学实验室

通信作者:于德新, E-mail: yudx_urology@yahoo.com

医科大学第二附属医院泌尿外科,共20例,分别取肿瘤组织和正常肾组织。所有患者术前均未做放疗治疗。其中男15例,女5例,年龄41~78岁,平均60.9岁;左肾癌10例,右肾癌10例;病理均为肾透明细胞癌,远处转移3例。依照2009年AJCC肾癌TNM分期:I期10例,II期6例,III期1例,IV期3例。根据Fuhrman标准分级:I级0例,II级16例,III级4例,IV级0例。

人肾细胞癌细胞株(ACHN)购于中国典型培养保藏中心,胰蛋白酶、RPMI-1640细胞培养液购自美国Gibco公司,胎牛血清购自Hyclone公司,羊抗兔IgG二抗、兔抗人 β -actin多克隆抗体、四甲基偶氮唑盐(MTT)和DAB显色试剂盒购自美国Sigma公司,兔抗人EGFR单克隆抗体购自Cell Signaling公司,Lipofectamine-2000转染试剂购自Invitrogen公司,RIPA组织细胞裂解液购自碧云天公司,鼠抗兔荧光二抗购于Molecular probes公司。

1.2 方法

采用免疫组化技术检测EGFR在组织中的表达情况。10%福尔马林溶液固定的肾癌组织标本经石蜡包埋厚4mm连续切片,附着于载玻片上,空气中干燥,然后烤箱中95℃加热10min。二甲苯脱蜡后经梯度乙醇水化,用3ml/L的过氧化氢溶液抑制内源性过氧化物酶,进行抗原修复;切片浸泡在枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中微波炉加热修复10min后,正常山羊血清封闭,加入EGFR(工作浓度1:200)后,37℃孵育30min,置4℃冰箱中过夜。次日PBS充分洗涤5min×3次,滴加生物素标记二抗工作液,37℃或室温孵育30min。PBS冲洗5min×3次,滴加第二代辣根酶标记链霉卵白素工作液,37℃或室温孵育15min。PBS冲洗,5min×3次,37℃孵育15min,PBS漂洗之后DAB显色,苏木精复染、乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察。

应用细胞免疫荧光技术检测ACHN肾癌细胞中EGFR的表达情况。制作细胞爬片,选择适当密度的细胞爬片进行细胞固定,将带有细胞的爬片用PBS快速洗3次,用4%的多聚甲醛固定10min,后再用PBS洗三次,一次3min,用2%的Triton X-100透化穿膜5min,将透化后的盖玻片无细胞面擦干,用指甲油粘在载玻片上,加含5%FBS和0.1%Tween-20的PBS于盖玻片细胞面,常温放在湿盒中30min,加一抗,封口膜覆盖放入4℃冰箱过夜。PBS洗三次,加荧光二抗,室温60min,PBS洗3次,DAPI染色,将吸水纸将DAPI液吸干,加抗淬灭剂,封片。

将EGFR siRNA转染进入ACHN肾癌细胞系。siRNA的设计及合成,根据siRNA的设计原则并参考文献(5、6)选取针对EGFR的特异性

siRNA序列:sense5'-GAAGGUGAGAAAG-UUAAAAUUCCTT-3',阴性对照siRNA序列:sense5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。以上RNA序列均由上海吉玛制药公司化学合成。

细胞培养分组及siRNA转染:ACHN置于含10%小牛血清、100 U/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养液中,置于CO₂体积分数5%、37℃湿度条件下培养。实验分为空白对照组、阴性对照组(加入为siRNA及转染试剂)、EGFR-siRNA组(加入EGFR-siRNA及转染试剂)。取对数生长期细胞,用胰酶消化调节细胞浓度后接种于P30细胞培养皿中。细胞生长至70%~80%时。按照脂质体Lipofectamine-2000转染试剂盒操作步骤进行siRNA转染。继续培养。转染4~6小时后换液,根据实验需要收集细胞。

Western印迹检测EGFR的表达:依据上述分组。RNA干扰72小时后,用PBS漂洗细胞两遍。收集细胞,用组织蛋白裂解液裂解细胞,置入冰上30min,以10 000 r/min速率离心2min。取上清10 μ l,加入等体积的2×上样缓冲液,震荡,煮沸5min。用BCA试剂盒测定总蛋白浓度。定量后上样,SDS-PAGE凝胶电泳,150 V电泳溴酚蓝至凝胶底部。320 mA恒流2h后,将蛋白转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭液于4℃封闭过夜,TBST漂洗3次,加入兔抗人EGFR单抗(1:1 000),孵育2h,用TBST洗膜3次。加二抗,于室温孵育1h。TBST洗膜,显色。

对细胞进行放疗处理。再次培养ACHN细胞,分为空白对照、非特异性RNA干扰组、特异RNA干扰组,转染方法按上述方法进行。24小时后传代并接种到15个P30皿里。实验分组:按放射剂量分为0、2、4、6、8 Gy五个组,每个组中包含空白对照、非特异性RNA干扰组、特异RNA干扰组。siRNA转染后的第72小时行放射处理。

倒置显微镜下观察细胞形态变化及凋亡情况。台盼蓝拒染法检测放疗后细胞凋亡率:将经辐射后的每组细胞消化接种到24孔板,每组复3孔,常规培养48小时后,配置台盼蓝工作液,将细胞消化后,将细胞混悬液与台盼蓝工作液1:1混匀,室温静置3min,用细胞计数板计数染色的凋亡细胞数目。

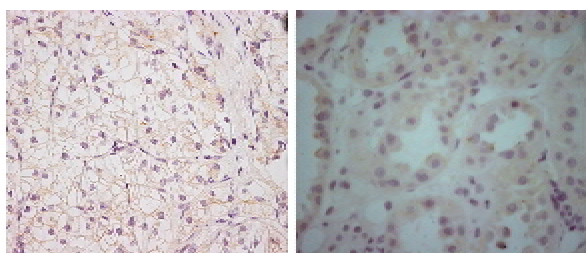
1.3 统计学处理

各数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS 13.0分析软件包,采用t检验或方差分析比较组间差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

我们应用免疫组化技术对所收集的20例病例组织进行染色,显微镜下观察EGFR在肾癌中的表达情况,发现肾癌组织的EGFR呈膜表达,而正常肾组织则为胞质表达,与Pu等^[4]所研究结果一

致(图 1)。细胞免疫荧光见图 2。



肾癌 EGFR 受体呈现细胞膜表达;正常肾组织 EGFR 受体呈现胞质内表达

图 1 免疫组织化学检测 EGFR 在肾癌组织及正常肾组织的表达情况($\times 40$)

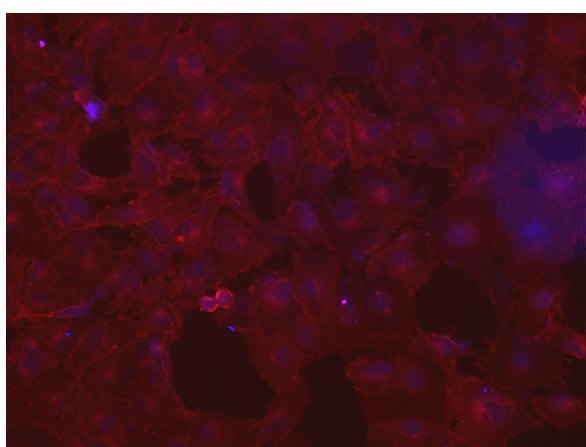


图 2 免疫荧光显示,EGFR 在 ACHN 肾癌细胞膜上存在高表达($\times 40$)

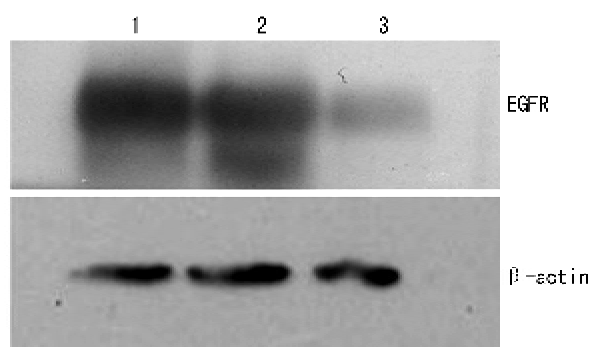
Western blot 检测 RNAi EGFR 后蛋白表达情况,siRNA 转染后 EGFR 表达情况明显低于对照组及阴性对照组,说明 ACHN 细胞中高表达 EGFR,经转染处理后,肾癌 ACHN 细胞的 EGFR 含量明显降低(图 3)。

放疗后 48 小时在显微镜下我们观察到,随着辐射剂量的增加,漂浮的死亡细胞数量随之增加,贴壁肿瘤细胞数目也逐渐减少。与空白组相比,我们发现 RNAi 联合放疗组的细胞死亡数目明显增加,细胞贴壁数目明显减少,siRNA 联合辐射剂量为 6 Gy 组及 8 Gy 组最为明显,漂浮的细胞明显增多(图 4)。

台盼蓝染色计数 RNAi 沉默 EGFR 基因后放疗对 ACHN 肾癌细胞的杀伤力见图 5。

3 讨论

肾癌是泌尿系统常见的肿瘤之一,近年其发病率及死亡率均呈逐年增加趋势,虽然外科手术已成为治愈早期肾癌可能手段,但对于部分中晚期肾癌效果不佳,而肾癌对放化疗不敏感,使得放疗成为晚期肾癌姑息性治疗方法。因此,寻找放疗的增敏方法成为研究的热点。放疗是通过电离辐射



1:空白对照组;2:阴性对照组;3:siRNA 组

图 3 siRNA 作用 ACHN 肾癌细胞 72 小时后 EGFR 表达情况

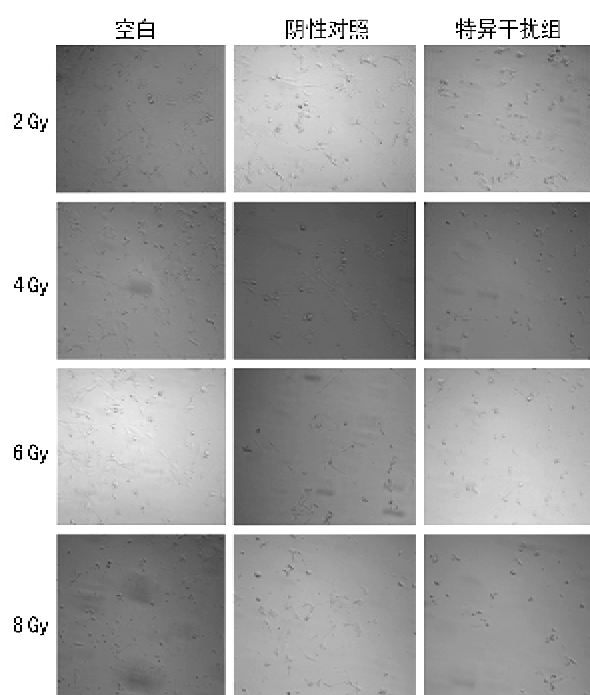
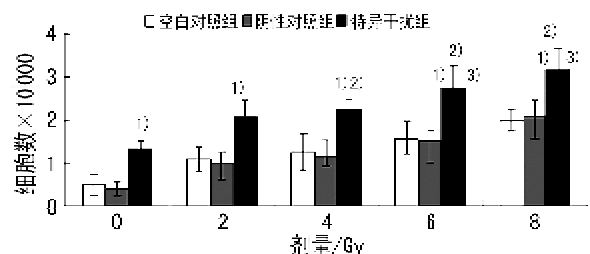


图 4 辐射后倒置显微镜下观察细胞凋亡情况($\times 10$)



¹⁾表示各组内特异干扰组与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);²⁾表示 0 Gy 组与 4、6、8 Gy 组中的特异干扰组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(t 检验);³⁾表示 0 Gy、6 Gy 及 8 Gy 组中的空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)

图 5 辐射 48 小时后台盼蓝检测细胞凋亡

直接和间接的作用导致 DNA 碱基损伤、单链和(或)双链断裂以及 DNA 链交联,造成肿瘤细胞

膜、胞浆蛋白及 DNA 的损伤,激活、下调肿瘤相关基因的表达,从而改变相关生物大分子的特性,干预了细胞膜、细胞核和胞浆内的信号转导途径,导致细胞周期停滞、氧化应激及细胞凋亡,并降低 DNA 修复功能。在 DNA 损伤感受器、细胞周期检测点、DNA 损伤修复、氧化应激调节酶类和细胞凋亡途径的相关调节蛋白,均可能成为影响放疗敏感性的潜在靶点,而作为与上游环节密切相关的 EGFR,已成为目前肿瘤放疗增敏研究领域研究的热点^[5]。

EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一,在许多实体瘤高表达,如头颈部肿瘤、肺癌、结直肠癌、肾癌、膀胱癌等,其中 50%~90% 的肾癌中高表达 EGFR^[6],EGFR 与肿瘤细胞的增殖、生长、转移、侵袭及放化疗耐受中相关,所以针对 EGFR 进行基因治疗成为近年研究的热点。EGFR 在肿瘤细胞中的高表达与对放疗敏感性呈负相关^[7],Aki-moto 等^[8]研究发现 EGFR 高表达的肿瘤其对放疗敏感性差,在 EGFR 高表达的肿瘤中,放疗可以激活 EGFR 的自身磷酸化,并增加了酪氨酸蛋白激酶的活性,有利于肿瘤细胞的分化、增殖、迁移等。此外,放疗联合 EGFR 靶向治疗药物可增加细胞毒性并降低细胞浸润与迁徙。Gorski 等^[9]研究发现抗 EGFR 单克隆抗体与放疗联合应用的抗肿瘤作用,可因其加强 EGFR 的信号抑制作用,进一步增强了放疗产生的细胞毒作用。Zhang 等^[10]将西妥西单抗联合放疗对人肺鳞癌细胞进行体外实验研究,结果显示西妥西单抗可以增加肿瘤细胞对放疗的敏感性,导致肿瘤细胞大量凋亡,其机制为西妥西单抗阻断了 PI3K 通路,减少了 AKT 的磷酸化,激活了 caspase-9,并在凋亡过程中用 caspase-3 水解肿瘤细胞的 DNA,最终使细胞凋亡。Dittmann 等^[11]在探索 EGFR 对放疗耐受机制时,发现肿瘤细胞经放射治疗后,EGFR 则被辐射激活并向细胞核内转移,与 DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)的激活相关,而西妥西单抗可与 EGFR 胞外区域结合,阻止了 EGFR 进入细胞核,使细胞质中 DNA-PK 增多,但核内不足,从而使肿瘤细胞不能有效修复 DNA 损伤而增加辐射敏感性,他们还提到 EGFR 的下游通路,如 PI3K 通路,也与肿瘤对放疗敏感性差有一定关系。Joensuu 等^[12]选取了 42 例前列腺癌患者,口服 EGFR 靶向治疗药物吉非替尼联合放射治疗,结果显示联合治疗耐受性好,总体生存率较单独放疗高。EGFR 靶向药物的广泛应用对某些肿瘤的治疗带来希望的同时又出现了部分肿瘤对 EGFR 靶向治疗药物耐药的新难题。Siddiqui 等^[13]研究分析了结肠癌患者对西妥西单抗耐药情况,发现 EGFR 下游通路中的 KRAS 基因的突变导致了结肠癌细胞对西妥西单

抗的耐药性,表达野生型 KRAS 基因的结肠癌患者使用西妥西单抗联合化疗治疗效果较突变型 KRAS 效果好。Gazdar^[14]总结分析并研究针对非小细胞肺癌治疗中出现的 EGFR 靶向治疗耐药情况,肺癌耐药性与 T790M、D761Y 突变或其他受体通路的活化(如 IGF-1R、FGFR、PDGFR 等)相关。

随着生物学技术尤其基因治疗的发展,对放疗增敏机制研究的深入,有效的将肿瘤基因治疗-放射治疗相结合,可以降低等效放射剂量,减少正常组织的损伤,减少放疗副作用的产生,这种“基因放疗”成为是肿瘤研究及治疗领域的趋势,其中以 RNAi 基因治疗技术为基础的“基因治疗”成为研究的热点。本实验中我们推断,应用 RNAi 技术沉默 EGFR 表达后放疗敏感性增加可能与阻止 EGFR 下游相关通路的激活,阻碍 EGFR 向核内的转移,使 DNA 损伤不能够得以修复有关。

RNAi 作用机制是由互补的内源或外源 RNA 形成的双链 RNA 诱发基因沉默。RNAi 具有高特异性、高效性、高稳定性、可遗传性等特点,其在肿瘤的基因的研究和治疗方面已表现出了强大的潜力。O'Grady 等^[15]应用 RNA 干扰技术沉默宫颈癌细胞的 EGFR 研究增加对小分子酶抑制剂的治疗效果,发现 RNAi 后可以克服肿瘤细胞对小分子抑制剂的耐药情况,并降低了药物用量,减少了副作用的出现。Zhuang 等^[16]用 RNAi 技术沉默脑膜胶质瘤的 DNA 蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)基因,探索干扰后对放疗敏感性,发现干扰后肿瘤细胞对放疗敏感性增加,细胞大量凋亡。RNAi 给肿瘤的治疗带来了广阔的前景,将 RNAi 技术联合放疗以增加对肿瘤细胞的杀伤力,且毒副作用小,为肿瘤的治疗开辟一条新途径^[17]。

本实验将 RNA 干扰技术与肿瘤放疗耐受研究热点——信号受体的研究相结合,采用 RNAi 技术阻断导致辐射耐受的信号受体 EGFR 基因,发现干扰加辐射组对放疗的敏感性高于单纯辐射组。从分子生物学水平证实了 EGFR 基因沉默能够提高 ACHN 肾癌细胞的放疗敏感性,显示了 RNAi 技术在肾癌基因增敏放疗中的巨大潜力,为完善 RNAi 技术放疗增敏的临床前研究提供的一定的理论基础。为肾癌放疗增敏提供有力的实验证据。

[参考文献]

- 1 Mattii L, Bianchi F, Da Prato I, et al. Renal cell cultures for the study of growth factor interactions underlying kidney organogenesis[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, 37: 251-258.
- 2 Pickhard A C, Margraf J, Knopf A, et al. Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways[J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 388.

- 3 Cao C, Lu S, Sowa A, et al. Priming with EGFR tyrosine kinase inhibitor and EGF sensitizes ovarian cancer cells to respond to chemotherapeutical drugs[J]. *Cancer Lett*, 2008, 266: 249—262.
- 4 Pu Y S, Huang C Y, Kuo Y Z, et al. Characterization of membranous and cytoplasmic EGFR expression in human normal renal cortex and renal cell carcinoma[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16: 82.
- 5 Katz D, Ito E, Liu F F. On the path to seeking novel radiosensitizers[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 73: 988—996.
- 6 Normanno N, Maiello M R, De Luca A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194: 13—19.
- 7 Shin H K, Kim M S, Lee J K, et al. Combination effect of cetuximab with radiation in colorectal cancer cells[J]. *Tumori*, 2010, 96: 713—720.
- 8 Akimoto T, Hunter N R, Buchmiller L, et al. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 2884—2890.
- 9 Gorski D H, Beckett M A, Jaskowiak N T, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3374—3378.
- 10 Zhang Y, Wang J, Liu F, et al. EGFR inhibitor C225 increases the radiosensitivity of human lung squamous cancer cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2010, 10: 39.
- 11 Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 31182—31189.
- 12 Joensuu G, Joensuu T, Nokisalmi P, et al. A phase I/II trial of gefitinib given concurrently with radiotherapy in patients with nonmetastatic prostate cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78: 42—49.
- 13 Siddiqui A D, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17: 1168—1176.
- 14 Gazdar A F. Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29: 37—48.
- 15 O'Grady M, Raha D, Hanson B J, et al. Combining RNA interference and kinase inhibitors against cell signalling components involved in cancer[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5: 125.
- 16 Zhuang W, Li B, Long L, et al. Knockdown of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes glioma-initiating cells by inducing autophagy[J]. *Brain Res*, 2011, 1371: 7—15.
- 17 Collis S J, Schwaninger J M, Ntambi A J, et al. Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 49624—49632.

(收稿日期:2012-08-14)

关于举办“女性泌尿外科高峰论坛”的通知

女性泌尿外科学是正在快速发展的新兴亚专业学科。随着人们生活质量和健康意识的极大提高,人类寿命不断延长,尿失禁及盆底功能障碍中老年女性患者急剧增加,各种各样女性泌尿外科疑难杂症也对泌尿外科医生同仁们提出了新的挑战,例如:女性各种下尿路排尿功能障碍,女性复杂性尿路感染,女性泌尿生殖道的修复与重建等。此外,临床发现女性尿失禁患者多数同时伴有子宫脱垂、膀胱膨出、大便失禁等盆腔多个系统疾病,女性泌尿外科的研究范畴已从单纯的女性尿失禁扩展到了女性盆腔医学及盆底重建外科,涉及盆底功能障碍、直肠结肠功能障碍、大便失禁、阴道直肠瘘等,以及相应的流行病学、盆腔解剖学、病理生理学、神经生理学、盆底功能障碍的临床量化评估、超声影像学、手术学等领域。

为了普及女性泌尿外科知识,提高女性泌尿外科疾病诊治水平,为广大泌尿外科及妇科医生提供一个学术交流、临床经验提升、新技术和新业务的了解及应用以及传统观念的更新平台,我科定于2013年5月25日在武汉协和医院学术报告厅举办“女性泌尿外科高峰论坛”,欢迎广大泌尿外科和妇产科医生参加。

主要内容有:女性尿道解剖研究新进展,“安全膀胱”的概念及其临床应用,女性尿失禁诊断治疗原则,女性尿失禁手术治疗动态,女性OAB研究新理念,女性LUTS现状及展望,女性盆底脱垂与排尿功能障碍,女性泌尿生殖道修复与重建技术,女性复杂性下尿路感染防治原则,腹腔镜技术在女性盆腔手术输尿管损伤中的应用,女性泌尿外科门诊经验分享—疑难病例及尿动力学图形分析等。

参加人员住宿费自理,酒店由会议统一安排。免注册费。

联系人:刘功学,手机:13667272442, E-mail: liugongxueemail@163.com; 韩晓敏,手机:18086048095, E-mail: hanhanmin@yahoo.com.cn。

华中科技大学附属协和医院泌尿外科