

基于网络推断的药物 - 靶点相互作用预测及药物再定位

Feixiong Cheng¹, Chuang Liu², Jing Jiang¹, Weiqiang Lu¹, Weihua Li¹, Guixia Liu¹, Weixing Zhou^{2*}, Jin Huang^{1*}, Yun Tang^{1*}

1. 中国上海华东理工大学药学院新药设计重点实验室, 上海, 中国 2. 华东理工大学商学院, 上海, 中国

摘要

药物靶点相互作用 (DTI) 是药物发现和设计的基础。通过实验确定 DTI 耗时且成本高昂。因此, 有必要开发用于预测潜在 DTI 的计算方法。基于复杂网络理论, 本文开发了三种用于预测 DTI 并用于药物再定位的有监督推理方法, 即基于药物的相似性推理 (DBSI)、基于靶点的相似性推理 (TBSI) 和基于网络的推理 (NBI)。其中, NBI 在四个基准数据集上的表现最佳。然后, 基于 12483 个 FDA 批准和实验性的药物靶点二元链接, 利用 NBI 构建了一个药物靶点网络, 并进一步预测了一些新的 DTI。体外实验证实, 五种老药, 即孟鲁司特、双氯芬酸、辛伐他汀、酮康唑和伊曲康唑, 对雌激素受体或二肽基肽酶 - IV 具有多药理学特征, 其半数最大抑制或有效浓度在 0.2 至 10 毫摩尔之间。此外, 在 MTT 实验中, 辛伐他汀和酮康唑对人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系表现出强大的抗增殖活性。结果表明, 这些方法可以成为预测药物靶点相互作用和药物再定位的有力工具。

引用: 程 F, 刘 C, 江 J, 卢 W, 李 W 等 (2012) 基于网络推断的药物 - 靶点相互作用预测及药物再定位。《公共科学图书馆·计算生物学》8 (5): e1002503. doi:10.1371/journal.pcbi.1002503

编辑: 拉斯·B·阿尔特曼, 美国斯坦福大学

收稿日期: 2011 年 12 月 6 日; 接受日期: 2012 年 3 月 19 日; 发表日期: 2012 年 5 月 10 日

版权: ©2012 Cheng 等人。这是一篇根据知识共享署名许可协议发布的开放获取文章, 该协议允许在任何媒介中不受限制地使用、分发和复制, 但须注明原作者和来源。

资助: 本研究得到了 863 计划 (项目编号: 2012AA020308)、国家自然科学基金 (项目编号: 21072059)、111 项目 (项目编号: B07023)、中央高校基本科研业务费专项资金 (项目编号: WY1113007)、上海市教育委员会创新项目 (项目编号: 10ZZ41) 以及上海市科学技术委员会 (项目编号: 11DZ2260600) 的支持。资助方未参与本研究的设计、数据收集与分析、发表决策或论文撰写。

利益冲突: 作者已声明不存在任何利益冲突。

* 电子邮件: wxzhou@ecust.edu.cn (周伟祥); huangjin@ecust.edu.cn (黄进); ytang234@ecust.edu.cn (唐玉婷)

请提供需要翻译的原文。这些作者对本工作贡献相同。

介绍

在过去十年中, 新化学实体向治疗药物转化的速度显著下降 [1]。有趣的是, 这一现象与药物研发的目标是设计针对单一靶点的高选择性配体这一主流观点同时出现。然而, 这种“一个基因、一种药物、一种疾病”的模式在许多情况下受到了挑战, 于是针对那些作用于多个靶点而非单一靶点的药物, 提出了多药理学的概念 [1]。例如, 血清素和血清素能药物不仅与 G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 如 5-羟色胺受体 1、2 和 4-7 (5-HT_{1,2,4-7}) 等结合, 还可能与离子通道 5-HT₃ 结合 [2,3]。药物的这种多药理学特性使我们能够理解药物的副作用或发现其新用途, 即药物再定位 [4]。一些很好的例子有沙利度胺、西地那非、安非他酮和氟西汀 [4,5]。

迄今为止, 已开发出多种计算机模拟方法来解决药物靶点相互作用 (DTI) 预测和药物再定位的问题 [6-11]。传统方法可分为基于配体的方法和基于受体的方法。基于配体的方法, 如定量构效关系 (QSAR) 和相似性搜索, 在这方面非常有用。例如, 凯泽尔等人利用化学二维 (2D) 结构相似性, 即相似性, 预测已知药物的新分子靶点。

集成方法 [6,7]。确认了 23 种新的药物 - 靶点相互作用 (DTI), 其中 5 种具有 K_i 值, 100 nM。最近, Humberto 等人开发了一种多靶点定量构效关系 (mt-QSAR) 分类器, 并建立了一个用于 DTI 预测的网络服务器 [8]。基于受体的方法, 如反向对接, 也已应用于药物 - 靶点 (DT) 结合亲和力预测、DTI 预测和药物再定位 [9-11]。然而, 这些方法不能用于三维 (3D) 结构未知的靶点。

近年来, 为实现此类目的, 开发了若干基于网络和基于表型的方法。Yildirim 等人构建了一个由美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的药物和通过药物-靶点二元关联与之相连的蛋白质组成的二分图 [12]。该方法定量地表明了“后续”药物的过量存在。Campillos 等人利用副作用相似性来识别新的药物-靶点相互作用 [13]。他们对 20 种意外的药物-靶点相互作用进行了测试, 并通过体外结合实验验证了其中 13 种。Iorio 等人从转录反应中预测并验证了新的药物作用模式和药物再定位 [14]。最近, Butte 研究小组还基于公共基因表达数据报告了两个成功的药物再定位实例 [15,16]。此外, Yamanishi 等人开发了一种通过整合化学和基因组空间来预测药物-靶点相互作用的二分图学习方法 [17]。尽管 Yamanishi 的工作获得了较高的总体预测准确率, 但其灵敏度异常低, 且该方法未经过实验验证。

作者摘要

药物与靶点相互作用的研究是阐明蛋白质功能和理解细胞内分子机制的重要课题。传统预测已知药物新靶点的方法基于小分子、蛋白质靶点或表型特征。在此，我们提出了一种基于网络推断 (NBI) 的方法，该方法仅利用药物 - 靶点二分网络拓扑相似性来推断已知药物的新靶点。NBI 方法的性能优于基于药物的相似性推断和基于靶点的相似性推断方法以及其他已发表的方法。通过 NBI 方法，发现五种老药，即孟鲁司特、双氯芬酸、辛伐他汀、酮康唑和伊曲康唑，对人类雌激素受体或二肽基肽酶 - IV 具有多药理学效应，其半数最大抑制或有效浓度在亚微摩尔至微摩尔之间，通过体外实验得以证实。此外，在 MTT 实验中，辛伐他汀和酮康唑对人类 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系表现出强大的抗增殖活性。结果表明，基于药物 - 靶点二分网络的推断方法可能是挖掘分子多药理学空间中新型药物 - 靶点相互作用的有用工具。

在本研究中，基于复杂网络理论开发了三种推断方法来预测新的药物 - 靶点相互作用 (DTI)：基于药物的相似性推断 (DBSI)、基于靶点的相似性推断 (TBSI) 和基于网络的推断 (NBI) [18-21]。使用了四个基准数据集，分别包含已知作用于酶、离子通道、G 蛋白偶联受体 (GPCR) 和核受体的药物，以评估这些方法的性能，并与文献报道进行比较。然后选择性能最佳的方法构建了包含 FDA 批准药物和实验药物的药物 - 靶点网络，并进一步预测新的 DTI。其中一些预测结果通过体外实验得到了验证。这项工作将为 DTI 预测和药物再定位提供新的有力工具。

结果

这里开发的方法源自复杂网络理论中的推荐算法，并被提出用于药物靶点相互作用 (DTI) 预测以及药物再定位。原则上，DBSI 方法 (图 1A) 与推荐算法中的基于项目的协同过滤方法非常相似 [20]，而 TBSI (图 1B) 则类似于基于用户的协同过滤方法 [21]。与 DBSI 和 TBSI 不同，NBI 方法 (图 1C) 仅利用已知的药物 - 靶点二分网络拓扑相似性来预测未知的药物靶点相互作用，其过程类似于物理学中的质量扩散过程在药物 - 靶点网络中的传播 [18,19]。在 NBI 方法中，为每个给定的药物 (粉色圆圈) 和每个未连接的靶点计算预测分数，并在扩散过程结束后为给定的靶点 (粉色方块) 创建一个按降序排列的药物推荐列表。

这些方法在基准数据集上的表现

使用了四个基准数据集来评估这些方法的性能。这些数据集以四种主要的药物靶点命名，即酶、离子通道、G 蛋白偶联受体 (GPCR) 和核受体。首先，利用数据集中所有已知的药物 - 靶点相互作用 (DTI) (表 S1) 生成了一个药物 - 靶点二分网络 (图 S1)，其中，若根据实验证据已知某种药物与某种靶点相互作用，则在该网络中将该药物 (圆圈) 与该靶点 (方块) 相连。

图 2 展示了在基准数据集上通过 10 折交叉验证的 30 次模拟计算出的受试者工作特征 (ROC) 曲线，从中可以明显看出，所有方法在任何阈值下都表现良好，具有较高的真阳性率 (TPR) 和较低的假阳性率 (FPR)。如图 2 所示，在任何 FPR 值下，NBI 始终具有最高的 TPR 值，这表明在这些方法中，NBI 方法具有最高的预测能力。通过 10 折交叉验证的 30 次模拟，NBI 方法的平均 ROC 曲线下面积 (AUC) 值分别为：对于酶为 0.9756 ± 0.006 ，离子通道为 0.9766 ± 0.007 ，G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 为 0.9466 ± 0.019 ，核受体为 0.8386 ± 0.087 (表 S2)。

图 S2 展示了不同方法下预测长度 (L) 与精度 (P) 的关系。对于酶、离子通道和 G 蛋白偶联受体，从上到下的曲线依次为 NBI (图中的虚线)、TBSI (实线) 和 DBSI (点划线)，这与 AUC 的表现一致。对于核受体，三条曲线的关系不像前三个数据集那样规律，这表明数据完整性 [22] 对于药物靶点相互作用 (DTI) 预测很重要，因为核受体数据集中仅有 90 个 DTI 对，并且每个药物的已知靶点平均数量少于 2 个 (表 S1)。图 S3 展示了不同方法下召回率 (R) 与 L 的关系。NBI 的 R 值明显优于 TBSI 和 DBSI (表 S3)。需要强调的是，R 值是 DTI 建模中最重要参数。R 值低表明模型从复杂的 DT 网络中识别已知 DTI 的能力较弱。

药物-靶点相互作用的预测

首先，利用从 DrugBank [23] 中提取的已知药物 - 靶点相互作用 (DTI) 数据构建了一个药物 - 靶点二分网络。如图 3 所示，许多已获批药物具有明显的多药理学特征。例如，多靶点药物 NADH 与 95 种蛋白质相连，而多靶点受体 α_{1A} 肾上腺素能受体则与 52 种药物相关联。这种对药理空间的全面映射使我们能够通过我们的方法预测老药的新适应症。

随后，利用 NBI 方法预测了药物靶点二分网络中的新药物 - 靶点相互作用。为了测试 NBI 在 DrugBank 上的可行性，通过 10 折交叉验证进行了 30 次模拟，对其性能进行了评估。如图 S4 所示，对于已批准的药物和包含已批准及实验性药物的全局数据集，NBI 分别获得了 0.8656 ± 0.009 和 0.8496 ± 0.012 的高 AUC 值，这表明 NBI 方法对 DrugBank 是有效的。

为了通过实验验证预测结果，我们选取了一种酶 (DPP-IV) 和两种受体 (ER α 和 ER β) 作为研究目标，原因在于我们实验室具备这些靶点的药物筛选系统。通过将 NBI 方法应用于全球 DrugBank 数据库，预测出了所有针对 DPP-IV、ER α 和 ER β 的潜在新药。从推荐的 50 种潜在 DPP-IV 抑制剂中选取了 9 种可购买的旧药 (表 S4)，而从推荐的 80 种潜在 ER 配体中选取了 31 种可购买的旧药 (表 S5 和 S6) 用于实验检测。

药物再定位的实验验证

对这 40 种老药均进行了采购，并通过体外实验进行了相应的测试。如图 4 和图 5 所示，在所购的 9 种化合物中，有一种已获批药物，即孟鲁司特，被确认为一种未被报道的 DPP-IV 抑制剂，其半数最大抑制浓度 (IC_{50}) = 9.79 毫摩尔。对于 ER α 和 ER β ，四种已获批药物，即双氯芬酸、辛伐他汀、酮康唑和

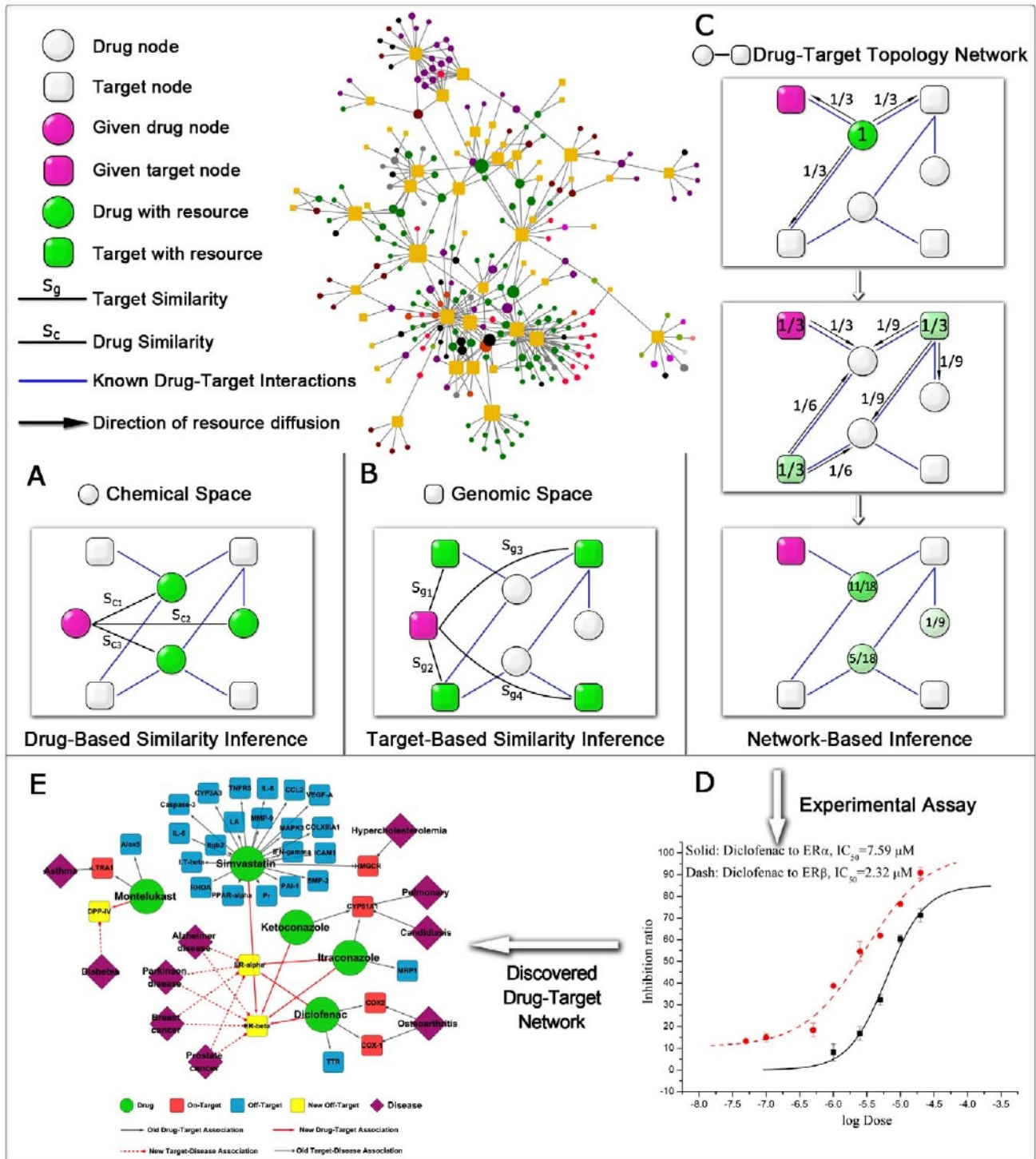


图 1. (A) 基于药物的相似性推断 (DBSI)、(B) 基于靶点的相似性推断 (TBSI) 以及 (C) 基于网络的推断 (NBI) 方法的示意图。整个工作流程包括五个步骤: (i) 收集已知的药物-靶点相互作用数据并构建药物-靶点二分图; (ii) 计算药物-药物二维结构相似性 (S_c)、靶点-靶点基因组序列相似性 (S_g) 以及药物-靶点拓扑网络相似性; (iii) 将新方法应用于给定靶点 (粉色方块) 的新药预测或给定药物 (粉色圆圈) 的新靶点预测; (iv) 通过实验检测验证新的药物-靶点相互作用 (D); (v) 利用药物-靶点-疾病关联网络分析可视化实验结果 (E)。在 A-C 中, 给定药物节点 (粉色圆圈) 表示我们想要为其预测新靶点的药物, 给定靶点节点 (粉色方块) 表示我们想要为其预测新药物的靶点, 有资源的药物 (绿色圆圈) 表示该药物有资源。带有资源 (绿色方块) 的目标表示该目标具有资源, 节点拥有的资源越多, 颜色越深; 蓝色边表示有已知实验证据的药物-目标相互作用; 黑色箭头表示资源扩散方向。在 E 中, 绿色圆圈: 药物节点; 红色方块: 靶点节点; 蓝色方块: 脱靶节点; 黄色方块: 新靶点; 紫色方块: 疾病节点。

图 1 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g001

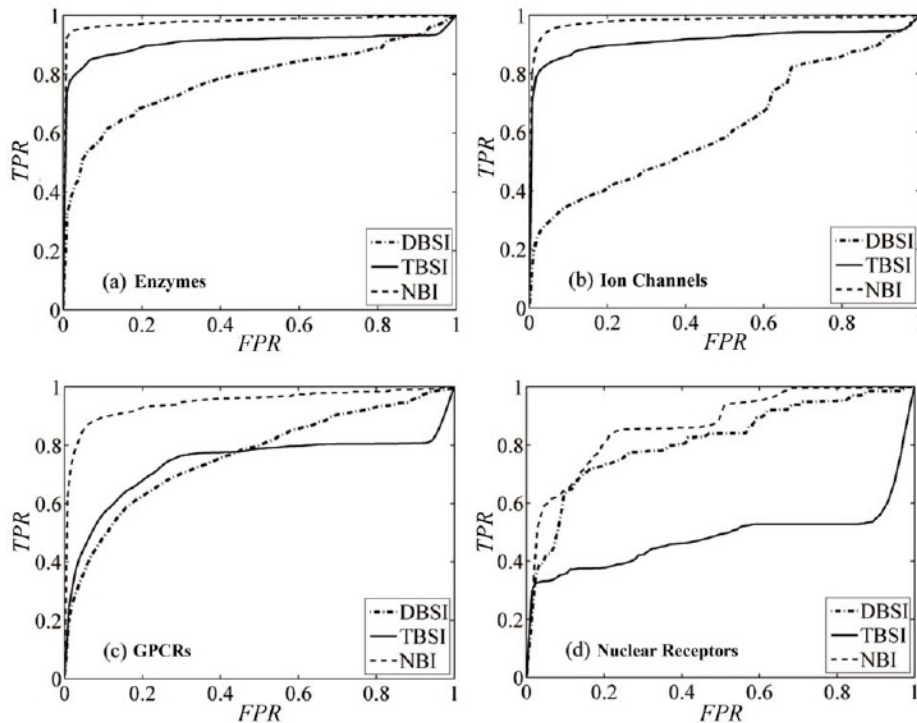


图2.通过30次10折交叉验证测试模拟了针对给定靶点预测新已知药物的三种不同方法在四个基准数据集上的受试者工作特征(ROC)曲线, (a) 酶, (b) 离子通道, (c) G蛋白偶联受体(GPCR)和(d)核受体, 基于药物的相似性推断(DBSI): 点划线曲线, 基于靶点的相似性推断(TBSI): 实线曲线, 基于网络的推断(NBI): 虚线曲线, FPR: 假阳性率, TPR: 真阳性率。doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g002

在31种化合物中,有2种被确认为新型雌激素受体(ER)配体,其 IC_{50} 或半数有效浓度(EC_{50})值均低于10毫摩尔。伊曲康唑是一种具有双重特性的化合物,对 $ER\alpha$ 的激动活性 EC_{50} 为200纳摩尔,而对 $ER\beta$ 的拮抗活性 IC_{50} 为280纳摩尔,高于经典抗乳腺癌药物他莫昔芬。

此外,通过MTT检测法评估了双氯芬酸、辛伐他汀、酮康唑和伊曲康唑对人MDA-MB-231乳腺癌细胞系的抗增殖活性。如图6所示,辛伐他汀和酮康唑表现出显著的抗增殖活性,其 IC_{50} 值分别为1.49毫摩尔和8.95毫摩尔。

已验证的药物-靶点相互作用的网络可视化

药物-靶点、靶点-疾病以及疾病-基因关联的网络可视化能够为发现新药的治疗适应症或老药的不良反应提供有用信息。如图7所示,其中疾病相关基因和疾病-基因关联(见表S7)是从在线孟德尔遗传病数据库(OMIM)的疾病图谱中提取的[24],很容易看出这五种老药(以青色表示)的多药理效应。例如,辛伐他汀原本抑制HMG-CoA还原酶(靶点用红色方框标注)[23,25],但在图7中它有超过20个脱靶作用(灰色方框)[24]。在本研究中,辛伐他汀被证实对 $ER\beta$ 具有拮抗作用, IC_{50} 值为3.12 mM,并且对人MDA-MB-231乳腺癌细胞系表现出良好的抗增殖活性, IC_{50} 值为1.49 mM(图5和图6)。

尽管有些药物是通过与特定蛋白质结合发挥作用的,但大多数获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物在研发时并不了解其针对的疾病所涉及的分子机制。

如,酮康唑可抑制睾酮的生成,泌尿科医生已将其用于治疗晚期转移性前列腺癌患者的顽固性骨痛和即将出现的神经损伤[26,27],但其分子机制尚不清楚。在本研究中,发现酮康唑能选择性抑制 $ER\beta$,其 IC_{50} 值为0.79毫摩尔,对人MDA-MB-231乳腺癌细胞系表现出良好的抗增殖活性, IC_{50} 值为8.95毫摩尔,这表明酮康唑可能具有更广泛的抗癌适应症,在临床上对乳腺癌有治疗效果。

讨论

方法比较

在本研究中,开发了三种有监督的推断方法,即DBSI、TBSI和NBI,用于预测新的药物-靶点相互作用(DTI)。这些方法在四个基准数据集上表现优异,优于其他文献中报道的一些方法[17,28,29]。这三种方法的本质区别在于相似性的定义。DBSI基于化学二维结构相似性,TBSI基于基因组序列相似性,而NBI仅基于DT二分网络拓扑相似性(图1)。DBSI在基准数据集上较差的AUC值表明,仅基于化学结构相似性的预测效果不佳(图2)。这可能是由于相似性中的冗余所致。例如,在酶数据集中,尽管化学结构相似性能够非常准确地呈现药物相似性,但相似结构中不与酶结合的部分应是冗余的,从而降低了预测的准确性。TBSI也存在类似的冗余问题。尽管NBI是最简单的,因为它忽略了药物和靶点的结构信息,但其预测结果却是最可靠的(见图中的箱线图)。

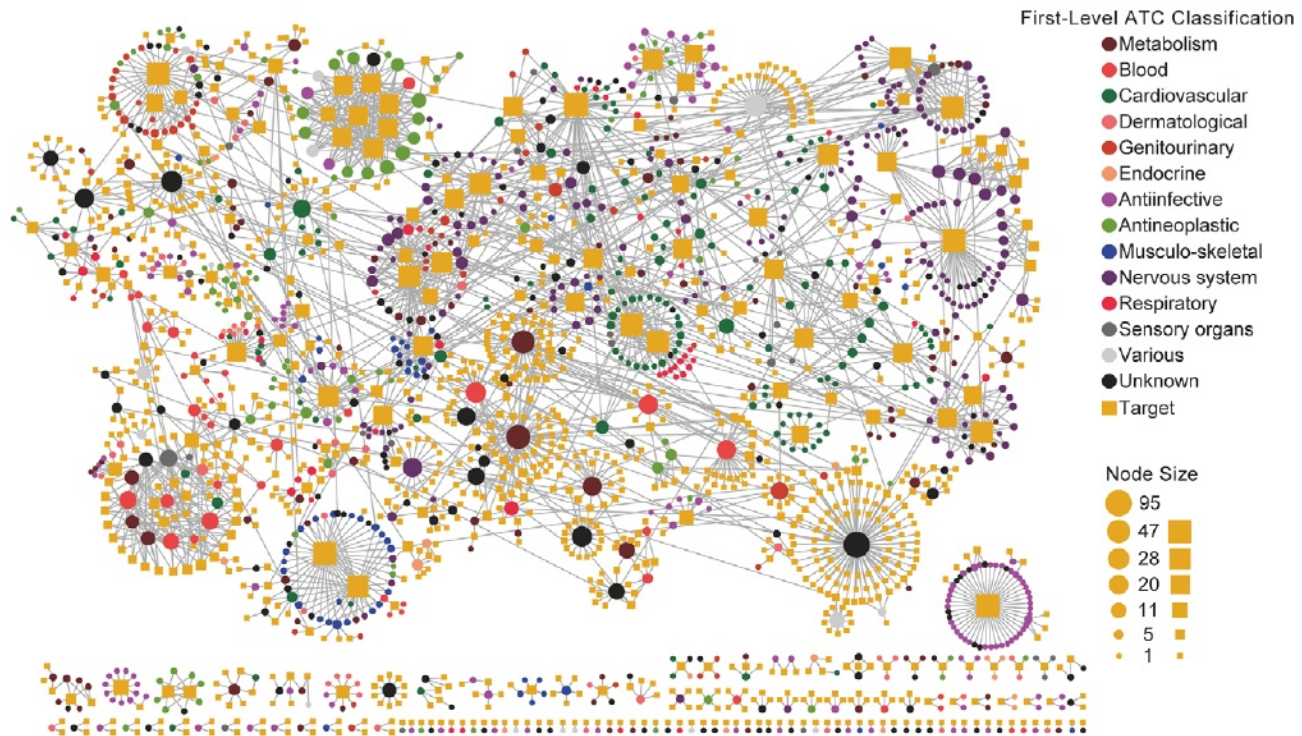


图3. 药物-靶点 (DT) 二分网络中, 若药物库 (DrugBank) 中已知某药物与某靶点存在实验性相互作用, 则药物节点 (圆形) 与靶点节点 (方形) 之间由灰色边相连。该 DT 网络是基于已知的美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的小分子药物与靶点的相互作用生成的。药物节点的大小是该药物在药物库中所连接靶点数量的比例。靶点节点的大小是该靶点在药物库中所连接药物数量的比例。颜色代码见图例。药物节点 (圆形) 根据其解剖治疗学分类进行着色。该图由 Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) 绘制。

图3 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g003

S5). 而 NBI 仅使用了药物靶点相互作用 (DTI) 拓扑网络相似性来推断新的潜在药物靶点相互作用, 无需任何靶点和药物的三维结构信息。因此, NBI 的表现优于 DBSI、TBSI 以及其他反向对接方法[10,11]。

最近, 汉森等人从基因-药物网络中创建了四个特征, 并构建了一个逻辑回归分类器用于药物-基因关联预测[30]。尽管获得了较高的预测性能, 但汉森工作的一个内在问题是, 负药物-基因对是随机构建的 (基于未知的药物-基因关联进行选择), 这在构建逻辑回归分类器时容易因负样本选择不准确而引入噪声。山下等人通过整合化学和基因组空间来预测新的药物-目标相互作用。获得了合理的 AUC 值, 但 R 值极差, 对于酶、离子通道、GPCR 和核受体分别为 0.574、0.271、0.234 和 0.148 [17], 且预测结果未经过实验验证。与这些已报道的方法相比, NBI 仅使用简单的药物-目标关联信息, 却取得了较高的预测性能 (R 值超过 0.9, 表 S3)。江和巴特开发了一种基于关联罪责的方法用于疾病-基因关联预测和药物再定位[31]。该方法仅使用基因-疾病的关联信息。在本研究中, NBI 充分利用了完整 DT 网络拓扑结构 (图 1) 中编码的有标签和无标签信息, 从而同时挖掘了拓扑和功能模块性。

NBI 在药物再定位中的潜在应用

通常, 药物靶点相互作用 (DTI) 预测和药物再定位主要有两种方法: 传统药物发现方法, 其中

于某个特定靶点, 可预测出 5 种新药或有效成分; 而化学生物学方法则可针对给定的药物或化学物质预测新的潜在靶点[17]。在本研究中, NBI 方法继承了这两种方法的优点。它能够通过个性化推荐同时为给定靶点筛选候选药物, 或为给定药物筛选候选靶点 [18,19]。通过矩阵转置, 我们还能给给定药物预测新的潜在靶点。如图 S6 所示, 我们的三种方法在预测给定药物的新候选靶点方面均表现出色, 其中 NBI 方法的预测准确率最高。因此, NBI 可能成为药物再定位的有力工具。

由于 NBI 仅利用了已知的药物-靶点相互作用信息, 对于训练集中没有已知靶点信息的新药, NBI 无法预测其靶点。这是该方法的一个弱点。然而, 通过将 DBSI、TBSI 和 NBI 结合起来, 可以预测新药潜在的靶点。我们正在积极开发一种新的网络推断方法, 该方法基于扩散理论整合药物、蛋白质和表型特征 [32]。我们的方法还可以通过整合疾病、基因和药物之间的其他相似性度量, 用于预测其他生物网络, 如蛋白质-蛋白质相互作用、药物-基因、基因-疾病和药物-疾病网络 [33-35]。

新型二肽基肽酶-IV 抑制剂的多靶点药理学特征

孟鲁司特是半胱氨酰白三烯 1 受体拮抗剂, 由默克公司以顺尔宁®这一商品名在美国及其他国家上市销售。尽管朗格卢瓦等人曾报告称

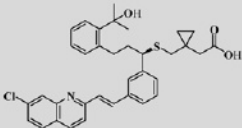
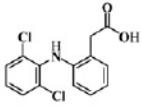
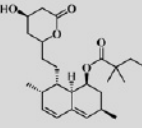
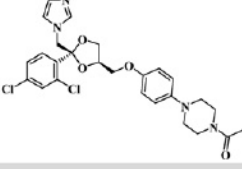
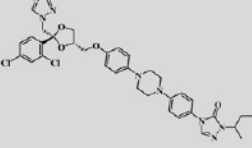
Drug name	Structure	^a Original pharmacological target	Predicted new target	IC ₅₀ (or EC ₅₀), μM	^c Antiproliferative Activities (IC ₅₀)
Montelukast		Cysteinyl leukotriene receptor	DPP-IV	DPP-IV: 9.79 (IC ₅₀)	not available
Diclofenac		Cyclooxygenase (COX-1 and COX-2)	ERα & ERβ	ERα: 7.59±0.10 (IC ₅₀); ERβ: 2.32±0.06 (IC ₅₀)	14.85%
Simvastatin		Hydroxymethylglutaryl COA reductases	ERβ	ERβ: 3.12±0.01 (IC ₅₀)	1.49 μM
Ketoconazole		14-α demethylase (CYP51A1)	ERβ	ERβ: 0.79±0.15 (IC ₅₀)	8.95 μM
Itraconazole		CYP51A1	ERα & ERβ	ERα: 0.20±0.41 (EC ₅₀), 0.32E-06 (REC ₅₀) ^b ; ERβ: 0.28±0.73 (IC ₅₀)	28.17%

图 4. 五种已获批药物新发现的药物靶点适应症的预测和生物测定结果。所展示的数据为至少三次重复测量的平均值。^aOriginal 药理学靶点信息从 DrugBank 中提取 (<http://www.DrugBank.ca/>)。^b50% 相对有效浓度是指测试化合物表现出最大活性的 E2 的 50% 激动活性时的浓度。REC₅₀ 提供了相对于 E2 的雌激素活性。^cAntiproliferative 活性通过 MTT 检测法在人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系中测定。IC₅₀: 半数最大抑制浓度, EC₅₀: 半数最大有效浓度, ER: 雌激素受体, DPP-IV: 二肽基肽酶-IV。

图 4 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g004

孟鲁司特通过一种不依赖白三烯的机制调节嗜酸性粒细胞蛋白酶活性, 这一发现最近才被报道[36], 但目前尚未有关于其与 DPP-IV 结合的报道。在此, 孟鲁司特被预测并验证为一种新的 DPP-IV 抑制剂, 其 IC₅₀ 值为 9.79 毫摩尔。最近, Faul 等人 在小规模临床试验中发现, 口服孟鲁司特可改变胰岛素的低水平 [37]。因此, 可以合理推断孟鲁司特可能通过抑制 DPP-IV 在抗 糖尿病治疗中具有新的潜在适应症 (图 7)。将孟鲁司特与经典 DPP-IV 抑制剂西格列汀的结构相似性进行比较, 基于 MACCS 密钥的 Tanimoto 相似度[38]仅为 0.38, 这证实了 NBI 能够成功预测给定靶点的新型结构骨架分子。

新型雌激素受体配体的多靶点药理学特征

双氯芬酸是一种具有镇痛和解热作用的乙酸类非甾体抗炎 药 (NSAID), 广泛用于治疗疼痛、痛经、眼部炎症等。过去 几十年里, 人们认为双氯芬酸的抗炎作用与抑制白细胞迁移和 环氧化酶 (COX-1 和 COX-2) 有关, 从而在外周抑制前列腺素 的合成[23]。在此, 我们首次报道双氯芬酸对雌激素受体α (ERα) 和雌激素受体β (ERβ) 具有靶向作用, 其半数抑制浓 度 (IC₅₀) 分别为 7.59 和 2.32 毫摩尔。

(图 4)。最近有一些类似的例子表明非甾体抗炎药可作用于 核受体。周等人报道, 舒林酸可通过与维甲酸 X 受体α (RXRa) 结合诱导细胞凋亡[39], 而莱曼等人发现吲哚美辛可激活过氧 化物酶体增殖物激活受体α和β[40]。还有几份报告表明口服雌 激素受体配体具有神经保护和抗炎作用[41]。由于雌激素受体α 和β在包括中枢神经系统、心血管系统、消化系统和免疫系统 在内的多个组织中广泛表达[42], 因此双氯芬酸的抗炎和神经 保护作用可能是通过抑制雌激素受体α和β的新生物学途径实现 的 (图 7)。

辛伐他汀是洛伐他汀的甲基化形式, 是一种抗高血脂症药 物, 可抑制 HMG-CoA 还原酶[23]。在此我们发现辛伐他汀能 够抑制 ERb, 其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 3.12 毫摩尔。有一些证 据支持我们的发现。例如, Wolozin 等人报告称, 辛伐他汀与 痴呆、阿尔茨海默病 (AD) 和帕金森病 (PD) 发病率的显著 降低有关[43,44]; 多项研究证明雌激素治疗在许多神经退行性 疾病模型中有效[41,45]; 并且他汀类药物也被发现对人乳腺癌 细胞的增殖具有抑制作用[46]。因此, 痴呆和 PD 发病率的显著 降低以及他汀类药物的抑制作用与 ERb 抑制有关。

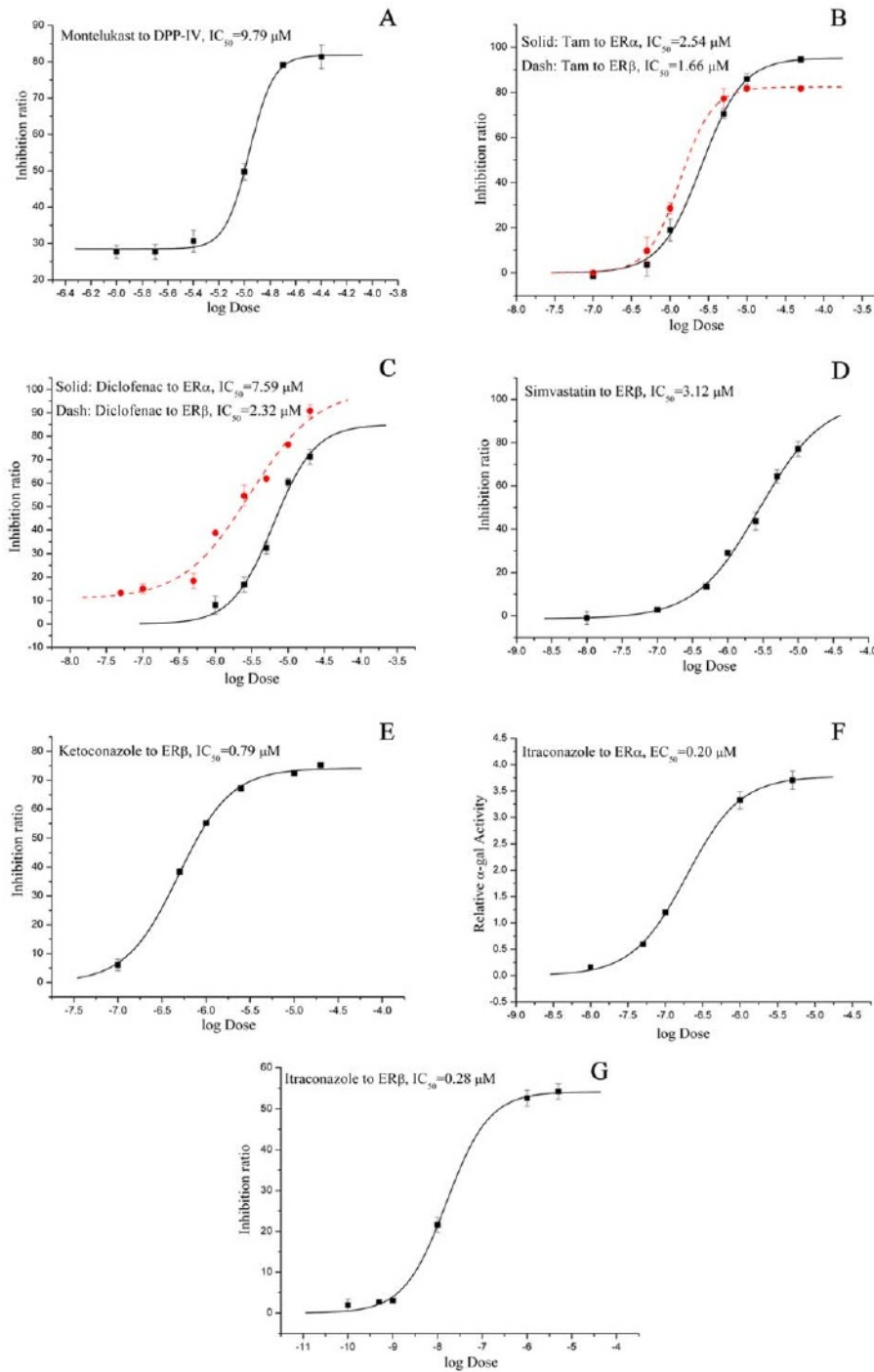


图 5. 实验验证的多药理学活性对雌激素受体 (ER) 和二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 的剂量反应曲线。抑制激活的剂量反应曲线: 孟鲁司特对 DPP-IV (A); 转录激活的剂量反应曲线: 他莫昔芬 (Tam) 对 ER α (黑色实线) 和 ER β (红色虚线) (B), 双氯芬酸对 ER α (黑色实线) 和 ER β (红色虚线) (C), 辛伐他汀对 ER β (D), 酮康唑对 ER β (E), 伊曲康唑对 ER α (F), 伊曲康唑对 ER β (G)。在 A-G 中, 误差线表示三次重复测定的平均值 \pm 标准差 (SD)。

图 5 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g005

辛伐他汀对 ER β 的潜在新型抑制作用生物学途径 (如图 7 所示) 或许可以解释人乳腺癌细胞的增殖情况。

酮康唑和伊曲康唑作为 14- α 去甲基酶 (CYP51A1) 抑制剂, 是合成的抗真菌药物 [23], 可用于治疗难治性骨痛和神经损伤。

晚期转移性前列腺癌患者中, 这两种药物均被证实能与 ER α 和 ER β 结合, 其 IC₅₀ 或 EC₅₀ 值均小于 1 毫摩尔 (图 5)。14- α 去甲基酶和雌激素受体在结构和功能上没有任何共同特征, 但通过 NBI 方法推断它们具有相同的配体。数据表明, 该疗法

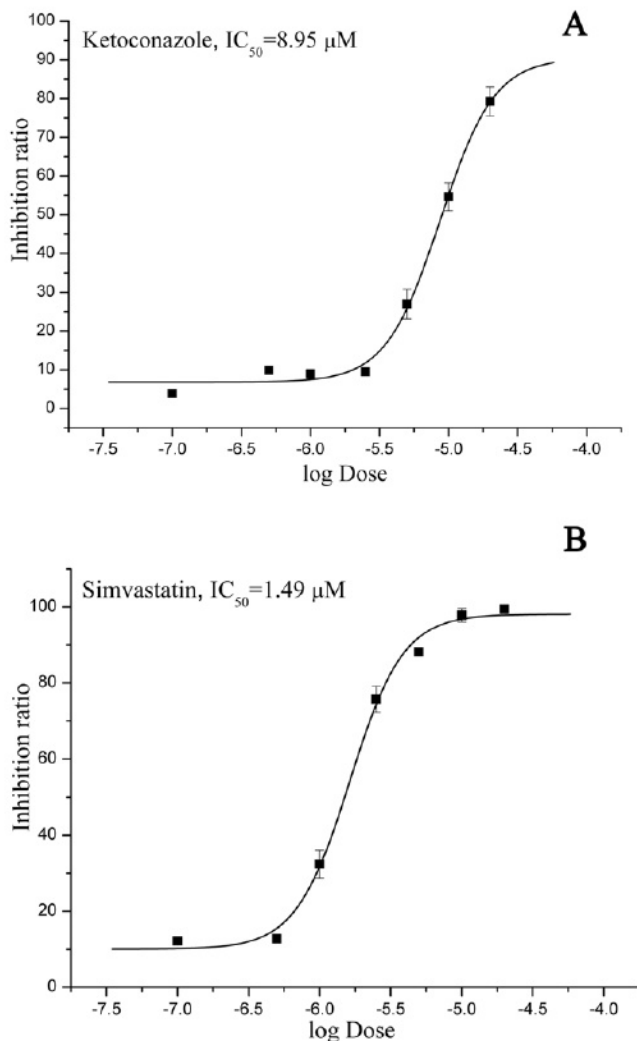


图 6. 通过 MTT 法测定酮康唑 (A) 和辛伐他汀 (B) 对人 MDA-MB-231 乳腺癌细胞系的抗增殖效力的剂量 - 反应曲线。误差棒表示三次重复测定的标准偏差 (SD)。

图 6 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g006

酮康唑对前列腺癌的作用可能是因为酮康唑对雌激素受体 b 的选择性抑制作用。

在过去的几十年里, 组织或亚型选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 在临床上显示出巨大的优势, 因为其副作用较少[47, 48]。如图 4 所示, 酮康唑对 ERb 有选择性抑制作用, IC_{50} 值为 0.79 毫摩尔, 且对 ERa 无拮抗或激动活性。然而, 伊曲康唑是一种具有双重作用的化合物, 对 ERa 有激动活性, 但对 ERb 的拮抗活性高于经典的抗乳腺癌药物他莫昔芬 (图 5)。酮康唑和伊曲康唑均可作为发现新型口服 SERM 的先导化合物。

材料与方法

数据准备

基准数据集。基准数据集中的所有药物 - 靶点相互作用 (DTI) 数据均从 KEGG BRITE [49]、BRENDA [50]、SuperTarget [51] 和 DrugBank [23] 收集而来。如表 S1 所列,

个数据集中已知药物的数量分别为 445 种、210 种、223 种和 54 种; 而数据集中酶、离子通道、G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 和核受体的靶点数量分别为 664 个、204 个、95 个和 26 个。已知相互作用的数量分别为 2926 个、1476 个、635 个和 90 个。关于这些数据集的进一步描述可参见原始文献 [17]。

DrugBank 数据库。DrugBank 数据库 (于 2010 年 8 月 25 日访问) 从网站 <http://www.drugbank.ca/> 下载 [23]。初始数据库包含 6796 个药物条目, 其中包括 1437 种经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的药物和 5174 种实验性药物。排除了包含无机化合物、非共价复合物、生物技术药物和混合物的条目。经过筛选的数据库包含 12483 个药物 - 目标相互作用 (DTIs), 其中 2988 个是基于经 FDA 批准的药物。

本研究中使用的所有数据集均可在线获取: <http://www.lmmd.org/database/dti/>。

方法描述

将药物集表示为 $D \sim d_1, d_2, \dots, d_n$, 将靶点集表示为 $T \sim t_1, t_2, \dots, t_m$, 药物 - 靶点相互作用 (DTI) 可以描述为一个二分 DT 图 $G(D, T, E)$, 其中 $E \sim e_{ij}$: $d_i [D, t_j]$ [图 A]。当药物 d_i 与靶点 t_j 相关联时, 在 d_i 和 t_j 之间绘制一条边。DT 二分网络可以通过一个 $n \times m$ 邻接矩阵 f_{ij} 来表示, 其中 $a_{ij} = 1$ 当且仅当 d_i 和 t_j 相连, 否则 $a_{ij} = 0$ 。

基于药物的相似性推断 (DBSI)。该方法的基本思路是: 如果一种药物与某个靶点相互作用, 那么与该药物相似的其他药物也会被推荐给该靶点 (图 1A)。对于药物 - 靶点 (DT) 对 $d_i \{t_j$, d_i 和 t_j 之间的关联由以下预测得分确定:

$$v_{ij}^D = \frac{\sum_{l=1, l \neq i}^n S_C(d_i, d_l) a_{lj}}{\sum_{l=1, l \neq i}^n S_C(d_i, d_l)}, \quad (1)$$

其中 $S_C(d_i, d_l)$ 是药物 d_i 和 d_l 之间的二维化学相似度, 此处通过 SIMCOMP [52] 进行计算。

基于靶点的相似性推断 (TBSI)。该方法的主要思想是: 如果一种药物与某个靶点相互作用, 那么该药物将被推荐给与该靶点序列相似的其他靶点 (图 1B)。对于药物 - 靶点对 $d_i \{t_j$, 药物 d_i 与靶点 t_j 之间的关联由以下预测得分确定:

$$v_{ij}^T = \frac{\sum_{l=1, l \neq j}^m S_g(t_j, t_l) a_{il}}{\sum_{l=1, l \neq j}^m S_g(t_j, t_l)} \quad (2)$$

其中 $S_g(t_j, t_l)$ 表示目标 t_j 和 t_l 之间的基因组序列相似度, 此处通过 Smith-Waterman 分数的标准化版本计算得出[17]。所有目标的原始序列均来自 KEGG GENES 数据库。

基于网络的推断 (NBI)。设 $f_0(o) \sim a_{0o}$ [1, 2], ng 为药物 d_o 对目标 t_j 的初始资源, $f(i)$ 为药物 d_i 的最终资源。如图 1C 所示, 对于一般的药物 - 目标二分网络, 经过两步扩散后的最终资源 (得分) $f(i)$ 为:

$$f(i) = \sum_{l=1}^m \frac{a_{il}}{k(t_l)} \sum_{o=1}^n \frac{a_{0o} f_0(o)}{k(d_o)} \quad (3)$$

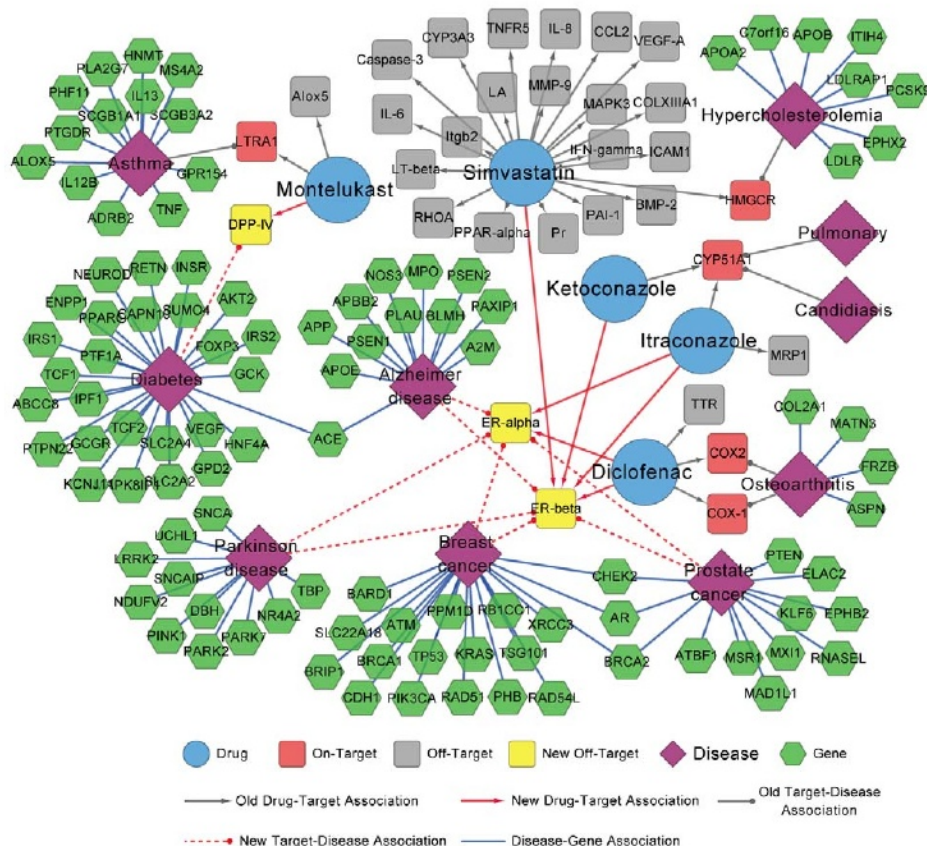


图 7. 发现的药物 - 靶点、靶点 - 疾病和疾病 - 基因关联网络。灰色箭头表示已知的药物 - 靶点相互作用，灰色边表示已知的靶点 - 疾病关联，蓝色边表示已知的疾病 - 基因关联，这些信息均从 DrugBank、在线孟德尔遗传病信息库 (OMIM) 致病图谱和文献报告中提取 (更多数据见表 S7)。已批准药物节点 (青色圆圈) 和靶点节点 (黄色方块) 之间的红色箭头表示本研究中新发现的药物 - 靶点相互作用。红色虚线表示本研究中新发现的靶点 - 疾病关联。青色圆圈：药物节点，红色方块：在靶点 (DrugBank 中注释的主要靶点)，灰色方块：脱靶点，黄色方块：新脱靶点 (本研究中为给定药物新发现并验证的靶点)，紫色方块：疾病节点，绿色正六边形：基因。该图由 Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) 绘制。

图 7 doi:10.1371/journal.pcbi.1002503.g007

其中, $\setminus (P_m)$ 表示在 $\setminus (s = i)$ 时, $\setminus (k(d_o) \setminus \text{sim } a_{o_s})$ 所对应的被选目标数量。

n 与 d_o 相互作用, 且 $k(t) \sim P_{asl}$ 表示的是数量

$s = 1$

与 t_i 有相互作用的药物

资源

我我 分配过程, 可以写成矩阵形式

形式为 $f_j \sim W f_{o_j}$, 其中, f_{o_j} 是 f_o 的列向量, 可以被视为 $W \sim \text{fwpggn} \sim 1 \text{ Pm apl aql}$ (由于原文包含无法识别的字符, 因此无法准确翻译。) 转移矩阵。 f_j 是药物资源的最优配置情况。

对于这三种方法, 所有未连接的药物均按降序排列, 构成目标 t_i 的推荐列表。列表中预测得分高的药物更有可能与目标 t_i 发生相互作用。

绩效评估

为了测试这些方法的性能, 采用了 10 折交叉验证的方法, 每个结果都是通过重新计算 30 次得出的。对于每个数据集, 所有的药物 - 靶点相互作用 (DTIs) 都被随机等分为 10 份。每份依次作为测试集, 其余 9 份则作为训练集。由于是随机划分, 某些靶点 (或药物) 可能恰好出现在测试集中。

训练集中没有相关信息的 9 个节点及其对应的链接无法通过 NBI 方法进行预测。在性能评估中未考虑此类链接。

计算了三个参数, 即曲线下面积 (AUC)、准确率 (P) 和召回率 (R), 以评估性能。AUC 值是通过以下方式获得的

q_{ij}

通过计算排名得分, 该得分可表示为 r_{ij} ,

$n\{k_j$

其中 $n\{k_j$ 为推荐列表的长度。测试集中链接的平均排名分数为: $r \sim 1 \text{ P } q_{ij}$

杰普·伊杰普·恩克 其中 E_p 为测试集。并且 AUC 值

这恰好等于 1。由于测试集中的链接是实际的药物 - 靶点相互作用, 因此一个好的算法应该能对它们做出良好的预测。

从而导致较大的 AUC。 $1 \sim 1 \text{ NjL}$ P_m P 可以从 $P \sim$ 中获得, 其中 N_{jL} 表示的是 毫升

在排名前 L 位的药物中, 正确预测为阳性的数量

1 皮姆尔

其 t_i 的推荐列表, 缺失的链接数量为 n_{ij} 的 P 和 R 表明在黄金标准交互中预测出了更多的链接。

药物-靶点相互作用的预测

将所有 DTI 视为已知信息, 我们通过 NBI 方法计算出具有最高预测得分的推荐列表。

所有数据集。根据得分从高到低排序，列表上方的药物更有可能与给定的靶点相互作用，并预测了相应的新的药物-靶点相互作用（DTIs）。上述所有数据集的完整预测列表均可免费在线获取：<http://www.lmmd.org/database/dti/>。

实验验证

复方采购。从 ERs 和 DPP-IV 的推荐清单中选取了总共 40 种可购买的获批药物（表 S4、S5、S6），并从中国上海的国家新药筛选中心（<http://www.screen.org.cn/>）购得。

二肽基肽酶-IV 抑制试验。化合物对人重组 DPP-IV 的抑制作用是使用 DPP-IV 药物发现试剂盒（Biomol，美国）按照制造商的说明进行测定的。在 Synergy™ 2 多模式微孔板读数仪（BioTek）中，以 380 纳米的激发波长和 460 纳米的发射波长检测 DPP-IV 的活性。P32/98（10 毫摩尔）用作阳性化合物。IC₅₀ 值通过 GraphPad Prism 4 软件进行测定，进行了三次独立测定。

基于酵母双杂交系统的检测。为评估化合物对雌激素受体（ER）的激动或拮抗活性，根据醋酸锂法[53]，通过酵母共转化 pGBKT7-ERα/bLBD 和 pGADT7-SRC1 构建了酵母双杂交系统。组合质粒 pGBKT7-ERα/bLBD（ERα 的 301 - 553 氨基酸残基和 ERβ 的 248 - 510 氨基酸残基）和 pGADT7-SRC1（613 - 773 氨基酸残基）的制备方法如前所述[54]。丁基 4-（丁酰氧基）苯甲酸酯是一种新的选择性 ERβ 激动剂，可诱导 CHO-K1 细胞中 GLUT4 的表达。将这两个构建体共转化到酵母菌株 AH109 中后，我们通过简便的α-半乳糖苷酶测定成功评估了 ER/SRC1 的相互作用。在 hERα/β 激动剂测试中，酵母转化体与对照溶剂（DMSO）或指定化合物共孵育 24 小时，在拮抗剂测试中添加 1 nM E2。然后使用对硝基苯基α-D-半乳糖苷作为底物，根据 Clontech 酵母协议测定α-半乳糖苷酶活性。α-半乳糖苷酶活性根据公式 4 计算：

$$a \text{ 半乳糖苷酶活性 } \frac{1}{2} \text{ 毫单位} = (\text{毫升}|\text{细胞}) \\ = \frac{OD_{410} \times V_f \times 1000}{(\epsilon \times b) \times t \times V_i \times OD_{600}} \quad (4)$$

其中 t 为培养的经过时间（分钟）， V_i 为测定的最终体积（200 毫升）， V_f 为所加培养基上清液的体积（16 毫升）， OD_{600} 为过夜培养的光密度， ϵ_{6b} 为 410 纳米处对硝基苯酚的摩尔吸光系数，光程（厘米）= 10.5 毫升/毫摩尔。

MTT 检测。通过 MTT 检测法对细胞增殖进行定量。将 MDA-MB-231 细胞以 1.56×10^4 的密度接种于 96 孔板中，每孔加入含 10% 煤炭去除胎牛血清（不含酚红）的 DMEM/F12 培养基，然后在 37°C、5% CO₂ 的湿空气环境中孵育。孵育 24 小时后，每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT，再孵育 4 小时。随后，用 100 μL DMSO 溶解生成的染料，并在 570 nm 处测量吸光度。

补充信息

图 S1 四个基准数据集的药物-靶点二分网络（DT 网络）图：酶（红色）、离子通道（橙色）、G 蛋白偶联受体（蓝色）、核受体（黑色）。圆圈和

矩形分别对应药物节点和靶点节点。如果蛋白质是该药物的已知靶点，则在药物节点和靶点节点之间放置一条链接。药物节点的大小是该药物具有已知实验证据的靶点数量所占的比例。靶点节点的大小是该靶点具有已知实验证据的药物数量所占的比例。该图由 Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) 制备。

(TIF)

图 S2 通过 30 次 10 折交叉验证测试，使用三种不同方法预测给定靶点（蛋白质）的新获批药物时，精度（P）与预测药物长度（L）的关系，针对四个基准数据集：（a）酶类，（b）离子通道，（c）G 蛋白偶联受体（GPCRs），（d）核受体，（e）酶类数据的 P 与 L 的对数对数图。DBSI：基于药物的相似性推断（点划线曲线），TBSI：基于靶点的相似性推断（实线曲线），NBI：基于网络的推断（虚线曲线）。

(TIF)

图 S3 通过 30 次 10 折交叉验证测试，用三种不同方法预测给定靶点（蛋白质）的新获批药物的召回率（R）与预测药物长度（L）的关系，针对四个基准数据集：（a）酶类，（b）离子通道，（c）G 蛋白偶联受体，（d）核受体。DBSI：基于药物的相似性推断（点划线曲线），TBSI：基于靶点的相似性推断（实线曲线），NBI：基于网络的推断（虚线曲线）。

(TIF)

图 S4 通过 30 次 10 折交叉验证测试，基于网络的推断（NBI）方法在 DrugBank 数据集上的性能表现。（a）受试者工作特征（ROC）曲线，（b）预测药物长度（L）与精度（P）的关系，（c）预测药物长度（L）与召回率（R）的关系。已批准：DrugBank 中已批准的小分子药物数据集，全球：DrugBank 中已批准和实验研究的小分子药物数据集，FPR：假阳性率，TPR：真阳性率。

(TIF)

图 S5 为针对给定靶点预测新获批药物时，通过 10 折交叉验证测试 30 次模拟得到的召回率（预测列表长度 $L \sim 10$ ）的箱线图。图中用绿色虚线区分不同的数据集，并标注了三种不同的方法。DBSI：基于药物的相似性推断，TBSI：基于靶点的相似性推断，NBI：基于网络的推断，R：召回率。

(TIF)

图 S6 通过 30 次 10 折交叉验证测试，采用三种不同方法预测给定药物的新靶点的受试者工作特征（ROC）曲线，测试数据集为四个基准数据集：（a）酶类，（b）离子通道，（c）G 蛋白偶联受体（GPCRs），（d）核受体。DBSI：基于药物的相似性推断（点划线曲线），TBSI：基于靶点的相似性推断（实线曲线），NBI：基于网络的推断（虚线曲线）。

(TIF)

表 S1 本研究中所用所有已知药物-靶点相互作用（DTI）数据集的统计结果。

(PDF)

表 S2 三个模型在四个基准数据集上的受试者工作特征曲线下面积（AUC）性能表现

通过 30 次 10 折交叉验证测试, 对不同方法进行模拟。

(PDF)

表 S3 通过 30 次 10 折交叉验证测试的模拟, 使用 NBI 方法对所有数据集的有效推荐列表长度的召回率。

(PDF)

表 S4 9 种已获批药物对二肽基肽酶 - IV 的抑制活性。

(PDF)

表 S5 已获批的雌激素受体 α 激动剂和拮抗剂的活性。

(PDF)

参考文献

- Hopkins AL (2008) Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol* 4: 682–690.
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004) Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3: 353–359.
- Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL (2002) Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* 2: 507–528.
- Ashburn TT, Thor KB (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3: 673–683.
- Boguski MS, Mandl KD, Sukhatme VP (2009) Drug discovery. Repurposing with a difference. *Science* 324: 1394–1395.
- Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, et al. (2009) Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* 462: 175–181.
- Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, et al. (2007) Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol* 25: 197–206.
- Gonzalez-Diaz H, Prado-Prado F, Garcia-Mera X, Alonso N, Abejón P, et al. (2011) MIND-BEST: Web Server for Drugs and Target Discovery; Design, Synthesis, and Assay of MAO-B Inhibitors and Theoretical-Experimental Study of G3PDH Protein from *Trichomonas gallinae*. *J Proteome Res* 10: 1698–1718.
- Xie L, Evangelidis T, Bourne PE (2011) Drug discovery using chemical systems biology: weak inhibition of multiple kinases may contribute to the anti-cancer effect of nelfinavir. *PLoS Comput Biol* 7: e1002037.
- Li H, Gao Z, Kang L, Zhang H, Yang K, et al. (2006) TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. *Nucleic Acids Res* 34: W219–224.
- Yang L, Wang K, Chen J, Jegga AG, Luo H, et al. (2011) Exploring off-targets and off-systems for adverse drug reactions via chemical-protein interactome—clozapine-induced agranulocytosis as a case study. *PLoS Comput Biol* 7: e1002016.
- Yildirim MA, Goh KI, Cusick ME, Barabasi AL, Vidal M (2007) Drug-target network. *Nat Biotechnol* 25: 1119–1126.
- Campillos M, Kuhn M, Gavin AC, Jensen LJ, Bork P (2008) Drug target identification using side-effect similarity. *Science* 321: 263–266.
- Iorio F, Bosotti R, Scacheri E, Belcastro V, Mithbaokar P, et al. (2010) Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14621–14626.
- Dudley JT, Sirota M, Shenoy M, Pai RK, Roedder S, et al. (2011) Computational repositioning of the anticonvulsant topiramate for inflammatory bowel disease. *Sci Transl Med* 3: 96ra76.
- Sirota M, Dudley JT, Kim J, Chiang AP, Morgan AA, et al. (2011) Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data. *Sci Transl Med* 3: 96ra77.
- Yamanishi Y, Araki M, Gutteridge A, Honda W, Kanehisa M (2008) Prediction of drug-target interaction networks from the integration of chemical and genomic spaces. *Bioinformatics* 24: i232–240.
- Zhou T, Kucsik Z, Liu JG, Medo M, Wakeling JR, et al. (2010) Solving the apparent diversity-accuracy dilemma of recommender systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 4511–4515.
- Zhou T, Su RQ, Liu RR, Jiang LL, Wang BH, et al. (2009) Accurate and diverse recommendations via eliminating redundant correlations. *New J Phys* 11: 123008.
- Sarwar B, Karypis G, Konstan J, Riedl J (2001) Item-Based Collaborative Filtering Recommendation Algorithms. In: *Proceedings of the World Wide Web Conference*. pp 285–295.
- Herlocker JL, Konstan JA, Terveen K, Riedl JT (2004) Evaluating collaborative filtering recommender systems. *ACM T Inform Syst* 22: 5–53.
- Mestres J, Gregori-Puigjane E, Valverde S, Sole RV (2008) Data completeness—the Achilles heel of drug-target networks. *Nat Biotechnol* 26: 983–984.
- S6 已获批准的雌激素受体 β 激动剂和拮抗剂的活性。
(PDF)
- 表 S7 五种已获批药物的药物 - 基因 - 疾病关联的详细描述 (这些信息于 2011 年 5 月从 DrugBank 和在线孟德尔遗传病信息库 (OMIM) 疾病图谱中提取)。
(PDF)

作者贡献

实验的构思与设计: 程飞、周伟、唐勇。实验操作: 程飞、刘畅、江杰、卢伟、黄杰。数据分析: 程飞、刘畅、李伟、刘刚、唐勇。试剂/材料/分析工具的提供: 程飞、唐勇。论文撰写: 程飞、刘畅、唐勇。

45. Morales LB, Loo KK, Liu HB, Peterson C, Tiwari-Woodruff S, et al. (2006) Treatment with an estrogen receptor alpha ligand is neuroprotective in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 26: 6823–6833.
46. Muck AO, Seeger H, Wallwiener D (2004) Inhibitory effect of statins on the proliferation of human breast cancer cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42: 695–700.
47. Veeneman GH (2005) Non-steroidal subtype selective estrogens. *Curr Med Chem* 12: 1077–1136.
48. Shen J, Tan C, Zhang Y, Li X, Li W, et al. (2010) Discovery of potent ligands for estrogen receptor beta by structure-based virtual screening. *J Med Chem* 53: 5361–5365.
49. Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, et al. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* 34: D354–357.
50. Schomburg I, Chang A, Ebeling C, Gremse M, Heldt C, et al. (2004) BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res* 32: D431–433.
51. Gunther S, Kuhn M, Dunkel M, Campillos M, Senger C, et al. (2008) SuperTarget and Matador: resources for exploring drug-target relationships. *Nucleic Acids Res* 36: D919–922.
52. Hattori M, Okuno Y, Goto S, Kanehisa M (2003) Development of a chemical structure comparison method for integrated analysis of chemical and genomic information in the metabolic pathways. *J Am Chem Soc* 125: 11853–11865.
53. Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87–96.
54. Lin Z, Shen H, Huang J, Chen S, Chen L, et al. (2008) Butyl 4-(butyryloxy) benzoate functions as a new selective estrogen receptor beta agonist and induces GLUT4 expression in CHO-K1 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 150–156.