

음경해면체신경 절단 백서의 음경 조직에서 단백질 발현 변화의 단백질체학적 접근

Proteomic Analysis of Penile Protein Alterations in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury

Hong Chung, Chang-Kwon Lee¹, Bokyung Kim¹, Hong Sup Kim, Tong-Wook Kim, Sung Hyun Paick, Hyun Soo Jeon², Sang-Kuk Yang

From the Departments of Urology, ¹Physiology, and ²Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konkuk University, Chungju, Korea

Purpose: Cavernous nerve resection (CNR) in rats is a standard model of animal experiments on erectile dysfunction (ED) that occurs after radical prostatectomy (RP). Injured cavernous nerves after surgery can cause fibrosis and apoptosis that lead to penile structural changes that may be accompanied by alterations of protein expression. This study aimed to analyze the changes in protein after CNR in Wistar Kyoto rats.

Materials and Methods: Using 8-week-old male Wistar Kyoto rats, sham and CNR operation under a microscope were performed. Two and 8 weeks after surgery, we applied 2-DE and MALDI-TOF/TOF (AB 4700) to identify differently expressed penile proteins after CNR. 2-DE gels were stained with silver nitrate and were analyzed with PDQuest. After in-gel digestion, peptide mass spectra were obtained by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry in the positive ion reflector mode. The obtained data were screened with a rat database from both the NCBI and the Swiss-Prot/TrEMBL home page.

Results: The proteins that were changed more than 1.5-fold compared with the sham group were annexin A4 and pyruvate kinase (PK). Annexin A4 was increased by 1.75-fold after 2 weeks, whereas PK was decreased by 4.16 after 8 weeks. These results were confirmed by immunohistochemistry.

Conclusions: Annexin A4 in the CNR group was increased, which may be related to emiocytosis during apoptosis. The decrease in PK of the CNR group is assumed to be related to a decrease in efficacy during glycolysis. Further study will be needed to elucidate the molecular pathophysiology of ED after cavernous nerve injury. (**Korean J Urol 2009;50:498-504**)

Key Words: Cavernous nerve, Erectile dysfunction, Proteomics

Korean Journal of Urology
Vol. 50 No. 5: 498-504, May 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.5.498

건국대학교 의과대학
비뇨기과학교실, ¹생리학교실,
²산부인과학교실

정 흥 · 이창권¹ · 김보경¹
김흥섭 · 김동욱 · 백성현
전현수² · 양상국

Received : March 5, 2009
Accepted : April 22, 2009

Correspondence to: Sang-Kuk Yang
Department of Urology, College of
Medicine, Konkuk University,
620-5, Kyohyun 2-dong, Chungju
380-704, Korea
TEL: 043-840-8270
FAX: 043-848-4722
E-mail: yskuro@kku.ac.kr

This work was supported by the
Korea Research Foundation Grant
funded by the Korean Government
(MOEHRD, Basic Research
Promotion Fund)
(KRF-2007-521-E00089).

© The Korean Urological Association, 2009

서 론

음경은 출생 후 연령이 증가함에 따라 정상적으로 그 크기와 모양의 변화를 보이며, Peyronie's disease, 음경지속발기증, 발기부전 등은 음경의 구조 및 기능적 변화를 동반한다.^{1,3} 음경 질환의 구조적, 기능적 변화는 음경 내의 단백질 변화에 의하여 발생하는데 과거의 연구는 유전자 (genome)

에 대한 연구를 포함하여 음경의 혈액학적, 구조적 변화 및 분자생물학적 수준의 변화를 중심으로 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 그러나 유전자에 의해 조절되는 단백질 발현이 항상 유전자 발현 결과와 일치하는 것은 아니며, 사람의 경우 약 30,000개의 유전자를 가지고 있으나, 유전자에 의하여 발현되는 단백질은 최소한 백만 개 이상으로 추정되고 있다.¹ 이러한 유전자 발현과 단백질 발현 사이에는 존재하는 차이는 번역이후수식 (post-translation modification)에 의

한 것으로 생각되며, 실제 작용하는 단백질의 기능 및 이에 따른 기전을 밝히기 위해서는 단순한 유전자의 확인이 아닌 전반적인 단백질 발현 및 변화를 관찰하여야만 질환의 발생을 이해하기 위한 실체에 접근할 수 있을 것이다.

단백체학 (proteomics)은 단백질 발현 단계의 분자생물학적 구조, 단백질-단백 사이의 상호작용, 번역 이후 수식 과정, 단백질의 세포 내 분포 (subcellular location)를 제공하는 학문으로 구조적 및 기능적 변화를 담당하는 단백질의 단서를 제공할 수 있다.³ 단백질체학을 통하여 복잡한 단백질 혼합물에서 각각의 단백질을 분리해 낼 수 있으며, 질병에서 단백질 발현 변화를 정량화하여 측정할 수 있다. 단백질체학의 의학적 적용은 질병의 기전의 이해, 진단 및 치료의 영역에서 폭넓게 이용이 가능하여 다양한 분야에서 단백질체학을 바탕으로 질환의 기전 규명에 이용되고 있으며,⁴ 국내에서도 비뇨기과 질환에 대한 연구가 진행되고 있다.⁵⁻⁷

전립선암의 증가와 함께 근치적전립선절제술 후 음경해면체신경 손상에 따른 발기부전 발생의 관심도 급증하고 있으며, 당뇨, 고혈압 및 혈관 질환 등의 기저 질환은 발기부전을 더욱 악화시킨다. 발기부전 시 발생하는 음경의 구조적 및 기능적 변화는 음경해면체의 단백질 변화에 바탕을 두고 있을 것으로 생각되나, 현재까지 음경해면체의 단백질 변화에 대한 연구는 미미한 실정이다. 이에 저자들은 발기부전의 연구에 널리 사용되고 있는 백서의 음경해면체신경 손상모델에서 음경해면체 단백질 발현 변화를 관찰하여, 음경 질환 연구의 근간이 되는 단백질 변화를 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 제작

7주령의 백서 (Wistar-Kyoto rats; WKY)는 중앙실험동물(서울)에서 구입하여, 건국대학교 동물실험윤리위원회 승인과정에 따라 취급하였다. 구입 후 1주간 적응기간 후 8주령이 되었을 때 백서 12마리 (195±10 g)를 이용하여 대조군과 음경해면체신경 모델을 각각 6마리씩 제작하였다. 실험동물의 마취는 ketamine (8 mg/100 g, 유한양행)과 xylazine (0.8 mg/100 g, 바이엘코리아)을 혼합하여 근주하였으며, 마취 후 복부를 절개하고 복직근 및 복막을 절개하였다. 복막 절개 후 방광을 확인하고 견인하여 방광목 부위를 노출시켜 조심스럽게 박리하였다. 음경해면체신경 확인을 위하여 수술용 현미경하에 배쪽 전립선을 박리하고 골반신경절 및 음경해면체신경 및 부신경 가지를 확인하였다. 음경해면체신경 절단군은 음경해면체신경 및 부신경 가지를 절단하였고, 대조 수술군은 절보기 수술을 시행하여 음경해면체신경을 확인하였다. 이후 #4-0 black silk를 복막과 복직근 및

피부를 각각 봉합하였다.

2. 실험동물 음경 조직 채취

대조군과 음경해면체신경 절단군의 백서는 수술 후 2주, 8주에 음경해면체를 채취하였다. 실험동물의 마취는 ketamine (8 mg/100 g, 유한양행)과 xylazine (0.8 mg/100 g, 바이엘코리아)을 혼합하여 근주하였으며, 마취 후 경동맥을 절개하여 실혈시키고, 개복하여 음경해면체를 적출하였다. 이차원 전기영동에 이용될 음경해면체는 음경 귀두, 연골 부분, 요도를 제거한 후 혈액 단백질의 혼입 및 단백질의 정량성을 높이기 위해 음경해면체 조직을 1x phosphate buffered saline (PBS) solution을 이용하여 3회 이상 세척하여 혈액성분을 최대한 제거한 후 액체질소를 이용하여 신속히 냉동시킨 후, 수행 전까지 -80°C에서 보관하였다. 면역조직화학염색을 위한 음경해면체는 적출 후 4% paraformaldehyde (0.1 M, pH 7.4)로 하루 동안 고정시키고 알코올로 세척하여 파라핀 고정하였다.

3. 이차원전기영동법 (2-dimension electrophoresis; 2-DE)

단백체 분석을 위하여 음경해면체 조직은 2-DE buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 65 mM dithiothreitol 2% CHAPS, 1x protease inhibitor cocktail [Roche])에서 조직과쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 조직액은 12,000xg으로 10°C에서 10분간 원심분리하여 상층을 채취하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad의 단백질 정량 키트를 이용하여 측정하였으며, 추출 단백질은 rehydration buffer (8 M Urea, 0.28% dithiothreitol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol, 0.5% appropriate ampholyte, 0.002% bromopyrenol blue)로 희석하였다. 단백질 200 µg을 immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3-10 non-linear)에 부가하여 isoelectric focusing (IEF) cell (Bio-Rad)에서 100 V 2시간, 500 V 1시간, 1,000 V 1시간, 3,000 V 1시간, 5,000 V 1시간, 8,000 V 9시간 동안 20°C 1차원 IEF 단백질 분리를 실시하였다. IEF 후 각각의 strip은 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6 M urea, 20% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% bromophenol blue 및 5 mM tributylphosphine이 10 ml 든 평형용액에서 20분간 평형하였다. 평형된 strip은 12% SDS gel에 이전한 후 30 V 1시간 동안 전기영동하였으며 그 후 80 V로 전기영동하였다.

4. 은 염색법 (silver staining)

분리된 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위하여 은 염색을 실시하였다. Gel은 50% methanol, 12% acetic acid, 0.05% formaldehyde가 든 고정액에서 고정한 후 50% ethanol로 20

분간 2회 세척하였다. 그 후 0.02%의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 1분간 감작화 (sensitization)를 시행하였다. Gel은 3회 세척하고 0.1%의 silver nitrate가 든 용액에서 20분간 배양하였다. 과도한 silver nitrate는 증류수로 세척하였으며, 0.0002%의 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 3% Na_2CO_3 , 0.025% formaldehyde가 든 발현 용액에서 발현하였다. 발현의 정지는 1.5% EDTA의 첨가로 얻었다.

5. In gel digestion 및 mass spectrometry를 이용한 단백질 동정

은 염색으로 발현된 단백질 spot을 gel에서 절취하여 15 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/50$ mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 으로 15분간 탈염색하였다. Gel 조각은 50% ACN/100 mM NH_4CO_3 으로 15분간 3번 세척하였다. ACN으로 15분간 탈수를 시행한 후 각 단백질 spot은 SpeedVac으로 10분간 원심분리 하였다. 그 후 DTT로 환

원하였으며 idoacetamide로 알칼리화 시켰다. 그 후 digestion buffer (20 mM NH_4HCO_3 에 12.5 ng/ μl trypsin 첨가)에서 37°C에서 16시간 이상 소화시켰다. 펩타이드 샘플은 50% ACN/0.1% formic acid 50 μl 가 든 용액에서 추출하여 SpeedVac으로 10분간 원심분리하였다. 추출물은 10 μl 의 0.1% TFA로 용해한 후, ZipTip C_{18} 컬럼으로 염을 제거하였다. Peptide mass는 MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (AB4700, Applied Biosystems)로 측정하였다. 발생된 spectra는 MASCOT (Mastrix Science, UK) program을 사용하는 Global Protein Server Explore 3.0 software로 분석하였다. 분석결과는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Swiss-Prot/TrEMBL homepage (<http://www.expasy.ch/sprot>), MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) 및 ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu>)로 검색하였다.

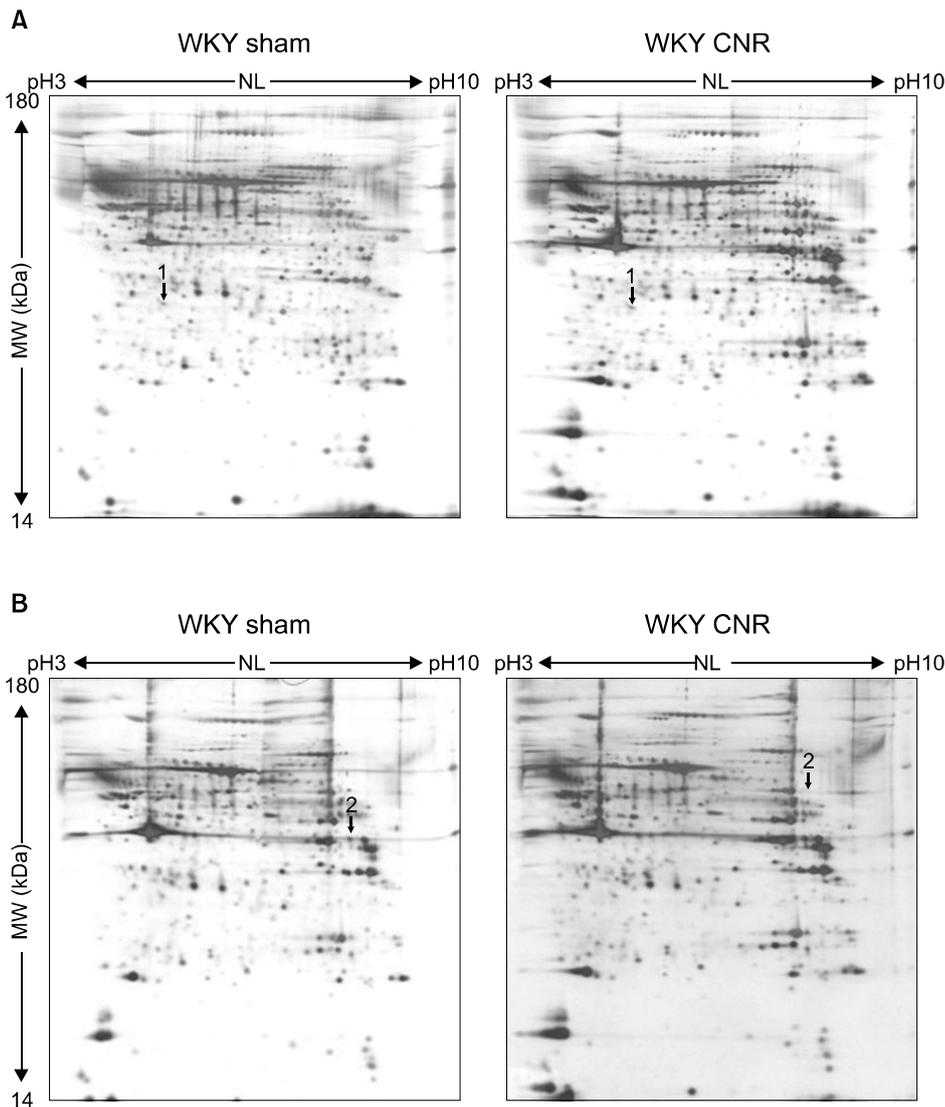


Fig. 1. Two-dimension electrophoresis image of the rat penile cavernosum tissue. (A) after 2 weeks, (B) after 8 weeks (1: Annexin A4, 2: Pyruvate kinase, WKY: Wistar Kyoto rats, CNR: cavernous nerves resection).

6. 면역조직화학염색

수술 시 얻은 음경해면체 조직을 중성 포르말린 용액에 고정하여 파라핀에 포매하고 4 μm 두께로 잘라 슬라이드에 부착시키고, xylene으로 5분간 3회 담구어 파라핀을 제거한 후 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 알코올에 3분씩 처리 후 증류수에 넣어 합수화하였다. 0.01 M sodium citrate 용액 (pH 7.4)에 넣고 microwave로 5분간 끓인 후 충분히 식혔다. 0.5% H₂O₂를 이용하여 peroxidase를 blocking 시키고 1차 항체 annexin IV (sc-1930, Santacruz, USA, 1:200)를 부착하고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. PBS를 이용하여 5분씩 3회 세척 후 2차 항체인 biotinylated pan-specific antibody (1:200)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS를 이용하여 5분씩 3회 세척 후 ABC reagent를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. DAB로 2분간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 5분간 2회 세척 후 증류수를 이용하여 5분간 세척하였다. Methyl green 으로 대조염색 후 알코올과 xylene으로 탈수시켜 permount 로 봉입하여 annexin IV의 발현을 현미경으로 검경하였다.

7. 실험결과 분석 및 정량

모든 분석과 정량을 위한 실험은 정확도 및 검증을 위하여 3회 이상 실시하였으며, 단백질 발현의 차이가 대조 수술 군과 비교하여 1.5배 이상 증가 혹은 감소를 보인 경우 의미 있는 결과로 판정하였다.

결 과

백서의 대조 수술군과 음경해면체신경 절단군의 수술 2 주 후 및 8주 후 채취한 음경해면체를 이차원 전기영동법으로 분리한 후 은염색법을 이용하여 1,000개 이상의 단백질 발현을 확인하였고, 전기영동 지도를 작성하였다 (Fig. 1A).

수술 2주 후 및 8주 후 대조 수술군과 비교하여 음경해면체 신경 절단군에서 차이를 보이는 13개의 spot을 확인하였으며, 이 중 시간에 따라 변화를 보이는 단백을 선별 동정하였다. 수술 2주 후 발현의 차이를 보인 spot 1 (Fig. 1A)과 8주 후 발현의 차이를 보인 spot 2 (Fig. 1B)를 선별하여 peptide sequence matching 결과 spot 1은 annexin A4, spot 2는 pyruvate kinase로 확인되었다 (Table 1).

Annexin A4는 음경해면체신경 절제 2주 후 대조 수술군에 비하여 1.75배의 증가 (p<0.05)하였으나, 8주 후에는 대조 수술군과 유사한 값으로 감소하였다. Pyruvate kinase는 음경해면체신경 절제 2주 후에는 변화를 보이지 않았으나, 8주 후에는 대조 수술군에 비하여 4.16배 감소하였다 (p<0.03) (Fig. 2).

면역조직화학염색 결과 음경해면체신경 절제 2주 후 annexin A4의 발현 증가가 확인되었다 (Fig. 3).

고 찰

20세기말 인간 게놈프로젝트가 완성됨에 따라 많은 유전 정보들을 얻을 수 있게 되었으며 이를 이용한 질병에 대한 기전 연구 및 질병의 조기진단을 위한 연구들이 광범위하게 연구되어지고 있다. 단백질체학은 전체 단백질의 변화를 연구하는 기법으로서 전사체학에서는 확인할 수 없는 유전자의 전사 후 수식에 대한 변화를 확인할 수 있는 장점이 있어, 전사체학에 비해 세포의 기능에 대한 더욱 세분화되고 정확한 분석이 가능하며, 노화, 질환 및 세포와 세포환경에 대한 치료를 위한 설명에 도움을 줄 수 있다.¹ 또한 생물체의 생명현상의 유지는 유전정보의 최종산물인 단백질에 의해 조절되므로 단백질체학을 토대로 한 질병 발생 시에 나타나는 복잡한 단백질의 변화 및 상호 간의 연관성을 연구한다면 질병의 기전의 이해, 진단 및 치료의 영역에 유용한

Table 1. Up- and down-regulated proteins in cavernous tissue after cavernous nerve resection

No.	Protein name	Δ	pI/Mr (kDa)	Accession no /Data base	Score	SC (%)	Peptide sequence	Function
1	Annexin A4	1.75	5.31/35,826	37999910/NC P55260/SP	91	15	AASGFNATEDAQVLR INQTYQQQYGR SLEEDICSDTSFMFQR NKPAYFAER	Phospholipase inhibitor activity
2	Pyruvate kinase, isozyme M1/M2	-4.16	7.42/57,719	P52480/SP	34	5	NTGICTIGPASR APIIAVTRNPQ TAR	Glycolysis to covert phosphoenolpyruvate to pyruvate

The names of the proteins, pI and Mr values, accession numbers in both the NCBI (NC) and SWISS-PROT (SP) databases, probability score (Score), and the sequence coverage (SC), peptides representative of the identified sequences are presented. Increases or decrease of at least 1.5-fold in triplicate experiments were considered to be significant (p<0.05)

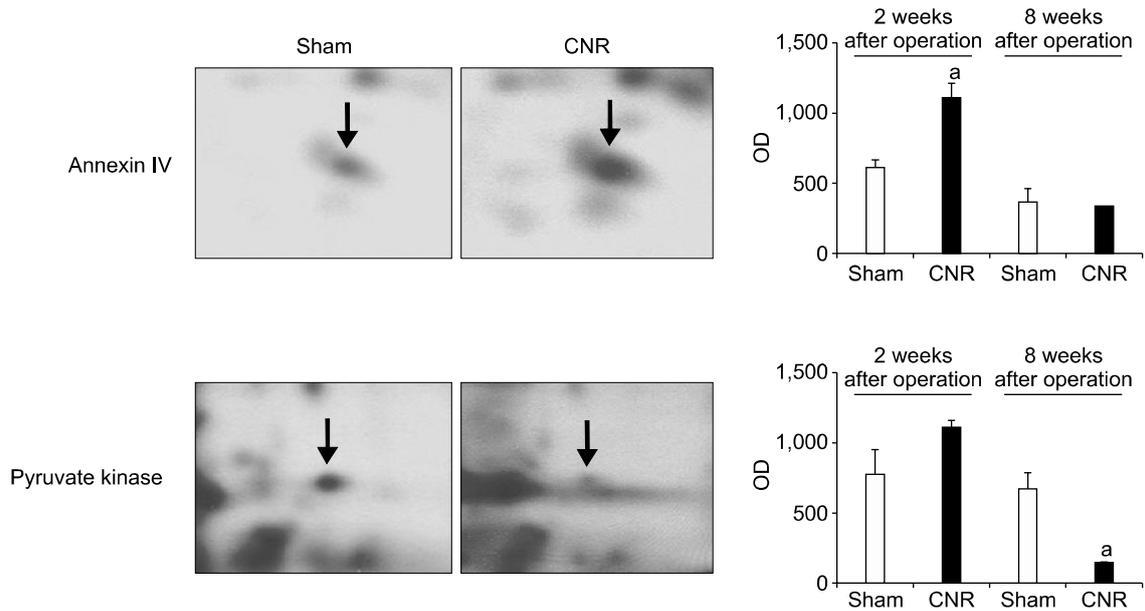


Fig. 2. Two-dimensional electrophoresis patterns showing up- and down-regulation of important proteins in penile tissues by cavernous nerve resection (CNR) as compared with sham operation (^a: $p < 0.05$).

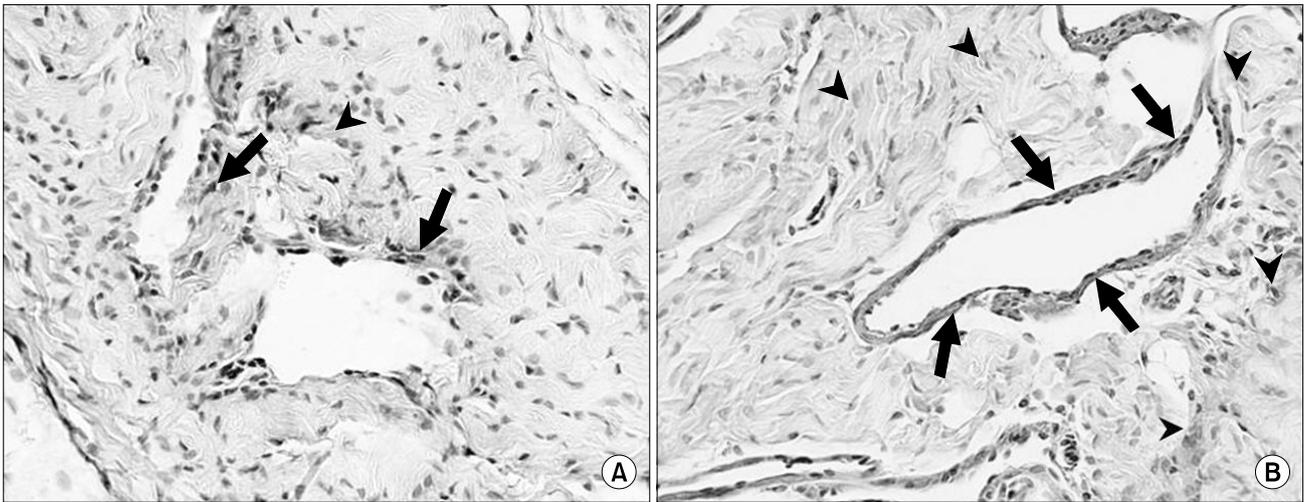


Fig. 3. Immunohistochemical staining of annexin A4 in cavernous sections obtained from the penile tissue 2 weeks after sham or cavernous nerve resection (CNR) operation ((A) sham x200, (B) CNR x200, arrow: endothelial cells, arrow head: smooth muscle cells).

정보를 제공할 수 있다. 현재 단백질체학을 바탕으로 하는 연구 분야는 점진적으로 확대되어 가고 있으며, 병태생리학적 기전연구 및 보전 기초연구의 중요한 선도역할을 하고 있다.

대표적인 음경해면체 질환인 Peyronie's disease와 발기부진 등은 백서를 이용한 실험동물 연구가 활발하게 이루어지고 있으며,^{8,9} Domes 등¹⁰은 Peyronie's disease의 백서 모델을 이용한 단백질체학 연구에서 음경 조직의 구조적 변화를 유발하는 단백질의 변화에 대하여 보고하여, 원인, 진단 및

치료를 위한 가능성을 제시하였다. 발기부진의 발생은 백막의 아교질 (collagen) 및 탄력섬유 (elastic fiber) 구성 성분의 변화에 따른 음경조직의 구조적인 변화에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있고,¹¹ 음경해면체신경 손상 시 음경해면체의 만성 저산소증 및 세포고사를 통한 섬유화가 일어나게 되어 발기부진을 유발하는 것으로 생각되나 그 기전을 명확하게 설명하지는 못하고 있다.¹² 음경해면체신경 손상 후 발생하는 초기 단백질 발현의 변화는 발기부진의 발생과 연관성이 클 것으로 생각되며, 초기 변화 이후 시간의

경과에 따라 단백질 발현 정도의 변화가 발생할 것으로 생각한다. 이에 저자들은 음경해면체신경 모델 생성 2주, 8주 후 음경해면체를 채취하여 단백질 발현 변화를 확인하였다.

신경보전 근치적전립선절제술 후 발기부전의 발생은 28-47%로 다양하게 보고되고 있다.^{13,14} 저자들은 발기부전의 음경해면체신경 손상 모델 연구에 보편적으로 사용되고 있는 백서의 음경해면체 신경 손상 모델에서 음경 귀두, 연골 부분, 요도를 제거한 후 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 은염색법을 이용하여 1,000개 이상의 단백질 발현을 확인하였고, 수술 2주 후 annexin A4의 1.75배 증가와 8주 후 pyruvate kinase의 4.16배 감소를 확인하였다. Annexin A4는 세포막에 존재하는 Ca^{2+} 에 의하여 조절되는 인지질 결합 단백질로 세포외유출 (exocytosis) 및 세포의 Cl^- 분비 조절에 관여한다.^{15,16} Annexin A4는 다양한 세포 및 조직에서 발현을 관찰할 수 있으며, 섬유화 조직에서 annexin A4의 발현이 증가된다.¹⁷ 음경해면체신경 손상 2주 후 대조 수술군에 비하여 음경해면체신경 절단군의 annexin A4 발현 증가 (Fig. 2, 3)는 음경해면체의 평활근의 섬유화 및 고사의 증가에 기인된 것으로 생각한다. 음경해면체신경 손상 후 음경해면체와 백막에서 다양한 정도의 세포고사가 보고되고 있으며, 이러한 세포고사는 시간의 경과에 따라 증가된다.^{18,19} 음경해면체신경 손상 모델에서 음경해면체 고사는 24시간 후부터 증가하기 시작하여 7일에 최고에 도달하며, 8주 이상 지속된다.²⁰ 음경해면체 고사에 따른 평활근 세포의 감소와 주위조직의 섬유화는 세포 내 활동을 위한 에너지의 필요성을 감소시키게 된다.²¹ 따라서 8주 후 발생한 pyruvate kinase의 감소는 한계를 넘어 진행되는 섬유화 및 세포고사에 따른 ATP 필요성이 감소로 음경해면체 내의 해당작용 (glycolysis)이 감소하였기 때문으로 생각한다.^{20,22} 이러한 시간에 따른 일련의 단백질 변화는 음경해면체신경 손상 후 음경해면체의 구조적 변화와 밀접한 관계가 있을 것으로 추정된다.

전립선암 환자에서 고혈압 등 발기능에 악영향을 미치는 선행질환이 동반된 경우, 근치적 전립선적출술 후 발기부전의 발현율이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 따라서 WKY의 유전적 대응개체 (genetic counterpart)인 spontaneously hypertensive rat (SHR)은 고혈압이 동반된 음경해면체신경 절단 후 발생하는 발기부전의 임상적인 상황을 재현할 수 있는 좋은 연구 모델이라 생각하며, 추후 백서를 이용한 고혈압과 동반된 음경해면체신경 손상의 연구에 적용이 가능할 것이다.

저자들은 WKY를 이용한 음경해면체신경 손상 모델에서 다수의 음경해면체 단백질 발현을 확인하였고, 이 중 변화를 보인 단백질을 동정하였다. 저자들이 보고하는 annexin A4

와 pyruvate kinase의 변화만으로 음경해면체신경 손상 후 발생하는 발기부전의 기전을 설명하기에는 한계가 있으며, 추가적인 연구를 통하여 음경해면체신경 손상 후 발생하는 발기부전 기전의 이해에 도움이 될 것으로 기대한다.

결론

저자들은 WKY 백서의 음경해면체에서 음경해면체신경 절단 2주 및 8주 후 단백질체학적 접근으로 발현 차이를 보이는 단백질을 비교하여, annexin A4의 증가와 pyruvate kinase의 감소를 확인하였다. 본 연구를 통해 얻어진 음경해면체조직의 프로테오믹 연구결과들은 음경질환 모델에서 질병 관련 단백질의 발현변화를 관찰하는데 기초가 될 것이며 추가적인 연구를 통하여 음경질환에 대한 병태생리의 이해, 진단 및 치료법 개발이라는 측면에서 유용하게 이용되리라 생각한다.

REFERENCES

1. Domes T, De Young L, O'Gorman DB, Gan BS, Bella AJ, Brock G. Is there a role for proteomics in Peyronie's disease? *J Sex Med* 2007;4:867-77
2. Burnett AL. Pathophysiology of priapism: dysregulatory erection physiology thesis. *J Urol* 2003;170:26-34
3. Liu X, Gao X, Pang J, Zhang Y, Wang K, Fang Y, et al. Proteomic analysis of rat penile tissue in a model of erectile dysfunction after radical prostatectomy. *BJU Int* 2007;99:1500-5
4. Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. Interactive proteomics: what lies ahead? *Biotechniques* 2008;44:681-91
5. Kim HJ, Youn WY, Myong NH, Hwang CH, Ryu JW, Lee YS. Proteomic approach for identifying marker proteins in the urinary bladder precancerous conditions induced by BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine). *Korean J Urol* 2004;45:77-83
6. Shim JH, Kim HJ. Investigation of oxidative stress and development of lower urinary tract symptoms in the urinary bladder following partial bladder outlet obstruction by proteomic approach. *Korean J Urol* 2005;46:1337-43
7. Kim HJ, Ryu YG, Hong JH, Hong JH. Proteomic analysis of the proteins that were changed by bilateral orchiectomy in the rabbit corpus cavernosum. *Korean J Urol* 2008;49:449-53
8. Ferrini MG, Kovanecz I, Nolazco G, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Effects of long-term vardenafil treatment on the development of fibrotic plaques in a rat model of Peyronie's disease. *BJU Int* 2006;97:625-33
9. Nolazco G, Kovanecz I, Vernet D, Gelfand RA, Tsao J, Ferrini MG, et al. Effect of muscle-derived stem cells on the restoration of corpora cavernosa smooth muscle and erectile function

- in the aged rat. *BJU Int* 2008;101:1156-64
10. Domes T, De Young L, O'Gorman DB, Gan BS, Bella AJ, Brock G. Is there a role for proteomics in Peyronie's disease? *J Sex Med* 2007;4:867-77
 11. Bivalacqua TJ, Purohit SK, Hellstrom WJ. Peyronie's disease: advances in basic science and pathophysiology. *Curr Urol Rep* 2000;1:297-301
 12. Leungwattanakij S, Bivalacqua TJ, Usta MF, Yang DY, Hyun JS, Champion HC, et al. Cavernous neurotomy causes hypoxia and fibrosis in rat corpus cavernosum. *J Androl* 2003;24: 239-45
 13. Dubbelman YD, Dohle GR, Schröder FH. Sexual function before and after radical retropubic prostatectomy: a systematic review of prognostic indicators for a successful outcome. *Eur Urol* 2006;50:711-8
 14. Lee JW, Kim CS, Ahn H. Early and late complications of radical retropubic prostatectomy. *Korean J Urol* 2000;41: 1409-14
 15. Monastyrskaya K, Tschumi F, Babiychuk EB, Stroka D, Draeger A. Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia. *Biochem J* 2008;409:65-75
 16. Piljic A, Schultz C. Annexin A4 self-association modulates general membrane protein mobility in living cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:3318-28
 17. Barwise JL, Walker JH. Annexins II, IV, V and VI relocate in response to rises in intracellular calcium in human foreskin fibroblasts. *J Cell Sci* 1996;109:247-55
 18. User HM, Hairston JH, Zelner DJ, McKenna KE, McVary KT. Penile weight and cell subtype specific changes in a post-radical prostatectomy model of erectile dysfunction. *J Urol* 2003;169:1175-9
 19. Lysiak JJ, Yang SK, Klausner AP, Son H, Tuttle JB, Steers WD. Tadalafil increases Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, and prevents apoptotic cell death in the penis following denervation. *J Urol* 2008;179:779-85
 20. Ferrini MG, Kovanecz I, Sanchez S, Umeh C, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. Fibrosis and loss of smooth muscle in the corpora cavernosa precede corporal veno-occlusive dysfunction (CVOD) induced by experimental cavernosal nerve damage in the rat. *J Sex Med* 2009;6:415-28
 21. Gonzalez-Cadavid NF. Mechanisms of penile fibrosis. *J Sex Med* 2009;6(Suppl 3):353-62
 22. Patriarca A, Eliseo T, Sinibaldi F, Piro MC, Melis R, Paci M, et al. ATP acts as a regulatory effector in modulating structural transitions of cytochrome c: implications for apoptotic activity. *Biochemistry* 2009;48:3279-87