pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 2, pp. 113~118 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.2.113

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

콜레스테롤 식이가 Pcsk9 유전자 조절을 통해 남성 생식기관에 미치는 영향

임화선 · 배효철 · 송권화*
고려대학교 생명과학대학 생명공학과

Effects of Dietary Cholesterol on Male Reproductive Tracts by Regulating PCSK9 Gene

Whasun Lim, Hyocheol Bae and Gwonhwa Song*
Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Republic of Korea
(Received February 29, 2016/Revised March 1, 2016/Accepted March 2, 2016)

ABSTRACT - Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*), is a protein mainly secreted by a liver. The *PCSK9* plays an important role in low density lipoprotein (LDL) metabolism acting as a repressor of LDL receptor through transportation of the LDLR to the lysosome for degradation. Thus, the PCSK9 inhibitor suppresses *PCSK9*-regulated degradation of the LDL receptor as a LDL-lowering medicine. However, little is known about the role of *PCSK9* in the reproductive system. Therefore, in the present study, we investigated *Pcsk9* expression in male reproductive tracts including penises, prostates and testes using rats in response to their diets between a normal diet and a high-fat diet with cholesterol. Based on our previous study, the high-fat diet elevates concentration of total cholesterol and LDL in serum whereas it reduces the concentration of plasma high density lipoprotein (HDL). In addition, it dramatically affects to morphological changes of the male reproductive organs. Consistent with these results, the expression of *Pcsk9* was substantially decreased in the penile tissues ($P < 0.001$) from rats fed a high fat diet as compared to a normal diet. Moreover, it slightly reduced in the prostate and testes ($P < 0.05$) of rats in response to a high fat diet. Localization of *Pcsk9* was predominantly detected in urethral epithelium of penises, cylinder-shaped cells of prostate glands, and spermatogonia, spermatocytes and spermatid of testes of rats. Collectively, results of current study provide invaluable insights into the *Pcsk9* gene with respect to its tissue- and cell-specific expression by a high fat diet with cholesterol.

Key words : Pcsk9, Cholesterol, Male reproductive tracts, Rat

콜레스테롤은 인체 내 다양한 생리적, 생물학적 메커니즘에 작용하며 세포막 구성요소, 투과성, 유동성, 내포작용, 세포 내 신호전달과정에 필수적인 요소로 알려져 있다. 또한 콜레스테롤은 담즙산, 비타민D, 스테로이드 호르몬, 옥시스테롤 및 콜레스테롤 대사체를 생산하기 위한 전구체로서 대사작용을 수행한다[1]. 그러므로 콜레스테롤 항상성은 최적의 세포기능을 유지하기 위해 콜레스테롤 합성 및 이화작용에 의해 엄격하게 조절되어야 한다. 콜레스테롤 조절 장애 또는 과도한 콜레스테롤 함량 식품 섭취를 통해 체내 총 콜레스테롤 함량이 높아질 경우 비만[2], 심혈관질환[3], 동맥경화[4], 알츠하이머[5] 및 다양한 조직 내암[6] 등을 포함한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히, 높은 함량의 콜레스테롤을 함유한 고지방식이는 이상지질혈증 및 고지혈증을 유발하여 남성 생식 기능에 있어 발기부전, 전립선 이상 증식 및 비정상적인 정자형성과정을 일으킨다고 보고된다[7-9]. 하지만, 콜레스테롤 식이가 남성생식기능 이상을 유발하는데 연관된 유전자 및 정확한 메커니즘에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)은 9가지 포유류의 세린단백질가수분해효소 중 하나로 박테리아 서브틸리신(subtilisin) 및 효소의 켁신(kixin)과의 연관성으로 이름이 유래되었다. PCSK9은 콜레스테롤 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 하는 유전자로서 저밀도지단백질 수용체(low-density lipoprotein receptor, LDLR)와 결합하여 리소솜에 의한 저밀도지단백질 수용체를 저하시킴에 따라 저밀도지단백질(LDL) 콜레스테롤 농도 증가를 야기하는 저밀도지단백질 흡수를 감소시킨다[10]. 유전

*Correspondence to: Gwonhwa Song, Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea
Tel: 82-2-3290-3012, Fax: 82-2-953-0737
E-mail: ghsong@korea.ac.kr

자 전사레벨에서 PCSK9는 스테롤조절요소(sterol regulatory element)에 결합하여 콜레스테롤 생합성 및 지방산 합성에 관여하는 sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 단백질에 의해 그 발현이 조절된다[11]. 또한, 높은 LDL 콜레스테롤 농도와 심혈관질환과 연관성을 나타내는 PCSK9 유전자의 기능획득변이(gain of function mutation)는 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증(autosomal-dominant familial hypercholesterolemia)의 발병과 연루됨을 나타내며 병의 진단을 위한 유전자로 알려진다[12]. 따라서 PCSK9 유전자는 콜레스테롤과 깊은 연관성을 지니는 질환을 치료하기 위한 중요한 타겟요소로서 자리매김하며 유전자 기반 치료제 개발 및 적용을 위한 연구가 두드러지게 진행되고 있다. 이와 같이 콜레스테롤 대사과정에 있어 중요한 역할을 하는 PCSK9 유전자는 인체 내 간 조직을 바탕으로 주로 연구되어 왔으며 현재까지 남성 생식기관에서는 어떠한 발현도 보고되고 있지 않다. 본 실험에서는 선행 연구 결과를 바탕으로 콜레스테롤 식이에 의한 수컷 랫드 생식기관의 형태학적 변화에 따라 음경, 전립선, 정소조직 내 *Pcsk9* 유전자의 발현 변화 및 위치를 확인하여 그 기능을 확인하고자 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

실험동물 및 식이

동물 실험은 고려대학교 동물 실험 윤리 위원회의 승인 이 후 본교의 규정에 따라 진행하였다(승인번호: KUIACUC-20130520-1). 실험동물은 6주령의 150-170 g의 수컷 Spraque-Dawley rats(샘타코, 경기, 대한민국)을 구매하여 1주일 동안 일반 배합사료로 적응시킨 후 진행하였다. 사육 조건은 20 ± 3°C, 습도 50 ± 5%, 명암주기를 12시간 간격으로 유지하였다. 실험에 사용된 사료의 함량은 선행연구 결과에 수록되어 있듯이 AIN-76 정제식이 조성을 변형하여 사용하였으며[8], 실험식이는 정상군(Normal)과 0.5%콜레스테롤을 포함한 콜레스테롤식이군(Cholesterol treatment)으로 나누어 5주간 사육하였다.

조직 동정

각 그룹별 6마리의 랫드를 에테르를 이용하여 희생하였고 해부를 통하여 목표 조직인 음경, 전립선 및 정소 조직을 동정하였다. 동정된 조직의 일부는 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동한 후 –80°C에 보관하였으며 나머지 조직은 조직학적 분석을 위하여 4% paraformaldehyde에 고정하여 파라핀 포매하였다.

RNA 추출

질소에 얼려진 100 mg의 조직에 1 mL 의 Trizol (Invitrogen, 캘리포니아주, 미국)을 처리한 후 파쇄하여 chloroform 및 isopropanol을 이용한 층 분리를 통하여 RNA만을 얻도록 한다. 고순도의 RNA를 얻기 위하여 phenol extraction과 ethanol precipitation 등의 과정을 거쳐 정제하도록 한다. 이 후, nanodrop을 이용하여 RNA의 농도 및 순도를 측정한다.

상보적 DNA합성

각 조직에서 추출된 총 RNA 1 μg와 Oligo dT primer(바이오니아, 대전, 대한민국), random hexamer (Invitrogen)를 혼합하여 70°C에서 5분간 인큐베이션시킨 후 AccuPower® RT PreMix(바이오니아, 대전, 대한민국)와 혼합하여 상보적 DNA합성을 위해 42°C에서 60분간 인큐베이션 및 RTase 불활성화를 위해 94°C에서 추가적으로 5분간 인큐베이션 하였다. 여기서 합성된 상보적 DNA는 추후 실시간유전자 발현정량적분석 및 유전자 클로닝에 사용되었다.

실시간유전자발현정량적분석

각 조직 내 Pcsk9 전령RNA(mRNA)의 발현을 측정하기 위하여 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 분석을 실시하였다. Table 1과 같이 *Pcsk9*과 *Gapdh* 프라이머를 사용하여 합성된 상보적 DNA를 주형으로 SYBR과 ROX 염색을 실시하여 StepOnePlus™ (Applied Biosystems, 캘리포니아, 미국) 실시간유전자발현정량분석 시스템을 바탕으로 중합효소연쇄반응을 수행하여 목표 유전자를 증폭하였고 측정된 표준곡선, C_T (cycle threshold) 측정값을 통해 *Gapdh* 발현값에 의해 표준화 되었다.

유전자 클로닝

역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 기법으로 합성된 *Pcsk9* 프라이머 (Forward: 5'-TGA GGG TGT CTA TGC TGT CG-3'; and Reverse: 5'- TAC CGT GGC TTC TTC ACT GG-3')를

Table 1. Primer sequences for quantitative RT-PCR analysis

Gene		Primer sequence	Accession No	Size (bp)
Pcsk9	Forward	AGCCAACTACTCGCTGATGG	NM_199253.2	90
	Reverse	TCAACTTGGTTCAGGGTTCC		
Gapdh	Forward	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	NM_017008.4	83
	Reverse	ATGCAGGGATGATGTTCTGG		

사용하여 타겟 유전자의 DNA절편을 증폭시켰다. 증폭된 Pcsk9의 DNA절편을 이중 프로모터(dual promoters; T7, SP6)를 함유하는 pCRII-TOPO 벡터(Invitrogen)에 삽입하고, 삽입된 방향을 프로모터를 기준으로 DNA sequencing을 통해 확인하였다.

현장혼성화분석

Pcsk9의 단편이 포함된 pCRII-TOPO 재조합 플라스미드를 제한효소를 사용하여 선형화하고 T7, SP6 polymerase (Roche)를 이용하여 digoxigenin (DIG)으로 표지된 UTP를 첨가하여 DIG으로 표지된 cRNA probe를 합성하였다. 합성된 cRNA probe를 사용하여 현장혼성화(*in situ* hybridization)분석을 실시하였다. 5 μm 두께로 절단된 파라핀 조직을 슬라이드에 고정하여 자일렌(xylene)과 에탄올(100%-70%)을 이용하여 파라핀을 제거하고 면역염색이 끝난 조직에 prehybridization buffer를 넣고 37°C에서 60분간 처리한 후, DIG으로 표지된 cRNA probe가 포함된 hybridization buffer를 형성하여 42°C에서 16-18시간 처리하였다. 이 후, 2X, 1X, 0.1X SSC 용액을 순차적으로 사용하여 슬라이드를 세척 후 alkaline phosphatase-conjugated sheep anti-DIG 항체를 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후, BCIP/NBT를 넣어 발색시켜 조직 내 시그널을 확인하였다.

통계적 분석

본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 student's t-test를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

Results and Discussion

콜레스테롤 식이에 따른 발기조직 내 Pcsk9의 발현 변화

콜레스테롤의 과다섭취로 발생되는 이상지질혈증(dyslipidemia), 고콜레스테롤혈증(hypercholesterolemia) 등의 질환은 음경해면체 내 혈액공급의 결핍을 통해 발기부전을 일으킨다고 전임상연구 및 동물 실험을 이용한 선행연구를 통해 알려져 있다[13,14]. 하지만 고콜레스테롤 식이와 발기부전의 연관성을 입증하기 위한 유전자 조절 메커니즘은 현재까지 알려진 바가 없다. 이에 본 연구진은 랫드를 이용한 선행연구를 통해 고콜레스테롤 식이에 따라 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 증가 및 HDL 콜레스테롤의 감소를 확인하였다[8]. 또한 조직학적 분석을 음경해면체 내부의 콜라겐함량이 고 콜레스테롤 식이에 의해 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 양상은 고콜레스테롤혈증이 음경해면체의 내피세포 함량을 감소시키고 근섬유세포의 기능을 변화시키며 콜라겐함량을 증가시켜 음경 맥관구조에 죽상동맥경화증을 일으켜 발기부전을 일으킨다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다[15]. 선행연구에 이어 본 연구에서는 콜레스테롤 대사에 중요한 역할을 담당하는*Pcsk9* 유전자의 발현을 고콜레스테롤 식이 랫드와 정상 랫드의 남성 생식기관 내에서 확인하였다. 먼저 Fig. 1A에 제시된

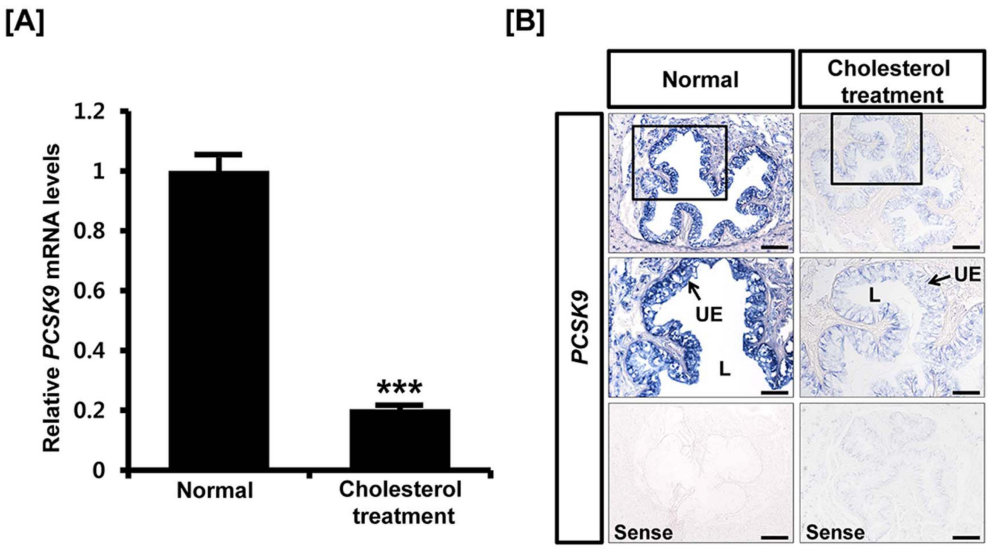

Fig. 1. Effects of a high fat diet with cholesterol on *Pcsk9* expression in the rat penises. [A] Differential expression of *Pcsk9* was analyzed by quantitative RT-PCR analyses using cDNA templates from normal and cholesterol-treated penises. The relative quantities of experimental mRNA were normalized to the quantity of *Gapdh* mRNA (mean ± SEM; ***$P < 0.001$). [B] Localization of *Pcsk9* mRNA was detected in penises from normal and cholesterol-treated rats by *in situ* hybridization analyses. Cross sections of penises of rats fed a normal and a high fat diet were hybridized with antisense or sense *Pcsk9* cRNA probes. Legend: L, lumen; UE, urethral epithelium. *Scale bar* represents 10 μm (the first horizontal panels and sense) and 5 μm (the second horizontal panels).

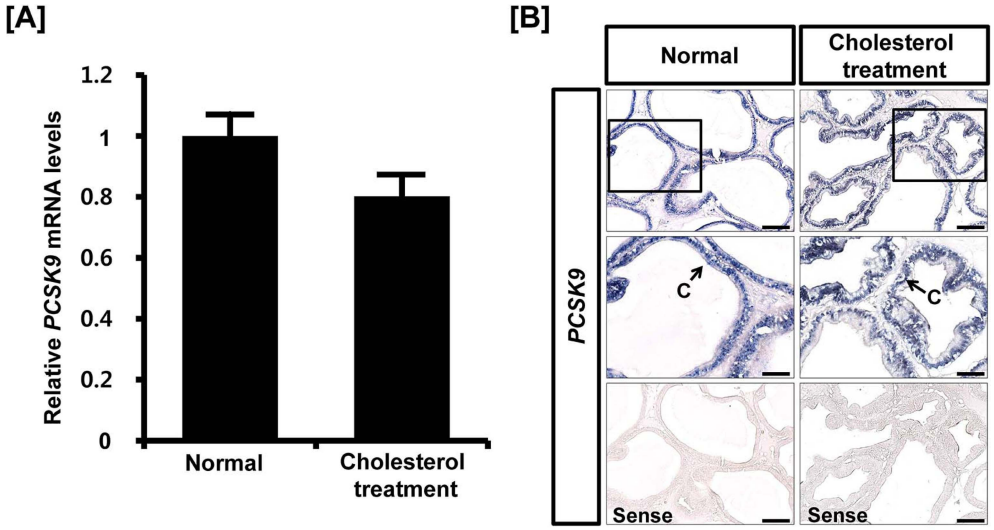

Fig. 2. Cell-specific expression of *Pcsk9* mRNA in the prostate in response to high fat diet. [A] Relative expression of *Pcsk9* mRNA was analyzed by quantitative RT-PCR analyses using cDNA templates from normal and cholesterol-treated prostate. [B] Localization of *Pcsk9* was analyzed using *in situ* hybridization analyses in the rat prostate by cholesterol treatment. Legend: C, cylinder-shaped cells. *Scale bar* represents 10 μm (the first horizontal panels and sense) and 5 μm (the second horizontal panels).

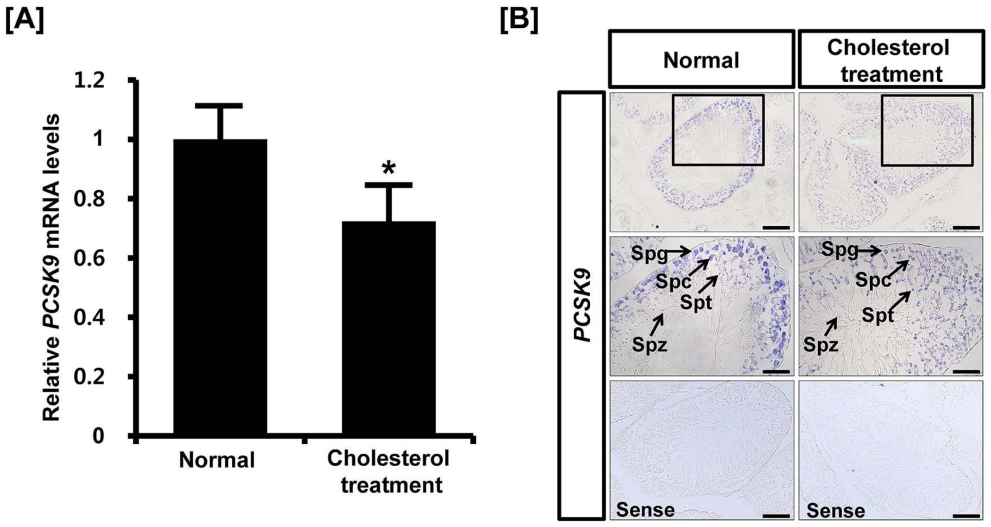

Fig. 3. Comparative expression and localization of *Pcsk9* in the testes between normal and cholesterol-treated rats. [A] Relative expression of *Pcsk9* was analyzed by quantitative RT-PCR analyses using cDNA templates from normal and cholesterol-treated penises. The relative quantities of experimental mRNA were normalized to the quantity of *Gapdh* mRNA (mean ± SEM; $*P < 0.05$). [B] Cell-specific expression of *Pcsk9* mRNA was detected in testes from normal and cholesterol-treated rats by *in situ* hybridization analyses. Legend: Spc, spermatocyte; Spg, spermatogonium; Spt, spermatid. *Scale bar* represents 10 μm (the first horizontal panels and sense) and 5 μm (the second horizontal panels).

바와 같이 음경(penis) 내에서의 *Pcsk9* mRNA의 발현 변화를 실시간유전자발현정량적분석(qRT-PCR) 기법을 통해 측정한 결과, 고콜레스테롤 식이한 랫드의 음경에서 정상과 비교시 *Pcsk9* mRNA의 발현이 약 80%감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, *Pcsk9* 유전자의 세포특이적 발현 위치를 현장혼성화분석(*in situ* hybridization)을 통해 확인한 결과 *Pcsk9*이 사정 시 사출통로가 되는 요도의 상피세포(urethral epithelium)에 주로 발현되며 그 발현이 콜레스테롤 식이에 따라 감소함을 확인하였다(Fig. 1B). 본 연구의 결과는 콜레스테롤을 포함한 고지방식이는 음경 내 *Pcsk9* 유전자의 발현을 감소시키며 이것은 곧 남성 생식계통의 기능장애에 영향을 미칠 것으로 나타낸다.

콜레스테롤에 의한 전립선 비대증 발생에 따른 Pcsk9의 발현

다음으로, 고 콜레스테롤 식이가 랫드의 전립선에서의 *Pcsk9* 발현에 미치는 영향에 대해 확인하였다. 그 결과,

콜레스테롤이 포함된 고지방식이를 섭취한 랫드의 전립선에서 *Pcsk9* 유전자가 정상 식이의 전립선에 비해 약 20% 감소하는 것으로 나타났으며, 특이적으로 전립선 조직 내 원통형 세포(cylinder-shaped cells) 내에서 다량 발현됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 전립선은 많은 양의 콜레스테롤을 합성하고 저장하며 이에 전립선 조직은 콜레스테롤 대사과정 내 작은 변화에도 민감하게 반응할 것으로 여겨진다. 특히, 콜레스테롤은 전립선 비대증과 전립선 암 발달 및 진행에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보고된다[16,17]. 역학조사에 따르면 이상지질혈증 또는 고콜레스테롤혈증은 전립선 암 유병율과 양의 상관관계를 나타내며 전립선 암 세포주를 이식한 이종이식모델(xenograft model)을 통해 콜레스테롤이 전립선 암의 성장을 증진시키는 것으로 밝혀졌다[18]. 또한 전립선 암 세포주 내에서 증가한 콜레스테롤의 함량은 콜레스테롤 항상성을 유지하는 주요한 조절인자의 조절장애로 인해 나타나는 것으로 알려진다. 뿐만 아니라, 고콜레스테롤혈증은 전립선 비대증 발생 위험을 증가시키는 것으로 나타나며 장으로부터 콜레스테롤 흡수를 저해하는 폴리엔마크롤라이드계(polyene macrolides) 약물은 전립선의 크기를 감소시키고 성선기능저하증(lower urinary tract symptoms)를 향상시키는 것으로 보고된다[19]. 고 콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드의 전립선 조직 내에서 이례적인 세포 과형성에 따른 전립선 샘 상피조직 내 불규칙적인 돌기(projection) 와 포상선(acinar gland)의 발달과 분포를 확인할 수 있는데, 이는 전립선 비대증의 두드러진 조직학적 특징 중 하나로 알려진다. 이에 본 연구 결과를 통해 고 콜레스테롤 식이로 전립선 비대증이 유발되며 이 때, 저밀도지단백질 수용체를 감소시키는 *Pcsk9* 유전자의 발현 감소가 질병 유발에 있어 기능적인 역할을 담당할 것으로 예상된다.

콜레스테롤 식이에 의한 정소 조직 내 Pcsk9의 발현 변화

정소는 남성의 생식세포인 정자를 지속적으로 생성하며 뇌하수체 전엽에서 분비되는 황체호르몬(luteinizing hormone)에 의해 스테로이드계 남성 호르몬인 테스토스테론(testosterone)을 분비하는 기관으로서 남성 생식에 있어 중요한 기관 중 하나로 여겨진다. 체내 콜레스테롤의 과도한 축적은 스테로이드 수용체 및 전사인자의 영향으로 내분비계의 변화를 일으켜 고환 내 스테로이드 합성을 손상시킨다[20]. 또한, 고 콜레스테롤 함유 식이는 정자의 질, 양을 감소시키고 정자 원형질막의 표면 구조를 변화시킴에 따라 수정을 위한 정자의 첨체반응(acrosome reaction)을 감소시키며 불임 유발 가능성이 있다고 보고된다[21]. 정소 조직 내 콜레스테롤 항상성을 유지하기 위해 liver X receptor (LXR), steroidogenic factor 1 (SF1), SREBP와 같이 세르톨리 세포 및 레이디그 세포와 같은 남성 생식세포의 분화를 조절하는 전사인자들의 역할이 중요할 것이라 보고된다. 이와 같은 선행연구에 따라 본 연구에서는 콜레스테롤 항상성을 조절하는 주요 인자 중 하나인 Pcsk9의 발현을 고 콜레스테롤 식이 여부에 따른 정소 조직 내에서 확인하였다. Fig. 3A와 같이 *Pcsk9*의 mRNA 발현양은 콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드의 정소 조직에서 정상 정소 조직에 비해 약 28% 감소한 것으로 나타났다. 특히 조직학적 분석을 통해 *Pcsk9*이 정상 정소 조직 내 정원세포(spermatogonium), 정모세포(spermatocyte), 정세포(spermatid)에서 두드러지게 발현됨을 확인하였으며 그 발현은 콜레스테롤 함유 식이를 섭취한 랫드의 정소 조직 내에서 감소되었다(Fig. 3B). 본 연구의 결과는 고 콜레스테롤 식이에 의한 콜레스테롤의 항상성을 유지하는 *Pcsk9* 유전자의 정소 조직 내 발현 변화가 비정상적인 정자발생 및 호르몬 불균형을 일으킬 수 있다는 사실을 암시한다.

Acknowledgement

This research was supported by iPET (Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries) (114065031SB020), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Ministry of Oceans and Fisheries, Rural Development Administration and Korea Forest Service. This research was also supported by a Korea University Grant, Korea Universtiy, Republic of Korea.

국문 요약

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (*PCSK9*) 유전자는 주로 간에서 분비되며 저밀도지단백질 수용체(LDLR)와 결합체를 이루어 세포 내 저밀도지단백질 수용체를 약화시킴에 따라 저밀도지단백질(LDL) 흡수를 감소시킨다. *PCSK9*은 심혈관 질환 및 상염색체 우성 가족성 고콜레스테롤혈증과 깊은 연관성을 나타내며 발병 메커니즘을 조절하는 주요한 인자로서 치료제 개발을 위해 많은 연구가 진행 중에 있다. 하지만 생식계통 내에서 PCSK9의 발현 및 기능에 대한 연구가 미비한 현실이다. 이에 본 연구에서는 고 콜레스테롤 식이에 따라 수컷 랫드의 생식기관 (음경, 전립선, 정소) 내 *Pcsk9*의 발현 변화를 확인하고자 한다. 과도한 콜레스테롤의 축적으로 인한 이상지질혈증은 수컷 랫드의 생식기능장애와 내분비교란을 유발하지만 이를 일으키는 조절 인자와 메커니즘은 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구진의 선행연구에서는 고 콜레스테롤 식이에 의해 혈중 총 콜레스테롤, 저밀도지단백질 콜레스테롤 레벨이 증가 및 고밀도지단백질(HDL) 콜레스테롤의 감소를 확인하였다. 이 후, *Pcsk9*의 mRNA 발현은 음경 조직 내에서 80% 감소하는 것으로 나타났고 그 발현은 주로 발기 조직인 음경해면체 및 요도해면체 내 요

도상피세포에서 주를 이룸을 확인하였다. 또한 *Pcsk9*은 고 콜레스테롤 식이에 의해 발생하는 전립선 비대증 조직 내에서 20% 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 마지막으로 *Pcsk9*은 고 콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드의 정소 조직 내에서 정상 정소 조직에 비해 약 28% 감소하였으며 정자발생에 주요한 정세관 내 정원세포, 정모세포, 정세포에서 그 발현이 확인되었다. 본 연구결과를 통해 Pcsk9 유전자가 수컷 랫드 생식기관 (음경, 전립선, 정소)에서 고 콜레스테롤 식이에 의해 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 *Pcsk9*이 남성 생식기관의 성장 및 발달 메커니즘에 중요한 역할을 미칠 것으로 사료된다.

References

1. V, Charlton-Menys., P, N, Durrington.: Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental physiology*, **93**, 27-42 (2008).
2. Charlton, M.: Obesity, hyperlipidemia, and metabolic syndrome. *Liver transplantation*, **15**, S83-89 (2009).
3. Jones, P. J.: Dietary cholesterol and the risk of cardiovascular disease in patients: a review of the Harvard Egg Study and other data. *International journal of clinical practice,* **63**, 1-8 (2009).
4. McNamara, D. J.: Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, **1529**, 310-320 (2000).
5. Puglielli, L., Tanzi, R. E. and Kovacs, D. M.: Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nature neuroscience*, **6**, 345-351 (2003).
6. Hu, J., La, Vecchia, C., de, Groh, M., Negri, E., Morrison, H., Mery, L.: Dietary cholesterol intake and cancer. *Annals of oncology*, **23**, 491-500 (2012).
7. Gupta R, S., Dixit V, P.: Effect of dietary cholesterol on spermatogenesis. *Zeitschrift fur Ernahrungswissenschaft*, **27**, 236-243 (1988).
8. Lim W., Bae H., Sohn J.Y., Jeong W., Kim S.H., Song G.: Dietary cholesterol affects expression of prostatic acid phosphatase in reproductive organs of male rats. *Biochemical and biophysical research communications*, **456**, 421-427, (2015).
9. Miner, M., Billups, K, L.: Erectile dysfunction and dyslipidemia: relevance and role of phosphodiesterase type-5 inhibitors and statins. *The journal of sexual medicine*, **5**, 1066-1078 (2008).
10. Zhang, D, W., Garuti, R., Tang, W, J., Cohen, J, C., Hobbs, H, H.: Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 13045-13050 (2008).
11. Brown, M, S., Goldstein, J, L.: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340 (1997).
12. Abifadel, M., Varret, M., Rabès, JP., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, JM., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, NG., Boileau, C.: Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature genetics*, **34**, 154-156 (2003).
13. Kim S.C.: Hyperlipidemia and erectile dysfunction. *Asian journal of andrology*, **2**, 161-166 (2000).
14. Musicki, B., Liu, T., Lagoda, G,A., Strong, T,D., Sezen, S,F., Johnson, J,M., Burnett, A,L.: Hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the mouse penis by NAD(P)H oxidase. *The journal of sexual medicine*, **7**, 3023-3032 (2010).
15. Kim J.H., Klyachkin, M,L., Svendsen, E., Davies, M,G., Hagen, P,O., Carson, C,C.: Experimental hypercholesterolemia in rabbits induces cavernosal atherosclerosis with endothelial and smooth muscle cell dysfunction. *The Journal of urology*, **151**, 198-205 (1994).
16. Ahn J., Lim U., Weinstein, S,J., Schatzkin, A., Hayes, R,B., Virtamo, J., Albanes, D.: Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **18**, 2814-2821 (2009).
17. Mondul, A, M., Clipp, S, L., Helzlsouer, K, J., Platz, E, A.: Association between plasma total cholesterol concentration and incident prostate cancer in the CLUE II cohort. *Cancer Cause Control*, **21**, 61-68 (2010).
18. Zhuang, L., Kim, J., Adam, R, M., Solomon, K, R., Freeman, M, R.: Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *The Journal of clinical investigation*, **115**, 959-968 (2005).
19. Freeman, M, R., Solomon, K, R.: Cholesterol and benign prostate disease. *Differentiation*, **82**, 244-252 (2011).
20. Martínez-Martos, JM., Arrazola, M., Mayas, M,D., Carrera-González, M,P., García, M,J., Ramírez-Expósito, M,J.: Diet-induced hypercholesterolemia impaired testicular steroidogenesis in mice through the renin-angiotensin system. *Gen Comp Endocrinol*, **173**, 15-19 (2011).
21. Diaz-Fontdevila, M., Bustos-Obregon, E.: Cholesterol and polyunsaturated acid enriched diet: effect on kinetics of the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, **35**, 176-180 (1993).