

博士学位论文

基因调控网络构建方法研究

Research of Gene Regulatory Networks

Reconstruction Methods

学科专业 计算机科学与技术

学科方向 计算机应用技术

作者姓名 陈向

指导教师 李敏 教授

中南大学

2020年12月

中图分类号 TP391
UDC 004.9

学校代码 10533
学术类别 学术学位

博士学位论文

基因调控网络构建方法研究 Research of Gene Regulatory Networks Reconstruction Methods

作者姓名: 陈向
学科专业: 计算机科学与技术
学科方向: 计算机应用技术
研究方向: 生物信息学
二级培养单位: 计算机学院
指导教师: 李敏教授

论文答辩日期_____ 答辩委员会主席_____

中南大学
2020年12月

学位论文原创性声明

本人郑重声明，所呈交的学位论文是本人在指导教师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了论文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中南大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我共同工作的同志对本研究所作的贡献均已在论文中作了明确的说明。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

作者签名：_____ 日期：____年__月__日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者和指导教师完全了解中南大学有关保留、使用学位论文的规定：即学校有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版；本人允许本学位论文被查阅和借阅；学校可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用复印、缩印或其它手段保存和汇编本学位论文。

保密论文待解密后适应本声明。

作者签名：_____

指导教师签名：_____

日期：____年__月__日

日期：____年__月__日

基因调控网络构建方法研究

摘要：基因调控网络 (GRNs) 是由基因组中基因之间相互作用所形成的网络。推断基因调控网络 (GRNs) 是系统生物学中的一个基础和核心的问题, 基因表达数据中的网络结构揭示了基因中复杂的调控关系, 有助于了解基因调控机制, 可以从基因功能的角度揭示生命过程, 了解生物网络系统所蕴涵的结构和功能信息, 在分子水平上理解肿瘤等复杂疾病发生的机理并指导肿瘤药物的筛选和研制。本文针对基因调控网络推断研究中精确度低, 网络稀疏等难点, 并且针对单细胞数据的特点, 从系统生物学的角度提出了有效的基因调控网络构建方法。本文完成的主要工作有:

(1) 提出了一种新的基于互信息的网络结构推断方法 Loc-PCA-CMI。首先识别局部重叠基因簇, 然后基于条件互信息 (PCA-CMI) 的路径一致性算法推断每个簇的局部网络结构, 最终通过聚合局部网络结构, 也就是基因之间的依赖性网络, 来构造最终的 GRN。Loc-PCA-CMI 降低了在网络结构推断中的冗余的依赖关系。我们在 DREAM3 敲除数据集上对 LOC-PCA-CMI 进行了评估, 将其性能与其它基于信息理论的网络结构推断方法, 包括 ARACNE、MRNET、PCA-CMI 和 PCA-PMI, 进行了比较。实验结果证明, Loc-PCA-CMI 在 DREAM3 数据集上特别是在基因数目为 50 和 100 的网络上表现优于其它四种基准方法。

(2) 提出了一种新的数据驱动的基因调控网络构建方法 D3GRN。在这个方法里, 将每个目标基因的调控关系转化为功能分解问题, 并利用揭示网络相互作用的算法 (ARNI) 解决各个子问题。为了弥补 ARNI 仅从单元级构建网络的局限性, 我们采用抽样 (bootstrapping) 和基于面积的评分方法来推断最终的网络。关于数据驱动的动态网络构建的研究为我们提供了解决回归问题的新视角。实验结果表明, 在 DREAM4 和 DREAM5 基准数据集上, D3GRN 在 AUPR 这个评价指标上与最先进的算法相比具有竞争力。

(3) 提出了一种新的心得基于单细胞 RNA-seq 数据的稀有细胞识别方法 DoRC。单细胞数据应用里一个具有挑战性的问题是如何从超大规模的 scRNA-seq 数据中识别稀有细胞及其类型。另外, 单细胞数据填充、聚类以及稀有细胞识别是单细胞数据上游分析的核心任务, 是构建与细胞类型相关的基因调控网络的必要步骤。现有的寻找稀有细胞的算法非常耗时或耗费内存。DoRC 产生的稀有度分数可以帮助

生物学家们着重于下游分析, 只对超大规模内的部分表达细胞 scRNA-seq 数据进行分析。为了在随后的下游分析的过程中区分细胞类型, 我们提出了新颖有效的细胞聚类方法 RafClust。我们使用 ~68k 人血细胞的单细胞表达谱还证明了 DoRC 在划分人类血液树突状细胞亚型方面的效果。DoRC 可以识别仿真数据集里面的稀有细胞, 并且对细胞类型特征也很敏感。

(4) 提出了一种新的基于单细胞 RNA-seq 数据的基因表达调控网络方法。识别细胞类型特征和细胞的基因表达活动程序(如生命周期过程、对环境因素的反应)对于理解细胞和组织的组成至关重要。虽然单细胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) 可以量化成个体细胞中的转录本, 每个细胞的表达谱可能是这两种类型的程序的混合物, 使它们难以分离。在这里, 我们提出了一个使用矩阵分解的算法 WSSMFA 来解决这个问题。通过在公开的大脑类器官 scRNA-Seq 数据集上的实验表明, 我们提出的 scGRNHunter 方法可以准确地推断出身份和活动性的子程序, 并在此基础上构建成基于细胞类别身份的基因调控网络和基于细胞活动的基因调控网络。

关键词: 基因调控网络; 单细胞数据; 互信息; 动态网络构建; 稀有细胞识别; 细胞异质性; 基因表达程序

分类号: TP391

Research of Gene Regulatory Networks Reconstruction

Methods

Abstract: LaTeX can be compiled into a pdf of uniform format using the set template. At present, most domestic publishers and universities still use word. Because of its powerful function and flexibility, when faced with fixed-form papers by novices, simple matters such as typesetting, numbering, and reference documents will bring many difficulties and troubles. For some problems that need to be modified throughout, to achieve the efficiency of LaTeX, it requires a high level of skill for word users.

In order to focus on the writing of papers, many international journals and universities support the writing and submission of LaTeX. Novices don't need to care about formatting issues. They only need to use a few symbolic labels step by step to get the documents that meet the requirements. And when you need to modify the entire format, you can directly recompile the template file by replacing or modifying the template file. This is incredible for the word novice to use the word.

The purpose of this project is to create a TeX template that meets the specifications of the graduate degree thesis (PhD) of Central South University, and to address the pain points of format adjustment during the dissertation writing.

Keywords: CSU; LaTeX; Template

Classification: TP391

目 录

1 绪论	1
1.1 研究背景与意义	1
1.2 国内外研究现状和发展动态	3
1.2.1 数据源	4
1.2.2 网络模型	5
1.2.3 网络建模算法	5
1.3 主要研究工作	12
1.4 论文组织结构	13
2 一种新的基于基因敲除表达数据的基因调控网络结构推断方法	15
2.1 介绍	15
2.2 方法	17
2.2.1 相关工作	17
2.2.2 Loc-PCA-CMI	17
2.3 数据集	19
2.4 结果和讨论	19
2.5 结论	22
3 一种新的数据驱动的基因调控网络构建方法	23
3.1 介绍	23
3.2 方法	25
3.2.1 问题定义	25
3.2.2 基于集成回归方法的网络推理	25
3.2.3 使用 D3GRN 进行 GRN 推断	26
3.2.4 基于 ARNI 的特征选择	27
3.2.5 抽样 (bootstrapping)	28
3.2.6 基于面积的评分	28
3.2.7 计算复杂度	29
3.3 实验结果	29
3.3.1 输入数据	29
3.3.2 效果评价指标	30
3.3.3 D3GRN 的实验结果	30
3.4 讨论和结论	32
4 一种新的单细胞稀有细胞及类型识别方法	34
4.1 介绍	34
4.2 数据集和方法	35
4.2.1 数据集描述	35
4.2.2 DoRC 方法	36
4.2.3 数据规范化和基因选择	36
4.2.4 使用孤立森林识别稀有细胞	36
4.2.5 使用 RafClust 确定细胞类型	38
4.2.6 差异基因分析	40
4.2.7 调整后的 Rand 指数和 F1 得分	40
4.3 实验结果	41
4.3.1 DoRC 概览	41
4.3.2 RafClust 提高了 scRNA-seq 数据的聚类效果	42
4.3.3 DoRC 揭示了树突状细胞之间的异质性	43
4.3.4 DoRC 能够识别人工伪造的稀有细胞	45

4.3.5 DoRC 对细胞类型敏感	48
4.3.6 DoRC 是可扩展和快速的	48
4.4 讨论和结论	50
4.5 可重复性	52
5 一种新的单细胞基因表达调控网络方法	53
5.1 介绍	53
5.2 方法	54
5.2.1 预处理	54
5.2.2 细胞抽样	55
5.2.3 加权半非负稀疏矩阵分解算法 WSSMFA	56
5.2.4 构建基因调控网络	57
5.3 实验数据	57
5.4 实验结果	58
5.4.1 模型选择	58
5.4.2 WSSMFA 揭示了 GEPs 的存在	58
5.4.3 身份调控网络与活动调控网络的构建	60
5.5 讨论	60
6 总结与展望	63
6.1 研究工作总结	63
6.2 研究展望	64
参考文献	67
攻读学位期间主要研究成果	87
致谢	88

1 結論

1.1 研究背景与意义

“人类基因组计划”的研究引发后基因组时代的到来,标志着生命科学开始进入系统生物学时代,人们开始研究各种组学在 DNA、mRNA、蛋白质和各种代谢产物水平上研究各种分子的生物功能。系统生物学首先通过生物学技术对系统进行干涉,并利用物理、化学实验方法测量得到实验数据,然后将这些数据用计算机存储起来,最后运用数学、物理方法结合计算机技术对这些数据进行统计、分析,利用数学理论建立生物系统模型。所以系统生物学研究的方法和手段,决定了系统生物学是一个物理、化学、数学、信息学、计算机科学和分子生物学等多学科交叉学科,需要各种学科的密切配合 [1]。

在系统生物学上,基础和核心问题是理解和认识能够代表基因发育和调控过程因果关系的基因调控网络 (GRNs, Gene Regulatory Networks)。基因调控网络描述的是细胞或组织内复杂的生命过程中的功能通路,比如新陈代谢、基因调控、运输机制或者信号传导。从宏观看,基因调控网络是由细胞中参与基因调控作用的 DNA、RNA、蛋白质 (protein) 以及代谢中间物所形成的相互作用的网络 [2]。从微观看,一个基因的转录由细胞的生化状态所决定,在一个基因的转录过程中,一组转录因子作用于该基因的启动子区域,控制该基因转录,而这些转录因子本身又是其它基因的产物。当一个基因通过转录、翻译形成能基因产物后,它将改变细胞的生化状态,从而直接或间接地影响其它基因的表达或者自身的表达。多个基因的表达不断变化,使得细胞的生化状态不断地变化,构成复杂的基因调控网络。

问题建模上,基因调控网络可以用来描述分子实体之间的相互依赖关系,可以用图结构中的有向无环图 (DAG,directed acyclic graph) 来表示,如图 1-1所示。节点表示基因、蛋白质、代谢物质或者 RNA,边代表的是分子实体间的关系,如蛋白质-DNA、蛋白质-蛋白质的相互作用关系或者其它关系,如图 1-2所示。

微阵列芯片 (microarray) 技术和单细胞 RNA 测序 (scRNA-seq) 技术的发展产生的大量基因表达数据,这些基因表达数据不仅可用于分析基因表达的时空规律,研究基因的功能,而且还可用于基因之间的相互制约关系,研究基因调控网络模型,为理解生物潜在的调控机制带来了机遇。另外,转录组学、蛋白质组学、相互作用组学、代谢组学等高通量的实验室技术可以为模型提供更多的先验信息,有助于构建更加复杂、更准确地反映生命现象的基因调控动态网络。

基因调控网络的构建,立足于阐明基因表达调控的作用关系,有利于从网络的角度去了解复杂而精密的生物网络系统所蕴涵的结构和功能信息,彻底了解网络的生物学意义,节省大量的实验费用与资源,也可以利用模拟结果有效地指导进一

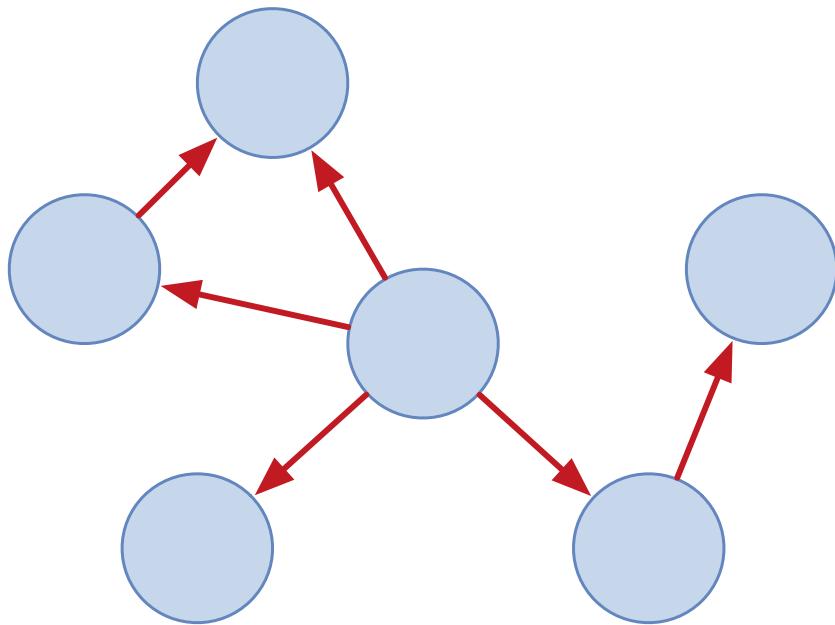


图 1-1 GRNs 拓扑结构示例图, 其中节点代表生物化合物, 节点边代表它们之间的关系。

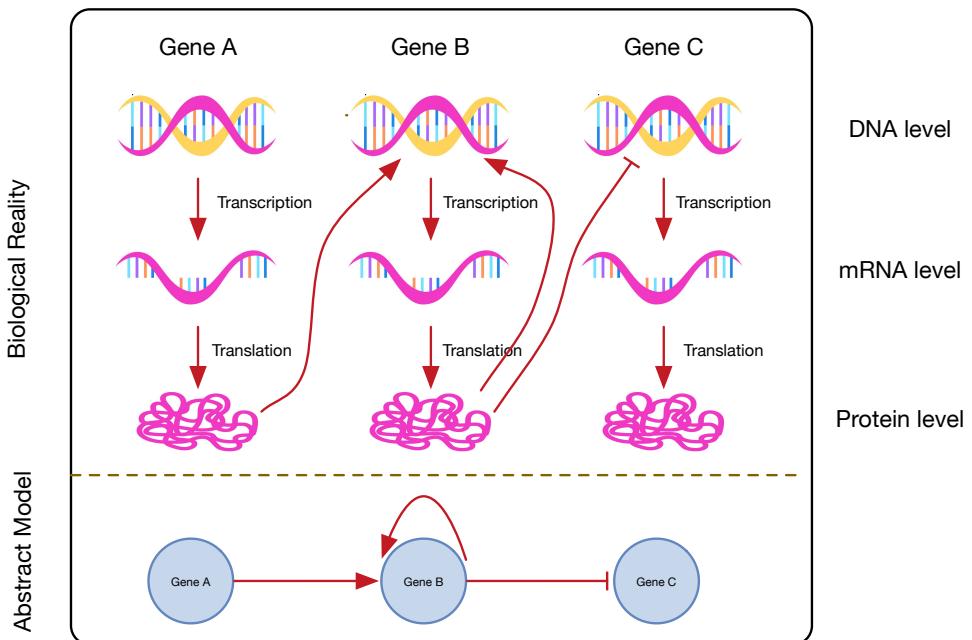


图 1-2 GRNs 构建的主要目标是为实际生物过程生成抽象模型。这些模型试图表示生物过程分子实体之间复杂的相互作用, 比如基因激活、抑制或反馈环路。

步的生物实验, 更好地了解生物系统的功能, 尤其是在肿瘤等复杂疾病研究中, 例如癌症细胞的分化、扩散和增生等 [3]。通过基因调控网络建模, 分析细胞代谢通路, 在分子水平上理解癌症发生的机理, 揭示癌症的内部机制, 将进一步增强对癌症的整体认识, 发现诊断、控制和治疗癌症的方法 [4-5]。此外, 基因调控网络建模还有助于肿瘤药物的筛选和研制, 能为攻克癌症等复杂疾病做出贡献。

总之, 基因调控网络建模是一门理论研究与实践应用相结合的学科, 它不仅有

重要的学术意义,还有很高的商业价值,以及广阔的发展前景。随着后基因组时代的到来,基因调控网络不仅可以为生物信息学提供大量的研究线索,也可为特定生物问题提供强有力的理论依据,还可在疾病诊断、药物筛选等领域发挥更加广泛的作用 [4]。

1.2 国内外研究现状和发展动态

基因调控网络建模是一种依靠数据挖掘进行的逆向工程研究,即根据基因表达数据推理基因调控网络中的各类拓扑结构。它首先通过生物实验获取高通量生物数据,然后根据生物网络的先验知识,针对特定生物问题建立数学模型,并设计合理的算法构建基因调控网络,最后通过生物学实验验证逐步逼近和发现真实的基因调控网络 [6]。从计算角度讲,基因调控网络推断依赖于已知的知识数据库发现(KDD, Knowledge Database Discovery)工作流程。KDD 从输入数据预处理到模型的验证,通过数据库搜索比较之前的实验数据结果来完成的,如图 1-3 所示。

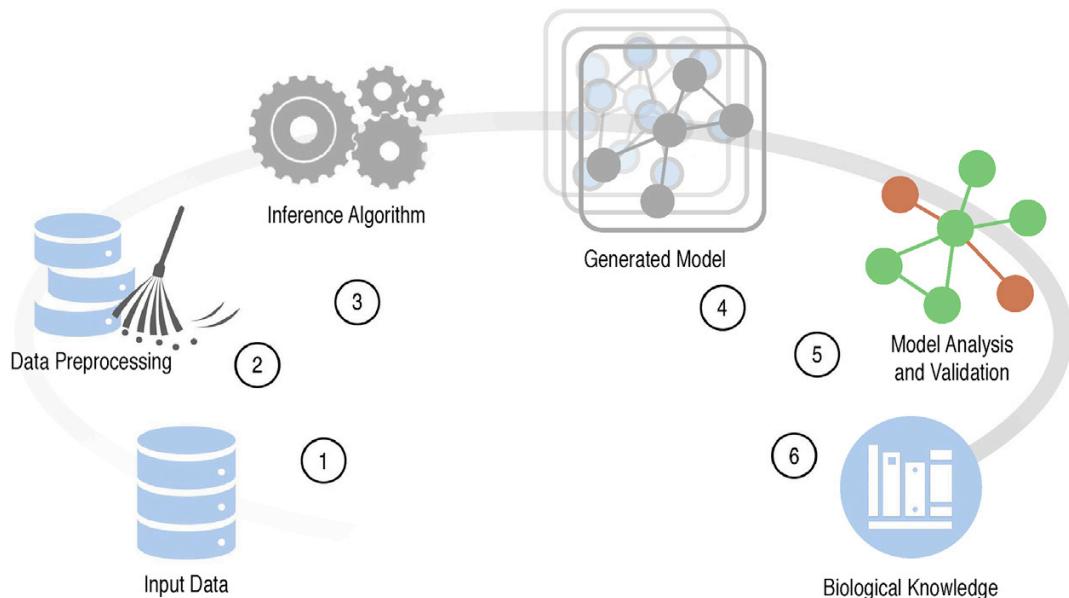


图 1-3 基于 KDD 工作流程的 GRN 重建步骤。①输入数据。②数据预处理。③网络推断算法。④生成模型。⑤模型分析和校验。⑥生物知识。

当前的基因调控网络建模牵涉到三方面的研究问题 [7]:

1. 建立什么样的模型;
2. 如何设计与实现网络建模算法;
3. 如何评价和甚至是应用构建的网络。

下面将从前两个方面讨论基因调控网络建模的相关研究现状,同时由于大多数方法是跟数据特性密切相关因此我们也需要介绍下数据源及其特征。

1.2.1 数据源

高通量技术提供了巨大的数据, 诸如下一代测序技术 (NGS, Next Generation Sequencing) [8], 在过去十几年中产生了显著质量、稳健性和低噪声的DNA和RNA样本数据。测序已经成为一种标准方法, 被认为是研究生命体的基石 [9]。测序产生的基因表达数据使生物学家能够大规模观察基因的表达水平, 对推断基因调控网络起到了至关重要的作用。基因表达数据来源包括DNA微阵列, RNA-seq [10] 和 SAGE (基因表达系列分析) [11]。用于基因调控网络构建的基因表达数据按照类型可以划分为时间序列数据 (time series data) 和扰动实验数据 (perturbation experiments data) 两种。时间序列表达数据使生物学家能够调查生物网络中的时间模式; 扰动表达数据提供了关于基因间调控方向的信息。扰动实验分为两类: 基因操作 (即基因缺失, 过度表达, 温度敏感或动力学突变) [12] 或外部处理 (即环境胁迫) [13]。在基因调控网络构建中我们将主要使用DNA微阵列数据 (microarray data) 和单细胞RNA-seq数据 (scRNA-seq), 同时也会结合其它比如PPI数据, TF结合位点数据等作为先验知识。

(1) DNA微阵列测序数据

生物微阵列又被广泛地称为生物芯片, 是上个世纪90年代以来最为重要的基因测序技术之一, 其技术的关键点是将巨大的DNA分析缩小到芯片上, 在利用光电技术对信号进行探测, 最后通过计算机加以分析。借助基因芯片技术研究者可以测定基因在某一器官不同条件下不同发展阶段和不同组织中的转录水平, 从而建立基因表达谱以描绘基因组中的基因表达水平。各种微阵列技术中, 用的最多的是基因微阵列芯片。DNA微阵列测序数据最为常见, 使用微阵列测序数据进行基因调控网络构建也历史悠久源远流长。

(2) 单细胞RNA-seq数据

单细胞RNA-seq技术在2009年首先由Tang等[14]提出, 但是在2014年以后由于新的协议和相对低廉的测序成本使得它在产业界和学术界都颇受欢迎, 风靡至今。单细胞RNA-seq技术与DNA微阵列测序技术最为显著的不同是, 后者测量的基因表达值是多个细胞基因表达值的平均值, 而前者测量的是单个细胞中的基因表达值。单细胞RNA-seq测序技术也给数据处理带来诸多挑战, 比如大量的细胞异质性[15], 高度稀疏性导致的表达为零(dropout)[16], 细胞与细胞之间的测序深度变化, 细胞周期相关的批量效应(batch effects)[17]。在数据预处理阶段, 需要实现的目标不同和数据产生的场景, 对基因的dropout值进行过滤或者填充(dropout imputation), 或者需要对数据进行批量校正(batch effects correction), 以提高后续下游分析的稳定性。单细胞RNA-seq技术可以用来研究在转录组细胞特异性的变化中重要和新的生物学问题, 如鉴定细胞类型, 研究基因表达的随机性, 细胞发育轨迹推断, 与细胞类型或者周期相关的基因调控网络的推断。相比于

批量测序数据而言,大多数情况下单细胞 RNA-seq 数据的计算分析需要开发新的方法。

1.2.2 网络模型

寻找一个合适的网络模型是构建网络的首要问题。在基因调控网络的研究中,为刻画和反映复杂生物网络的动态或静态行为,数学模型提供了一个强有力的工具。不同的数学模型对基因调控网络进行了不同的表达和抽象,然而针对复杂的基因调控网络,为对其进行全面描述,需要借助多个层次多种类型的模型来反映基因调控网络的不同特性。

从时空特性上区分,基因调控网络模型可分为:静态模型与动态模型,例如,动态贝叶斯网是动态模型;从建模所用的数据区分,模型可分为:离散模型与连续模型,时序模型与非时序模型,例如对时序 (time-course) 数据可采用微分方程模型建模;从图论角度区分,分为有向图模型和无向图模型;从网络拓扑特性的角度出发,可构造出复杂网络和差异网络的模型。

模型改进和模型组合是当前网络模型的主要研究方向。模型改进是针对现有的模型引入新的法则来构造新的模型,而模型组合则是结合几个不同类型的模型取长补短达到性能最优。

1.2.3 网络建模算法

基因调控网络的各类模型都在不同层次、不同程度上对真实的调控网络进行了抽象,下面针对关联网络、布尔网络、微分方程、贝叶斯网络、动态贝叶斯网络、回归方法的主要思想、优缺点以及研究进展做简要介绍。

(1) 布尔网络

布尔网络与微分方程相比则更为抽象,它对基因的状态做了进一步的简化,用布尔函数代替了微分和导数来描述基因间的相互作用关系。其中,基因的状态定量为两种不同的状态(“开”和“关”)。状态“开”表示一个基因转录表达,状态“关”则代表一个基因未转录。如果布尔网络模型进一步推广,其可转变为时序布尔网络模型 TBN (temporal Boolean networks),这有利于处理多于一个单位时间跨度的基因间的依赖性。

基于布尔网络模型的主要工作包括: Kauffman [18] 提出布尔网络的分析框架; Akusu 等 [19] 证明了布尔网络推理所需要的最少样本数量; Liang 等 [20] 开发了 REVEAL 算法。Shmulevich 等 [21] 将马尔可夫链 (Markov Chains) 和布尔网络结合起来,引进了概率布尔网络模型 PBN (probabilistic boolean networks),比标准布尔网络模型有了更多的优越性。在单细胞 RNA-seq 测序数据上,Chen 等 [22] 开发了 SingleCellNet,采用遗传算法从预期的轨迹通过细胞状态构造概率布尔模型,

他们采用的布尔规则直接来源于文献。Moignard 等 [23] 提出了 SCNS 算法, 通过状态转换图分析轨迹来推断一个异步布尔模型。连接状态转换图在这个算法中起着至关重要的作用, 但是它很难从单细胞表达数据中获取。

布尔网络建模时, 把基因的表达水平离散化成单一的表达和不表达两个数值, 而在现实的生物系统中, 基因的表达过程是连续的, 对基因数据进行离散化时不可避免的会丢失很多重要的表达信息; 网络中一个节点更新, 会使得所有节点同步更新, 而在实际的基因表达过程中, 更新是异步进行的。

(2) 微分方程模型

微分方程模型是一种连续的确定模型, 具有强大灵活的优点, 通过抽象基因间的时序调控变化, 相比布尔网络来讲, 适合描述更加精细的调控关系, 可以较好地建模基因表达数据。另外, 通过加入新的变量, 微分方程模型可以进一步描述环境变化对于基因表达水平的影响。微分方程的缺点则是难以适应中大型网络的构建, 中大型网络结构估计的精度较低, 样本数量要求严格, 缺乏抗噪声能力、计算量较大, 捕捉基因表达数据中包含的随机信息欠佳。

若采用变量 e_i 表示第 i 个基因在 t 时刻的表达水平, 则 n 个基因之间的调控关系可以用微分方程描述如下:

$$\frac{d_{e_i}}{dt} = f_i(e), 1 \leq i \leq n \quad (1-1)$$

式中 $\frac{d_{e_i}}{dt}$ 代表基因调控网络建模中, 第 i 个基因在 t 时刻表达水平的变化率, 向量 $e = [e_1, e_2, \dots, e_n]^T$ 则描述基因表达水平。式中 $f_i(e)$ 的表现形式表明了基因之间的调控机制和作用方式, 也就是调控网络的结构。调控函数 $f_i(e)$ 最简单的形式是线性函数, 可以表示为:

$$\frac{d_{e_i}}{dt} = \sum_j w_{ij} e_j + b_i, 1 \leq i \leq n \quad (1-2)$$

调控网络系统中各个基因之间的调控关系可采用参数 w_{ij} 表示, 激活、抑制和无调控关系分别对其取值为正、负或为零, b_i 表示基因的基础活性。基因之间复杂的非线性作用关系可利用非线性的调控函数 $f_i(e)$ 进行刻画和说明。比如 Sigmoid 函数 (S 型函数), 来引入必要的非线性, 具体表达形式为:

$$\frac{d_{e_i}}{dt} = AS(\sum_j w_{ij} e_j + b_i) - D_i e_i, 1 \leq i \leq n \quad (1-3)$$

Chen [24] 最早使用微分方程系统作为基因表达调控网络模型, 微分方程其主要的优点在于强大灵活, 有利于描述基因网络中的复杂关系, 能够很好的表现出基因之间的连续动态关系。而其缺点在于生物学实验过程中蛋白质的含量比较难以获得, 另外也忽略了其他调控物的影响, 不能处理实验数据噪音问题。

在单细胞测序数据集上,为了从时间序列数据构建网络,SCODE [25] 和 SCOU [26] 分别引入 ODEs 和 SDEs 来计算基因之间的相关性。SCODE 将基因之间的相关性表示为控制基因表达水平随时间的分化的变量。通过将某一基因在某一时间点的基因表达水平建模为对其他基因表达水平的线性依赖关系, SCODE 使用线性回归来估计相关矩阵。SCOU 则将各基因表达水平随时间的分化建模为一个连续的随机扩散过程, 即 Ornstein-Uhlenbeck (OU) 过程。在该模型中, 某一基因在某一时间点的表达量可以通过当前 OU 过程的正态分布来估计。利用计算出的所有细胞的 z 值得到基因之间的相关性。

(3) 贝叶斯网络

贝叶斯网络 (Bayesian Networks, BNs) 是一种重要的概率模型, 由条件概率分布和网络结构两部分组成。自从 Friedman 等 [27] 将贝叶斯网络应用到基因调控网络的重构中后, 贝叶斯网络在生物学上的应用越来越广泛, 成为现今构建细胞调控网络最有效的方法之一。在贝叶斯网络模型中变量之间的结构用有向无环图 (directed acyclic graph,DAG) 来表示, 变量之间的关系使用联合概率分布来描述。相对于布尔网络的粗放定性, 微分方程的精细定量, 贝叶斯网络模型可看作这两者的折衷。

Cooper 等提出的 K2 算法 [28] 是一个基于搜索评分的经典算法, 该算法为评价模型与数据的符合程度, 首先在给定先验信息和节点顺序的情况下, 通过后验概率作为评分标准并利用贪婪搜索方法找出最佳网络结构。Imoto 等 [29] 用非参数回归模型来解决离散化造成的阀值选取与信息丢失问题, Imoto 等采用这一模型能获得基因之间的线性与非线性结构特征。Jansen 等 [30] 为利用贝叶斯网模型构建调控网络, 分析和计算各类基因表达数据以及蛋白质相互作用数据, 并通过生物实验验证了模型的预测结果。2004 年 Friedman 等 [31] 为构建静态基因调控网络, 首次基于微阵列数据将贝叶斯网络模型用来预测基因调控关系。Hartemink 等 [32] 采用 BDe 评分测度作为学习的目标函数, 通过对基因表达数据进行离散化及模拟退火算法来构建基因调控网络。Werhli 和 Husmeier [33] 将基因表达数据与来自多种数据源的先验生物学知识结合起来使用贝叶斯网络模型利用马尔科夫链蒙特卡洛 (MCMC) 抽样方案来抽样来自后验分布的超参数, 这种与多数据源的结合降低了基因调控网络参数学习的误差率, 提高基因调控网络重建的准确性。Yavari 等人 [34] 根据基因本体将基因进行聚类, 并使用贝叶斯网络推断共聚簇基因之间的相互作用。这种方法可以解决由于基因数目增加而导致的结构数量指数增加的问题。此外, 他们还提出了一种在推理过程中使用共聚基因之间的互相关性的新方法。共聚簇基因之间的互相关性为贝叶斯网络提供了时间延迟信息。由此模型产生的精度和灵敏度均有提高, 而且结果表明这种模型适合对大规模基因进行建模。杨等人 [35] 建议使用稀疏图搜索 (SGS) 算法减少贝叶斯

网络的计算时间。SGS 算法利用迭代统计独立性测试和搜索技术来寻找最佳的网络结构。最佳的基因调控网络是使用搜索-打分和基于约束两种方法混合产生的。基于搜索和打分是使用优化技术在所有候选网络上搜索最佳网络结构并打分用来评估网络质。基于约束的方法通过应用条件独立性检测来取代传统的统计或信息论度量来检测边的存在。结果表明,他们提出的方法提高了准确性和计算效率。Tan 和 Mohamad [36] 使用贝叶斯网络结合爬山法和 Efron 的 bootstrap 抽样方法来构建基因调控网络。他们首先使用最小局部平方 (LLS) 插值算法来处理微阵列数据集中存在的缺失值,然后采用贝叶斯网络建立网络模型并采用爬山算法进行学习,bootstrap 抽样方法被用来抽取高置信度的边集合。他们的基因调控网络构建方法获得了较高的真阳性率,并且揭示了基因之间更新的关系。Young 等 [37] 提出一种基于贝叶斯网络的 ScanBMA 算法,该方法采取数据变换和新的策略在模型空间搜索时高效快速,可应用于大规模的基因调控网络推断。

贝叶斯网络模型的优点是灵活性好,具有从数据中推导模型的能力,能够自然地融入先验知识并能用专家知识和数据挖掘来改进模型的性能;可以通过借助问题领域自身结构特征和变量间直接影响的局部性,同时使用条件独立的数学概念,将聚合概率分布的计算问题,分解为若干局部条件概率分布的计算问题;模型结构和参数具有明确的含义可解释性好,具有良好的学习能力;能很好地处理隐变量和数据缺失问题。研究发现与关联网络相比,贝叶斯网络在识别准确度上常有更优异的表现,尤其是在网络规模较小时。其不足之处是:许多贝叶斯网和动态贝叶斯网常采用离散模型,对基因表达数据离散化导致损失了部分信息,同时也降低了网络建模的准确度;没有时序的概念,特别是对于存在伪时序的单细胞数据集而言,不能明显地表现基因调控网络的动力学特征。

(4) 动态贝叶斯网络

动态贝叶斯网络 (Dynamic Bayesian Network,DBN) 模型是在静态 BN 网络模型中引入时间因素而形成的动态网络 [38-39]。DBN 可以很好的表示随机系统的动态特性,也使用图模型的方式来表示模型中随机变量之间的概率依赖关系 [40]。DBN 更好地刻画了基因调控网络的动态特性,善于处理非线性关系和由随机现象引起的不确定性,能够描述基因之间的负反馈调控过程,相比于静态贝叶斯网它能够克服其有向无环的缺点,具有很好的概率推理能力和知识表达能力,使得模型的预测精度进一步提高。

Friedman 和 Murphy 等 [31] 考虑到了基因调控存在一定的时延性,从理论的角度分析了 DBN 从时序基因表达数据构建基因调控网络的问题,提出用动态贝叶斯网络模型分析时序基因表达数据。Smith 等 [41] 用动态贝叶斯网络模型来分析微阵列数据,结合了基因调控的负反馈与时延因素,因此需要采用网络中不同节点来表示同一基因不同时间点的表达向量。Wu 和 Liu 等 [42] 改进了动态贝叶斯网

络建模方法, 使用了 MCMC 和带重启的贪心爬山算法两种不同的模型搜索方法。两种方法在时间效率上不相上下, 与带重启的贪心爬山算法相比 MCMC 具有更高的预测精度。Song [43] 结合微阵列数据与基因关系的先验知识在 DBN 上提出新的数据整合模型, 利用并行算法, 构建基因调控网络。Kim 等 [44] 也在这方面做了大量的工作, 并结合线性或非线性模型以及相应的生物学知识对动态贝叶斯网络进行了改进。Norbert [45] 为从基因扰动型实验数据中学习动态贝叶斯网络, 利用 Husmeier [46] 提出的离散化方法来对基因表达数据进行预处理, 并使用 BDe 测度来进行评分搜索, 最终构建动态贝叶斯网络, 这种搜索方法实现了减少学习时间, 降低计算的时间复杂度的目的 [3]。Grzegorczyk 和 Husmeier [39] 通过将多变点过程与可逆跳跃马尔可夫链蒙特卡罗方法 (RJMCMC) 结合, 改进了基于动态贝叶斯网络推断的方法。他们通过引入动态编程方案来优化 RJMCMC 上的收敛性, 该方法从正确的条件分布对变化点进行采样。此外, 引入了贝叶斯聚类的新方法以促进节点之间的信息共享, 使得模型复杂度能够自动调整。Chai 等 [47] 提出了缺失值插补的动态贝叶斯网络模型, 利用缺失值插补来提高基因调控网络推断中的计算效率, 同时通过限制潜在调控因子的表达变化来缩短计算时间。Vinh 等 [48] 将动态贝叶斯网络方法与基于时间序列表达数据的基因调控网络构建的全局最优化相结合, 他们在全局优化框架上使用互信息测试来学习高阶带延时的基因相互作用。他们的方法能够改善动态贝叶斯网络只适合于小规模网络的缺陷, 同时能够避免动态贝叶斯网络结构学习容易陷入局部最优的状况。

(5) 关联网络

关联网络 (relevance network) 主要借助基因表达数据间相关性的计算来构建模型。相关性分析是构建基因调控网络最常见的方法之一。计算基因间的相关性常通过互信息、皮尔逊相关系数等测度来进行。主要思路是: 对于预先设定的阈值, 若基因间相关性不在阈值范围内, 则在网络中基因间有边相连。若两基因间具有相同或相近的调控机制, 则两个基因相关性较高, 尤其是, 对于同一转录因子的靶基因或同一条生物通路上的基因, 它们的相似度或相关性较高。

皮尔逊相关系数 (PCC) 是一种线性相关系数, 它反映了两个变量间的线性相关程度。设 X, Y 为随机变量, $pcc(X, Y)$ 定义如下:

$$pcc(X, Y) = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x}_i)(y_i - \bar{y}_i)}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x}_i)^2} \sqrt{\sum_i (y_i - \bar{y}_i)^2}} \quad (1-4)$$

其中, \bar{x}_i, \bar{y}_i 分别是 X, Y 的均值。 $pcc(X, Y)$ 的取值在 -1 到 1 之间。当 $pcc(X, Y)$ 为 -1 或者 1 时, 表示两个变量完全相关; 当 $pcc(X, Y)$ 为 0 时, 表示两个变量完全无关。

PCC 被广泛用于评估变量之间的线性关系 [49], 但在不借助其他信息的情况下无法区分直接关系和间接关系, 而偏相关分析法 (PC) [50] 通过考虑附加信息条件来有效区分直接和间接关系。另外, Barabási 等 [51] 提出了一个基于动态关联性的方法, 该方法通过消除网络中的间接影响进行直接关联性和间接关联性区分; Feizi 等 [52] 提出了利用网络卷积去除所有关联之间的综合效应区分直接和间接关联性。这两种方法 [51-52] 只能测量线性直接关联性, 但无法测量非线性关联性, 而非线性关联性在许多非线性系统比如生物系统中发挥着重要的作用。基于 PCC 和 PC, 距离相关性 [53-54] 和部分距离相关性 (Pdcor) [55] 被提出用于度量随机向量间的相关性, 这些统计量对于依赖偏离很敏感。Pdcor 的评估存在假阳性, 即当向量 X 非条件独立时, $\text{Pdcor}(X;Y|Z)$ 也有可能为零 [55]。

互信息 (Mutual Information) 常用来刻画和描述两个系统间的统计相关性, 或通过熵来反映一个系统中蕴含的另一个系统信息量的大小, 设 $P(x)$ 是 $X = x$ 的概率, 则随机变量 X 的熵定义为 [56]:

$$H(X) = - \sum_x P(x) \log_2 P(x) \quad (1-5)$$

设 $P(x, y)$ 是 $X = x, Y = y$ 时的联合概率, 则 X, Y 的联合熵定义为:

$$H(X, Y) = - \sum_x \sum_y P(x, y) \log_2 P(x, y) \quad (1-6)$$

随机变量 X 和 Y 的互信息为:

$$MI(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y) = \sum_{i,j} P(x_i, y_i) \log \frac{p(x_i, y_i)}{p(x_i)p(y_i)} \quad (1-7)$$

需要注意的是在基因调控网络推断中由于基因表达数据是连续的, 而互信息在计算时需要离散化, 一般使用 B-样条平滑和离散化方法来进行计算 [57]。由于互信息能够捕获有效捕获变量间的非线性相关性, 因此在复杂的基因调控网络相互作用推断中其应用十分广泛 [58-59]。

Butte 等 [60] 首先利用互信息计算所有基因对之间的相关性, 然后设置互信息阈值。为构建关联基因调控网络, 通常定义高于阈值的基因对之间存在关联并使用边连接起来构成网络。Margolin 等 [61] 提出的 ARCANE 采用 Data Processing Inequality (DPI) 来过滤间接作用边。Faith 等 [62] 提出的 CLR 方法使用互信息的经验分布来过滤间接作用边。Meyer 等 [63] 提出的 MRNET 方法使用最小化冗余特征选择算法 [64], 在计算后的互信息网络上对每一个目标基因选择一个同目标基因关联最强但与已经候选的基因集合冗余性最低的基因, 这个过程不断进行迭代。Altay 等 [65] 提出的 C3NET 和其扩展算法 BC3NET [66] 结合一个最大化的步骤来估计互信息从而使预测更准确。

MI 被广泛用于评估变量之间的非线性相关性, 该方法基于统计独立性在只有联合概率信息时无法计算直接关联性或依赖性, 并且和 PCC 一样有假阳性 [67-68]。类似于 PC 和 PCC, Zhao 等提出了条件互信息 (Conditional Mutual Information,CMI) [59] 和部分互信息 (Part Mutual Information,PMI) [69], 这两个测度在互信息上引入了条件计算的机制减少了假阳性边, 能有效检测变量之间非线性的间接或直接的相互作用。他们将这两个参数与基于贪心策略的路径一致性算法 (Path Consistency Algorithm, PCA) 结合起来先后提出了 PCA-CMI[59] 和 PCA-PMI[69]。

在单细胞测序数据集上, Yu 等提出了 NLNET 方法 [70], 两个基因之间的相关性被定义为基于条件有序列表 (Conditional ordered list,DCOL) 的距离, 其中基因 G1 到基因 G2 的距离取决于通过 G1 中所有样本的表达顺序。NLNET 使用的这种距离度量并没有考虑到真实生物网络中的一个基因可能与多个基因相互作用的事实。Thalia 等 [71] 提出了高效的 PIDC 算法, 利用偏信息分解 (partial information decomposition,PID) 测度来衡量基因之间的关系。Guo 等 [72] 提出了 SINCERA 方法, 该方法利用低阶偏相关性 (low-order partial correlation), 可以在测量中涉及两个以上的基因, 是一种更符合实际的方式来呈现复杂网络的相互作用。在 SINCERA 方法中, 给定第三个基因 G3, 基因 G1 和基因 G2 之间的相关性是 G1 与 G3 的线性回归所产生的残差与 G2 与 G3 的线性回归所产生的残差之间的相关性。SINCERA 使用最小平方估计来计算目标基因和条件基因的回归系数, 假设基因之间存在线性依赖关系。

可以看出, 虽然关联网络建模操作简单易行, 但不管是基于 PCC、MI 还是 PID 等构建的网络极其容易引进假阳性边。虽然各种方法都站在不同的角度来尽量减少假阳性边来提高网络构建的准确性。但是随着网络规模的扩大这种状况还是在不断恶化, 网络构建的准确性急剧下降。

(6) 回归方法

近年来由于 DREAM 系列竞赛的推动, 利用机器学习回归模型进行基因调控网络的构建方法大量涌现。这类方法本质上可以看作是关联网络模型的延伸, 与关联网络只关注量化相互作用不同的是回归方法能够推断出基因之间的相互作用方向。回归模型将基因调控建模转化为机器学习特征选择的问题, 即是将靶标基因的表达看作是调控基因表达之间的相互线性作用或者非线性作用的结果, 采用 bagging 或者 boosting 的做法, 推断出最终的基因调控网络。它们应用在基因调控网络构建上优点是计算效率高, 网络构建准确率高, 缺点是一些非线性的模型可解释性较低参数意义不明确, 缺少对生物结构的支持。回归模型成功应用于基因调控网络构建中的典型算法包括基于随机森林的 GENIE3 [73], 基于 Lasso 回归的 TIGRESS [74]。在处理时间序列数据上有 GENIE3 的扩展方法 GENIE3-lag [75], 与扩散模型相结合利用随机森林来学习隐含参数的 Jump3 [76]。

在单细胞 RNA-seq 测序数据集上, SCENIC [77] 融合了 GENIE3, RcisTarget 和 AU-Cell 三个算法来在单细胞测序数据上实现了基因调控网络的构建和基因的聚类。单细胞 RNA-seq 也能产生基于时间序列的 RNA-seq 数据。与传统的时间序列数据相比, 基于单细胞的时序数据在单个时间片上将产生更多的样本, 但是这样测序代价会十分高昂。因此也有很多方法利用原始数据推断出伪时序 (pseudo-time ordering) 后再利用回归方法构建基因调控网络。LEAP [78] 简单地使用皮尔逊相关性来计算每个时间窗口的基因之间的相关性。然后, 它通过收集所有时间窗口内所有基因对的最大相关性来合并所有相关矩阵。SINCERITIES [79] 利用基因在不同时间片上的表达分布之间的距离来构建基因的表达矢量, 然后使用格兰杰因果关系 (Granger causality) 的思想结合线性回归模型来推断基因调控网络。SINCERITIES 并没有直接来计算在每个时间窗口中的基因间的相关性。SCIMITAR [80] 使用连续的多变量高斯混合模型对数据进行建模, 然后使用期望值最大化 (EM) 算法估计参数。EM 算法估计了每个分布的参数, 以及一个细胞属于每个分布的可能性。SCIMITAR 从混合模型的协方差矩阵中计算出每个伪时间的相关矩阵。然后, 该方法通过计算协方差矩阵之间的距离来计算相似度矩阵。然后使用相似度矩阵的频谱聚类来确定整个时间轨迹的发展阶段。对于每个发展阶段, 该方法通过对该阶段的相关矩阵进行平均, 输出共识网络。SINGE [81] 使用回归模型来确定一个时间窗口内两个基因之间的相关性。对于每个目标基因, 该方法利用基于核函数的格兰杰因果关系 (Granger causality) 回归来计算该基因与所有其它基因的相关性 (即边或连接)。聚合时该方法采用 Borda 计数聚合法 [82], 该方法偏重于多次格兰杰检验一致性排名靠前的连接, 对两个基因之间的连接进行随时间的排序。上述四种方法中, SCIMITAR 自身能直接从输入的数据中推断出细胞的伪时序, 而 LEAP、SINCERITIES 和 SINGE 都依赖用户在输入时候提供细胞的时间排序。

1.3 主要研究工作

本课题的主要研究内容是基因调控网络构建的研究。从系统生物学的角度出发, 通过计算方法研究基于 DNA 微阵列数据以及单细胞 RNA-seq 测序数据上的基因调控网络的构建、评估及其在复杂细胞类型分析等生物问题中的应用。本项目以复杂网络理论、信息论和机器学习方法为基础, 以数据的结构特性为研究对象, 提出合适的网络推断模型, 提出基于不同表达数据的基因调控网络构建方法, 并同已有的方法进行对比评估。

(1) 基于互信息网络推断算法研究

通过对基于信息理论互信息的网络推断算法进行研究后发现, 由于原始数据中存在的外部噪声、网络结构中的拓扑稀疏性和非线性基因之间的依赖等因素,

现如今基于此的这些方法在网络推断中会引入冗余的依赖关系。特别是随着网络规模的增加,这些方法的表现大幅降低。我们提出了一种新的网络结构推断方法 Loc-PCA-CMI:首先识别局部重叠基因簇,然后基于条件互信息(PCA-CMI)的路径一致性算法推断每个簇的局部网络结构,最终通过聚合局部网络结构,也就是基因之间的依赖性网络,来构造最终的GRN。

(2) 基于回归方法的数据驱动的网络推断算法研究

最近关于数据驱动的动态网络构建的研究为我们提供了解决回归问题的新视角。在这项研究中,我们提出了一种数据驱动的动态网络构建方法来推断基因调控网络(D3GRN)。其中,将每个目标基因的调控关系转化为功能分解问题,并利用揭示网络相互作用的算法(ARNI)解决各个子问题。为了弥补ARNI仅从单元级构建网络的局限性,我们采用抽样和基于面积的评分方法来推断最终的网络。

(3) 基于单细胞RNA-seq测序数据的稀有细胞识别和聚类算法研究

单细胞数据填充、聚类以及稀有细胞识别是单细胞数据上游分析的核心任务,在很大程度上与本研究的重点,也就是构建与细胞类型相关的基因调控网络的必要步骤。现有的寻找稀有细胞的算法非常耗时或耗费内存。本文中,我们提出了一种高效准确的方法DoRC(*Discovery of Rare Cells*)。DoRC产生的稀有度分数可以帮助生物学家们着重于下游分析,只对超大规模内的部分表达单细胞RNA-seq数据进行分析。为了在随后的下游分析的过程中区分细胞类型,我们提出了新颖有效的细胞聚类方法RafClust。

(4) 基于矩阵分解的单细胞基因表达调控网络方法研究

识别细胞类型特征和细胞的基因表达活动程序(如生命周期过程、对环境因素的反应)对于理解细胞和组织的组成至关重要。虽然单细胞RNA-Seq数据可以量化成单个细胞中的转录本,每个细胞的表达谱可能是这两种类型的程序的混合物,使它们难以分离。在这里,我们提出了一个使用矩阵分解的算法WSSMFA来解决这个问题。通过模拟表明,我们提出的scGRNHunter方法可以准确地推断出身份和活动性的子程序(包括它们在每个细胞的相对贡献),并在此基础上构建基因调控网络。

1.4 论文组织结构

全文内容共六章,各章内容简述如下:

第一章 绪论。主要描述了基因调控网络研究在目前的研究背景与意义,国内外研究现状和发展动态。最后,介绍本论文的研究内容,并给出全文的结构安排。

第二章 基于互信息网络推断算法研究。主要介绍了基于互信息网络推断算法相关工作,为了降低假阳性调控边的引入设计了Loc-PCA-CMI算法,介绍了算法细节,并对使用的数据集、使用的数据集、评价指标进行了介绍,之后对实验结

果进行了讨论和总结。

第三章 基于回归方法的数据驱动的网络推断算法研究。主要回顾了当前最热的基于回归的基因调控网络构建方法的研究现状, 对比了 D3GRN 与其它几种方法的设计思路, 并给出了 D3GRN 的算法细节, 并对使用的数据集、使用的数据集、评价指标进行了介绍, 之后对实验结果进行了讨论和总结。

第四章 基于单细胞 RNA-seq 数据的稀有细胞识别和聚类算法研究。主要回顾了当前稀有细胞识别方向的方法及其优缺点, DoRC 的设计思路以及 DoRC 方法详细的流程, 针对过滤之后的稀有细胞后使用的 RafClust 聚类算法的实现细节, 基因差异分析。之后详细介绍了实验结果, 并对实验结果进行了讨论和总结。

第五章 基于矩阵分解的单细胞基因表达调控网络方法研究。主要提出了一种新的单细胞数据上进行身份 GEP (gene expressin program) 和活动 GEP 进行构建的想法, 并以此为基础详细介绍了 scGRNHunter 的几个步骤, 其中重点介绍了矩阵分解算法 WSSMFA。最后我们介绍了实验数据, 实验结果, 并对后续的研究进行了探讨。

第六章 总结与展望。总结全文并对未来的研究方向进行了展望。

2 一种新的基于基因敲除表达数据的基因调控网络结构推断方法

从基因表达数据推中推断基因调控网络 (GRN) 的结构一直是系统生物学中的十分具有挑战的问题。鉴定基因之间复杂的调控关系对于理解细胞的调控机制至关重要。至今基于信息理论的各种 GRN 推断方法已经被提出来。然而, 由于原始数据中存在的外部噪声、网络结构中的拓扑稀疏性和非线性基因之间的依赖等因素, 这些方法在网络推断中会引入冗余的依赖关系。特别是随着网络规模的增加, 这些方法的表现大幅降低。在本章节中我们提出了一种新的网络结构推断方法 Loc-PCA-CMI: 首先识别局部重叠基因簇, 然后基于条件互信息 (PCA-CMI) 的路径一致性算法推断每个簇的局部网络结构, 最终通过聚合局部网络结构, 也就是基因之间的依赖性网络, 来构造最终的 GRN。我们在 DREAM3 敲除数据集上对 LOC-PCA-CMI 进行了评估, 将其性能与其它基于信息理论的网络结构推断方法, 包括 ARACNE、MRNET、PCA-CMI 和 PCA-PMI, 进行了比较。实验结果证明, Loc-PCA-CMI 在 DREAM3 数据集上特别是在基因数目为 50 和 100 的网络上表现优于其它四种基准方法。

2.1 介绍

推断和理解基因调控网络 (GRN) 是系统生物学中的一个关键问题, 可以帮助生物医学科学家明确识别基因与基因之间复杂的调控关系、理解细胞中的调控机制 [60, 65]。在过去, GRN 是从实验干预中推断出来的, 其中基因之间的调控相互作用被验证。显然, 这种方法是不可行的 [83], 需要耗费大量时间和相当大的成本。由于微阵列技术的发展, 大量的基因表达数据通过测序被得到, 这使得基于计算方法从这些表达数据中推断出 GRN 成为可能 [84]。近年来, 基于计算方法的网络推断已成为最重要的目标之一 [65, 85]。已经提出了各种用于 GRN 推断的方法, 例如基于回归的方法 [73-74, 76, 86-88], 基于微分方程的方法 [89-91], 贝叶斯和动态贝叶斯网络 [37, 92-96], 以及基于状态空间的方法 [97-98]。不幸的是, 基因表达数据通常具有高维度和相对较小的样本量, 存在“维度诅咒”的问题 [99]。此外, 基因表达数据通常涉及大量外部噪声和非线性关系。所有这些问题使得准确推断基因之间的调控相互作用, 尤其是在后基因组时代处理大规模基因表达数据时, 变得更加复杂和具有挑战性。

如果不考虑基因之间的上游或下游调控关系, 并且忽略自调控机制, GRN 可以用无向非循环图来表示, 其中每个节点对应于一个基因, 而每条边代表基因之间的调控关系。人们基于各种不同的假设和不同的条件提出了从表达数据构建 GRN 精确结构的各种不同的计算方法 [100-101]。目前的这些方法可以大致分

为基于模型和无模型两大类别。

基于模型的方法通常制定系统的计算模型并进一步学习这种模型的参数。典型的计算模型包括布尔网络 [102-105], 贝叶斯网络 [29, 93, 106-108], 以及微分方程模型 [91, 109-113]。布尔网络模型是最简单的网络模型, 它通过布尔变量和布尔逻辑实现。因为基因表达的状态被认为只是活动或非活动, 布尔网络模型不能完全捕获复杂的系统行为 [114]。贝叶斯网络模型是一种流行的概率图形模型, 其中基因之间的依赖关系通过有向无环图描述。贝叶斯网络模型在处理噪声和结合先验知识方面优于其它模型, 但该模型中的结构学习是计算密集型的, 并且已被证明是 NP 难问题 [115]。微分方程模型通过函数表征基因在特定时间的表达水平, 其涉及与其它基因的调控相互作用。通常, 它将一个基因表达的变化率(导数)作为其它相关基因表达水平的函数。使用微分方程模型重建 GRN 的一个主要挑战是如何在高维模型中有效识别模型结构和估计参数。关于各种数据驱动建模方案和相关主题的文章评论, 可以参考 [40, 116-119]。

除了基于模型的方法外, 无模型方法主要通过衡量基因之间的依赖性来识别调控相互作用。典型的算法包括基于相关性和基于信息理论的方法。在基于相关性的方法中, 调控相互作用由两个基因之间的共表达程度决定, 例如 Pearson 相关性, 秩相关性, 欧几里德距离和一对表达值向量之间的角度 [120]。然而, 基于相关性的方法无法识别基因之间的复杂依赖性, 例如非线性依赖性 [121]。此外, 相当多的功能相关基因可能不会共表达, 这使得难以准确推断调控相互作用。基于信息理论的方法也是一种代表性的无模型方法, 其中互信息 (MI) 有利于衡量基因之间的潜在依赖性, 因为它可以有效地捕获非线性依赖关系 [58-59]。近年来, 已经提出了基于信息论的各种网络推断方法, 其侧重于区分直接调控相互作用与间接关联 [122]。为消除间接相互作用, Margolin 等人 [61] 提出了基于数据处理不等式的 ARACNE 方法, 并考虑了交互三角传递性质。Meyer [63] 的最小冗余网络 (MRNET) 使用最小冗余特征选择方法 [64], 其中对于网络中的每个候选基因, 它选择其高度相关基因的子集, 同时最小化所选基因之间基于互信息的标准。Zhang 等人 [59] 介绍了一种基于条件互信息 (PCA-CMI) 的路径一致性算法; Zhao 等人 [69] 引入了基于偏互信息 (PCA-PMI) 的路径一致性算法。路径一致性算法 (PCA) 是一种穷举算法, 广泛用于推断 GRN [59]。PCA-CMI 和 PCA-PMI 这两个算法通常会在运行时间和准确度之间进行折中权衡。随着网络规模的增加, 复杂网络结构里不可控制的外部噪声使得 GRN 的预测精度急剧下降。为了改善这种情况, 利用分而治之的策略, 我们首先使用头部的高度共同表达的基因作为局部聚类的质心; 然后用 PCA-CMI 对每个簇的精确结构进行细化。然后, GRN 的最终结构与所有局部网络结构的集合一起推断。我们将这种新方法命名为 Loc-PCA-CMI。从直觉上也可以看出, Loc-PCA-CMI 方法可以处理相对较大的数据集,

并且受益于 PCA-CMI 在小尺寸基因子网的相对准确的结构推断。

2.2 方法

在本节中, 我们将介绍信息理论中的相关工作, 包括熵、互信息 (MI) 和条件互信息 (CMI), 和我们提出的 GRN 结构推断方法 Loc-PCA-CMI。

2.2.1 相关工作

利用测量两个变量之间的非线性依赖关系时相对高效的优点, 信息理论越来越多地用于衡量基因间的调控关系强弱。互信息 (MI) 的定义如下:

$$MI(X, Y) = \int \int p(x, y) \log \frac{p(x, y)}{p(x)p(y)} dx dy \quad (2-1)$$

其中 $p(x, y)$ 表示两个变量 X 和 Y 的联合概率密度函数。 X 是基因表达量数据, 其中的元素表示不同条件 (样本) 中相应基因的表达值。 $p(x)$ (或者 $p(y)$) 表示 X (或者 Y) 的边缘概率密度分布。

条件互信息 (CMI) 可以用熵表示为:

$$\begin{aligned} CMI(X, Y|Z) &= H(X, Z) + H(Y, Z) \\ &\quad - H(Z) - H(X, Y, Z) \end{aligned} \quad (2-2)$$

其中 $H(X, Z)$, $H(Y, Z)$, $H(X, Y, Z)$ 表示联合熵。 CMI 值越高, 表明给定变量 Z , 变量 X 和 Y 之间越可能存在密切关系。

熵可以用高斯核概率密度来估计 [60], 变量 X 的熵可以通过如下方式计算, 其中 $|C|$ 是变量 X 协方差矩阵的行列式 [59]:

$$H(X) = \log(2\pi e)^{\frac{n}{2}} |C|^{-\frac{1}{2}} \quad (2-3)$$

进一步地, 我们可以得到下面的等式:

$$MI(X, Y) = \frac{1}{2} \log \frac{|C(X)| * |C(Y)|}{|C(X, Y)|} \quad (2-4)$$

2.2.2 Loc-PCA-CMI

众所周知, 生物系统中节点之间是很少完全连通的, 大多数节点只直接连接到少量其它节点 [123], 因此 GRN 也是一种稀疏网络。识别网络的稀疏结构的关键步骤是识别可能具有相对高的共表达值的有意义的边。具体来说, 我们提出的方法 Loc-PCA-CMI 首先通过 Pearson 相关分析和 p 值错误率 (FDR) 校正选择头部的 n 条高度共表达的边; 然后, 在缩减的边构成的空间中, 用边连接的基因计算局部重叠簇。然后对于每个局部类, 我们应用 PCA-CMI 算法, 它可以通过从低到高依赖关联重复去除最可能不相关的边来构建高置信度无向网络 [124], 直到没有边

可以删除, 获取每个局部的网络结构。通过对每个推断的局部子网络结构边权重取平均来获得完整调控网络的最终边的权重。整个方法框架如图 2-1 所示, 实现细节如算法 1 所示。由于 PCA-CMI 非常适合相对较小的 GRN 结构推断, 我们进行了预处理: 如果局部类中基因的数量小于或等于常数 c , 则直接应用 PCA-CMI 推断 GRN 的结构。

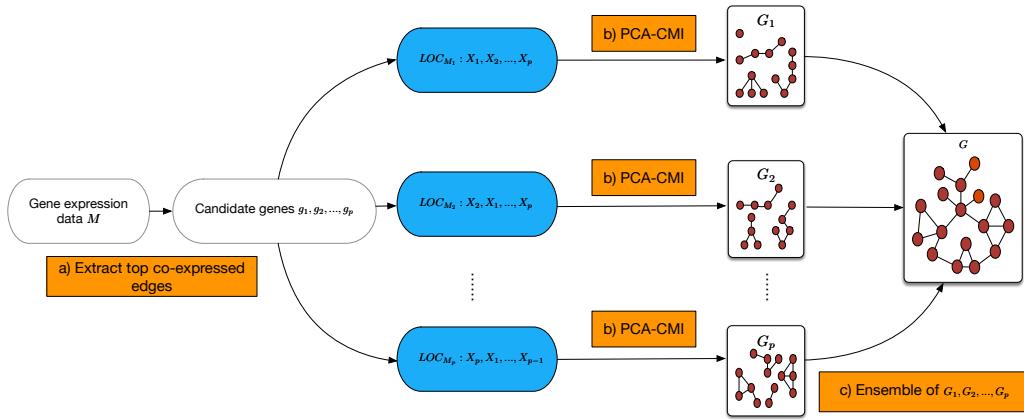


图 2-1 Loc-PCA-CMI 方法框架图. a) 从基因表达矩阵 M 中抽取头部 n 条共表达边, 其对应的候选基因为 g_1, g_2, \dots, g_p 。这些候选基因被分组到局部簇中 $LOC_{M_1}, LOC_{M_2}, \dots, LOC_{M_p}$, 其中 g_1, g_2, \dots, g_p 是分别作为每个簇的质心。b) 对每一个局部之间有重叠的簇, 我们应用 PCA-CMI 算法来得到它准确的结构。c) 聚合 G_1, G_2, \dots, G_p 来得到 GRN 的最终结构图 G 。

算法 1 Loc-PCA-CMI

Input: M (the gene expression data matrix), m (the number of genes), n (the number of top ranked edges), c (constant number); k (CMI order number) and β (order threshold) in subroutine PCA-CMI.

Output: Graph weight matrix G

```

1: if  $m \leq c$  then
2:    $G \leftarrow$  PCA-CMI( $M, k, \beta$ );
3:   return  $G$ 
4: else
5:   Construct pair-wise gene-gene Pearson correlation matrix  $\Omega = \rho(M_i, M_j)$ ;
6:   Select top  $n$  edges as  $E$  with highest Pearson correlation value in  $\Omega$  with
      FDR correction in p-value, and according to which to get  $p$  candidate genes as
       $g_1, g_2, \dots, g_p$ ;
7:   for each gene in  $g_1, g_2, \dots, g_p$  do
        Retrieve its directly connected genes that in edges list  $E$  as local cluster
         $LOC_{M_i}$ ;
8:   for each cluster  $LOC_{M_i}$  in  $LOC$  do
         $G_i \leftarrow$  PCA-CMI( $LOC_{M_i}, k, \beta$ );
9:    $G \leftarrow \text{mean}(G_1, G_2, \dots, G_p)$ ;
10:  return  $G$ 

```

算法 1 的计算复杂度通常由两个因素决定: 第一个是局部重叠簇 p 的数量,

通常低于基因数 m ; 第二个是 PCA-CMI 子程序的复杂性。所有 PCA-CMI 子程序可以并行执行, 以使所提出的算法 Loc-PCA-CMI 更有效地执行。 t 与基因数量 m 的顺序相同。PCA-CMI 的计算复杂度由 CMI 阶数 k 和 LOC_{M_i} 的簇大小 $|C|$ 控制, 可以粗略估计为 $O(|C|^k)$ 。因此, PCA-CMI 的最终计算复杂度可以计算为 $O(m * |C|^k)$ 。在最坏的情况下, 如果簇大小 $|C|$ 等于 m , 即每个簇包含其中的所有基因, 因此计算复杂度为 $m * m^k = m^{k+1}$ 。然而, 这种最糟糕的情况在实验中很少发生, 因为 $|C|$ 通常低于 m 。

2.3 数据集

我们使用来自著名的 DREAM3 竞赛的六个模拟数据 [125] 对 Loc-PCA-CMI 的性能进行了基准测试。DREAM3 使用 GeneNetWeaver 软件来模拟生成基因网络表达数据。在来自已知生物模式的调节相互作用系统的子网: Ecoli (大肠杆菌) 和 Yeast (酵母) 的基础上, 得到测试使用的基准网络。在我们的实验中评估了 DREAM3 中的总计六个基因敲除表达网络, 其包括三种不同规模的网络节点数: 10, 50, 100, 和两种不同类型的生物: Ecoli 和 Yeast。

表 2-1 展示了这 6 个数据集的详细描述。

表 2-1 Descriptions of the datasets in our experiments

Datasets	Number of samples	Average(Max) degree	Number of edges	Network density
DREAM3-10 Ecoli	11	2.2(5)	11	0.244
DREAM3-50 Ecoli	51	2.48(14)	62	0.051
DREAM3-100 Ecoli	101	2.5(14)	125	0.025
DREAM3-10 Yeast	11	2(4)	10	0.222
DREAM3-50 Yeast	51	3.08(13)	77	0.063
DREAM3-100 Yeast	101	3.32(10)	166	0.034

针对每个数据集而言, 输入数据文件中的行代表样本 (实验), 列代表基因 (实验变量)。第一行是野生型表达数据, 该样本中的每个基因都保持稳定状态。第 l ($l > 1$) 行则表示在对应的样本中第 $l - 1$ 个基因敲除后其它基因的表达量。

2.4 结果和讨论

如算法 1 中所述, 三个参数影响了 GRN 结构推理中 Loc-PCA-CMI 的性能。第一个参数是顶部选定边的数 n 。如果 n 增加, 则考虑更多边, 随后局部簇大小将增加。第二个参数是 β , 它作为 MI 和 CMI 的阈值来决定独立性。第三个参数是 CMI 阶号 k 。从理论上讲, 通过增加 k , 如果 CMI 没有达到 $k - 1$ 阶的门槛 β , 结构

会更准确。后两个参数是 PCA-CMI 和 PCA-PMI 里面的参数。 n 的最佳值可以通过交叉验证获得, 通常 n 的较大值可以促成更大规模的群集, 并且网络中涵盖更多基因; 在我们的实验中, 我们将其值均匀地设置为 $n = \binom{m}{2}/5$ 。除了上述三个参数外, 我们在算法 1 中设置常量 $c = 10$, 即如果基因数小于或等于 10, 则 Loc-PCA-CMI 直接称为 PCA-CMI, 并且在这种情况下, Loc-PCA-CMI 和 PCA-CMI 的性能是相同的。我们通过评估接收器工作特性曲线下面积 (AUROC) 和准确率召回率曲线下面积 (AUPR) 来评估 Loc-PCA-CMI 的性能。与稀疏生物网络一样, 不存在的边(负样本)的数量明显超过现有边(正样本)的数量; 事实上, AUPR 对 AUROC [126] 提供了更多信息。我们倾向于使用 AUPR 进行评估, 但为了与采用 AUROC 作为评估指标的其它方法进行保守比较, 我们还将 AUROC 作为补充指标。较高的 AUROC 和 AUPR 值表明更准确的 GRN 预测。为此, 我们通过比较黄金标准网络中的监管边与最高 q 边来计算真阳性 (TP)、真阴性 (TN)、假阳性 (FP) 和假阴性 (FN) 边的数量来自 Loc-PCA-CMI 的排名列表输出。通过绘制真实阳性率 $TPR = TP/(TP + FN)$ 与假阳性率 $FPR = FP/(FP + TN)$ 来增加 q ($q = 1, 2, \dots, m^2$) 来构建 ROC 曲线。类似地, 绘制精度 ($TP/(TP+FP)$) 和召回 ($TP/TP+FN$) 曲线以增加 q 。应该注意的是, 在算法 1 中, 在获得每个局部聚类之后, PCA-CMI 和 PCA-PMI 都是后续结构粹化的候选方案。如果用 PCA-PMI 替换 PCA-CMI, 则会生成一种新方法, 我们将其命名为 Loc-PCA-PMI, 类似地。然后得到四种基于 PCA 的方法, 包括 PCA-PMI、PCA-CMI、Loc-PCA-PMI 和 Loc-PCA-CMI, 所有这些方法目前都属于无模型方法。如表 2-1 所示, 在六个基准数据集 DREAM3-10 中, Ecoli 和 Yeast 数据集仅包含 10 个基因, 因此根据算法 1 的原理, Loc-PCA-CMI 和 PCA-CMI 的表现相同, 就像 Loc-PCA-PMI 和 PCA-PMI 的情况一样。为了对这些基于 PCA 的方法进行有意义的比较, 我们选择了其它四个基因数大于 10 的数据集。阶数在 [59, 69] 中有所讨论, 我们在实验中设置 $\beta = 0.03, k = 2$ 。同时为了探讨阶数 k 的大小是如何影响这些方法的性能, 在固定阈值 $\beta = 0.03$ 后, 我们把这四种方法中的阶数 k 从 1 逐渐变化为 10, 然后分别计算 AUROC 和 AUPR。图 2-2 总结了基准数据集的结果, 我们可以从此图得到以下两个结论:

- 阶数 k 会对这四种基于 PCA 的方法的结果产生影响, 通常当 k 达到 4 时 AUPR 和 AUROC 变得稳定, 除了 DREAM3-100 Ecoli 数据集上略有不同。
- Loc-PCA-CMI 和 Loc-PCA-PMI 分别比 PCA-CMI 和 PCA-PMI 产生更高的 AUPR 和 AUROC, 因此该算法采用的局部聚类策略有助于提高方法 PCA-CMI 和 PCA-PMI 的表现。

我们在六个基准数据集上使用 Loc-PCA-CMI 和四种基准方法 ARACNE、MRNET、PCA-PMI、PCA-CMI 进行了比较实验。我们使用 R 包 “minet” 和其默认参数来评估 ARACNE 和 MRNET [127]。使用 Pearson 相关系数直接从连续基因敲除

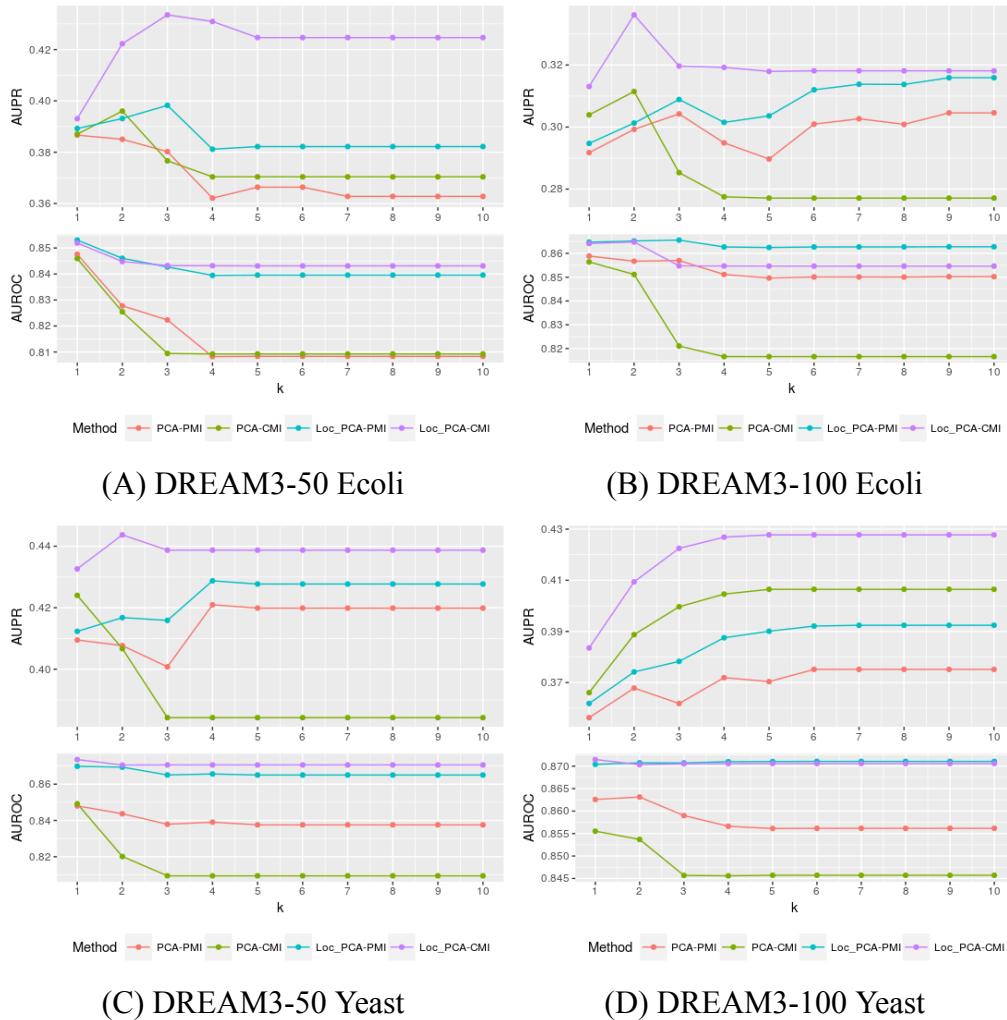


图 2-2 AUPR 和 AUROC 由改变 k 从 1 到 10 的四种 PCA 基于方法在四个不同数据集中：(A) DREAM3-50 Ecoli；(B) DREAM3-100 Ecoli；(C) DREAM3-50 Yeast；(D) DREAM3-100 Yeast。

表达数据 [128-129] 中近似估计方法的 MI 矩阵。为了实现 PCA-PMI 和 PCA-CMI，我们根据 [59, 69] 中提供的 URL 下载了 MATLAB 代码。另外，PCA-PMI 和 PCA-CMI 方法中的参数使用默认值，也就是 $\beta = 0.03$ 和 $k = 2$ 。对于 Loc-PCA-CMI，我们还对这两个参数采用了相同的值进行比较。表 2-2 给出了该实验的 AUROC 和 AUPR。从表中可以看出，当网络规模增大时，所有的方法的 AUPR 都会急剧下降。Loc-PCA-CMI 仅在 DREAM3-10 Yeast 数据集中的 PCA-PMI (或本文提出的 Loc-PCA-PMI) 之后，而在其它五个数据集中，就 AUROC 和 AUPR 而言，Loc-PCA-PMI 表现优于其它四种方法 ARACNE、MRNET、PCA-PMI 和 PCA-CMI。此外，为了更完整地比较，我们还在表中展示了 Loc-PCA-PMI 的实验结果，其中 $\beta = 0.03$ 和 $k = 2$ 。Loc-PCA-CMI 和 Loc-PCA-PMI 在 AUROC 上几乎相同。然而，在大多数数据集中，Loc-PCA-CMI 的 AUPR 优于 Loc-PCA-PMI。我们提供了包括所有方法、基准数据集和测评脚本相关的资料，在 <https://github.com>

om/chenxofhit/Loc-PCA-CMI.git 上可开放获取。

表 2-2 AUROC and AUPR for the six datasets using different methods

Dataset	ARACNE		MRNET		PCA-PMI		Loc-PCA-PMI		PCA-CMI		Loc-PCA-CMI	
	AUROC	AUPR	AUROC	AUPR	AUROC	AUPR	AUROC	AUPR	AUROC	AUPR	AUROC	AUPR
DREAM3-10 Ecoli	0.523	0.255	0.518	0.258	0.816	0.483	0.816	0.483	0.825	0.499	0.825	0.499
DREAM3-50 Ecoli	0.474	0.050	0.529	0.061	0.828	0.385	0.846	0.393	0.825	0.396	0.845	0.422
DREAM3-100 Ecoli	0.505	0.027	0.488	0.025	0.857	0.299	0.865	0.301	0.851	0.311	0.865	0.336
DREAM3-10 Yeast	0.628	0.321	0.644	0.322	0.995	0.933	0.995	0.933	0.993	0.918	0.993	0.918
DREAM3-50 Yeast	0.507	0.074	0.524	0.080	0.844	0.408	0.869	0.417	0.820	0.406	0.871	0.444
DREAM3-100 Yeast	0.547	0.040	0.556	0.042	0.863	0.368	0.871	0.374	0.854	0.389	0.870	0.409

2.5 结论

我们基于分而治之的想法提出了一种命名为 Loc-PCA-CMI 的新的基于无模型的 GRN 结构推断方法。在 DREAM 3 敲除数据集上的实验表明, Loc-PCA-CMI 受益于局部聚类的策略。此外, Loc-PCA-CMI 优于其它方法, 包括 ARACNE、MRNET、PCA-PMI 和 PCA-CMI, 特别是在大小为 50 和 100 的网络上表现更佳。

Loc-PCA-CMI 是 PCA-CMI 的扩展版本, 其计算效率的局限性也一样存在, 特别是在处理大型数据集时。在大型网络的情况下, 局部簇的数量可能非常大。但是, 如果我们可以控制每个局部簇的大小, 我们的方法也将适用于大型数据集。我们未来的工作之一是改进聚类策略, 例如整合蛋白质复合物 [130-131], 以便更有效地处理大规模样本数据。另外, 值得注意的是, 我们主要关注推断 GRN 的结构, 并没有考虑网络自身的稳定性问题。因此, 我们未来的研究将尝试从网络稳定性角度出发推断更鲁棒的基因调控网络结构。

3 一种新的数据驱动的基因调控网络构建方法

从基因表达数据推断基因调控网络 (GRNs) 是系统生物学中一个具有挑战性的基础问题。现有的几种算法将 GRNs 推理表述为回归问题, 并以聚合 (ensemble) 策略获得最终的网络。最近关于数据驱动的动态网络构建的研究为我们提供了解决回归问题的新视角。在这项研究中, 我们提出了一种数据驱动的动态网络构建方法来推断基因调控网络 (D3GRN)。其中, 将每个目标基因的调控关系转化为功能分解问题, 并利用揭示网络相互作用的算法 (ARNI) 解决各个子问题。为了弥补 ARNI 仅从单元级构建网络的局限性, 我们采用抽样 (bootstrapping) 和基于面积的评分方法来推断最终的网络。实验结果表明, 在 DREAM4 和 DREAM5 基准数据集上, D3GRN 在 AUPR 这个评价指标上与最先进的算法相比具有竞争力。

3.1 介绍

基因调控在基因转录中发挥重要作用 [132-133], 基因分化 [25], 细胞命运走向 [22, 134], 复杂疾病 [135]。揭示基因调控网络 (GRNs) 的结构一直是系统生物学跨学科领域的核心工作。随着微阵列和 RNA 测序等高通量技术的出现, 大量的数据被产生, 这使得仅从基因表达数据或多类别数据推断 GRN 从基于计算方法 [84] 的角度变得可行。然而, 由于可用测量数量少且数据量大, 数据噪声大, 仅从基因表达数据推断 GRN 仍然存在巨大的挑战,

人们已经提出了各种用于 GRN 推断的方法 [101, 136-137], 如基于相关和信息理论的方法, 布尔网络 (BNs)、贝叶斯网络、常微分方程 (ODEs) 和基于回归的方法。这些方法从粒度级别上可以分为两类。第一类预测基因相互作用的存在与否, 仅仅给出静态网络, 也就是它们仅描述拓扑信息, 基于相关性和信息理论的方法属于这一类。其它方法属于第二类, 它预测了描述拓扑和动态信息的基因相互作用的强度。在 GRN 推断方法的所有类别方法中, 基于 ODE 和回归的方法是两种应用最广泛的技术。

在基于相关和信息理论的方法中, 除了简单的 Pearson 相关性 [49], 互信息 (MI) [138] 是最受亲睐的度量指标之一, 它能够捕获成对或基因组之间的复杂的非线性和非单调动力学关系 [139-140]。ARACNE [60] 使用数据处理不等式 (DPI) 来过滤掉来自三重基因的间接相互作用。随后基于相同的目的, 条件互信息 (CMI) [59], 局部重叠基因簇基于条件互信息 (Loc-PCA-CMI) [141], 部分互信息 (PMI) [69] 和部分信息分解 (PID) [71] 被提出来, 这些方法都考虑尽可能消除假阳性或者间接调控关系。

在 BNs 中, 基因的替代状态用离散值 0 (无效) 和 1 (有效) 表示, 调节相互作用由布尔逻辑 [142] 描述。概率布尔网络 (PBNs) [102] 将概率引入标准 BN 以表达

调控逻辑中的不确定性。典型的演变方法,例如随机布尔网络 (SBNs) [143], 旨在提高 PBN 的计算性能。BNs 的弱点是模型只考虑离散状态的基因。因此, 无法有效捕获真实基因表达中蕴含的详细信息。

贝叶斯网络, 包括传统的贝叶斯网络 [27, 144] 和动态贝叶斯网络 (DBN) [39], 基于概率和图论对基因调控过程进行建模。贝叶斯网络将基因的规则视为随机变量之间的依赖概率, 并从基因谱中学习最佳结构。尽管最近取得了一些进展 [145], 贝叶斯网络仍然具有相当大的计算开销, 不适用于大型全基因组数据集。

ODE 提供了对调节动力学的无穷小描述 [24], 通过将基因的变化率 (时间导数) 与其表达值联系起来。Inferelator [146], S 系统模型 [147-149] 是 ODE 中的典型方法。通常, 基于 ODE 的方法通过利用大参数空间估计而是灵活的。结果, 类似于贝叶斯网络, 需要巨大的计算来完成任务。

大多数基于回归的方法将 GRN 推断问题形式化为特征选择问题并用聚合策略构建 GRN。GENIE3 [150] 被认为是一些基准数据集的最新技术 [122], 这是基于随机森林聚合的特征选择。TIGRESS [74] 使用最小角度回归 (LARS) 稳定选择结合起来解决 GRN 推断问题。NIMEFI [121] 探讨了几种聚合方法的潜力, 例如 GENIE3, 集成支持向量回归 (E-SVR) 和 集成弹性网络 (E-EL) [151], 并在一般框架下结合这些方法的预测。bLARS [152] 可以被视为 TIGRESS 的变形方法, 其中调控关系是从预定义的基础函数建模的, 并且通过修改的 LARS 算法获得最终的 GRN。

最近, 数据驱动的动态网络构建尤其是在物理系统中是一个非常有吸引力和有趣的话题。SINDy [153] 假设只有少数重要变量可以控制动态, 因此, 方程在可能的函数空间中是稀疏的。然后, 它使用稀疏回归来确定准确表示数据所需的动态控制方程中的最少项。ARNI [154] 是一个独立于模型的框架, 用于推断网络动态系统中的直接交互作用, 这仅依赖于他们的非线性聚合动力学。它通过函数分解和基函数的展开来求解非线性微分方程组。

虽然 bLARS, SINDy 和 ARNI 是在不同的研究领域提出来的, 它们的基本思想十分相似。表 3-1 是从三个不同方面对这三个方法进行比较。形式化函数分解意味着该方法是否具有函数分解方程的形式描述; 稀疏组约束指示该方法是否利用候选项的稀疏组约束, 而基于网络的构造表明该方法是否旨在重建整个网络结构。SINDy 和 ARNI 都没有解决从网络层面发现物理机制的问题, 但仅来自节点级别。由于没有一种方法都结合 这三点, 所以在本研究中, 我们第一次尝试将上述三个方面合为一体, 提出了一种新的数据驱动的动态网络构建方法。D3GRN 将每个靶基因的调节关系转化为功能分解问题并以特征选择的方式解决每个子问题, 通过使用 ARNI 算法揭示网络相互作用结构。使用基于区域的评分方法通过自举策略推断整个网络结构。我们在 DREAM4 和 DREAM5 基因调控网络重建竞

赛数据集上将方法 D3GRN 与其它几种当今最优秀的方法进行比较, 结果表明我们的方法在 AUPR 上具有优势。

表 3-1 Comparison of the related methods

	bLARS	SINDy	ARNI	D3GRN
Formal function decomposition	✗	✓	✓	✓
Sparse group constraints	✓	✗	✓	✓
Network based construction	✓	✗	✗	✓

3.2 方法

3.2.1 问题定义

如果不考虑基因之间的上游或下游调节关系并且忽略自我调节机制, 则可以将 GRN 视为有向无环图 (DAG)。在 DAG 中, 每个节点对应于基因, 并且每个边缘代表基因之间的调节关系。和许多其它聚合方法一样 (例如 [74, 121, 150, 155-157]), 它不利用不同实验条件的信息 (例如, 基因敲除, 扰动甚至重复), 我们仅基于基因表达数据使用 GRN 推理问题的通用框架。作为输入基因表达数据, 我们考虑在 M 实验条件下测量 N 基因的表达量。因此, 基因表达数据 A 定义如下:

$$A = [x_1, x_2, \dots, x_N] \in \mathbb{R}^{M \times N} \quad (3-1)$$

其中 x_i 是所有 M 实验条件下第 i 个基因的表达值的列向量。

GRN 推断方法预测基因表达数据基因之间的调节联系 A 。大多数方法提供了从最高到较低置信度的潜在调控关系的排名列表。随后可以通过在该排序列表上选择变化的阈值来获得不同的 DAG。因为最终用户有利于探索各种类型的网络阈值水平 [155], 我们只关注本研究中的排名问题。值得注意的是, 排名是“逆向工程对话评估和方法”(DREAM) [158] 竞赛的标准预测格式, 其中已经提出了各种 GRN 推断方法。此外, 我们不考虑从排名中获得的网络的稳定性。

为了从表达数据 A 推断出调控网络, 我们计算一个权重分数 S_{ij} , 用于从基因 i 到基因 j 的潜在边, 边表示基因 i 在表达水平上调节基因 j 并且权重分数 S_{ij} 代表基因 i 调控的强度 (包括上调和下调) 基因 j 。

3.2.2 基于集成回归方法的网络推理

受基于特征选择的集成方法 (例如 GENIE3 [150] 和 TIGRESS [74]) 成功应用的启发, n 个基因的 GRN 推断问题可以分解为 n 个子问题, 其中每个子问题都可以看作是机器学习中的特征选择问题 [159]。更具体地说, 对于每个目标基因, 我

们希望从表达水平上确定直接影响它的基因子集。设 A 是等式 (3-1) 中定义的基因表达数据, 第 i 个基因为靶基因, 我们在 M 实验条件下定义了其他候选表达调节因子:

$$x^{-i} = [x_1, \dots, x_{i-1}, x_{i+1}, \dots, x_N] \quad (3-2)$$

特征选择问题可以定义为:

$$x_i = F(x^{-i}) + \epsilon, \forall i \in \{1, 2, \dots, N\} \quad (3-3)$$

其中, F 是任意一个平滑, 典型的如 x^{-i} 个基因 (也就是跟基因 i 相关的基因) 表达值的非线性函数; ϵ 是噪声项 [74, 150]。把 N 个独立的基因排名聚合起来, 我们能得到一个全局的 GRN 的调控关系的排名。

3.2.3 使用 D3GRN 进行 GRN 推断

D3GRN 算法的伪代码如算法 2 所示。 A_j 指的是矩阵 A 的第 j 列, A_I 是 A 中包含索引列集合 I 的子矩阵。

假定, 输入的基因表达矩阵 $A \in \mathbb{R}^{M \times N}$, 并且转录因子的索引 $I \subset \{1, \dots, N\}$, 同时抽样数目和 ARNI 算法的步数 L 已经知道。那么对于每一个目标基因 j , 第 i 次抽样, 通过在 A 中放回重复抽样, 对应的目标基因 j 的表达值为 y , 其它的转录因子 X 的表达值也获取到。ARNI 算法被调用后, 返回的是被选中的调控因子 SM_j 的一个有序列表 (ordered list)。最后, 在所有的 b 轮抽样结束后, 矩阵 SM 作为输入变量, 通过基于面积的打分方法, 给一个候选的转录因子和目标基因之间的边 0 和 1 之间的分数。抽样和基于面积的打分方法的细节, 以及计算复杂度分析, 在后续的章节中会详细描述。

算法 2 D3GRN Pseudo Code

Require: $A \in \mathbb{R}^{M \times N}$, $I \subset \{1, \dots, N\}$, $|I| = n \triangleright M$ samples, N genes, I index set of n regulators

Ensure: $b, L \triangleright$ Number of bootstrapping runs and ARNI steps

1: Initialize $S \in \mathbb{R}^{N \times n}$	\triangleright Initialize adjacency matrix of the GRN
2: Initialize $SM \in \mathbb{R}^{n \times b}$	\triangleright Initialize the selection matrix
3: for $i = 1 \rightarrow b$ do	\triangleright For each bootstrapping run
4: $A^* = \text{resample}(A)$	\triangleright Resampling with replacement
5: for $j = 1 \rightarrow n$ do	\triangleright For each target gene
6: $y = A_j^*, X = A_{I \setminus j}^*$	
7: $SM_{ji} = \text{ARNI}(y, X, L)$	\triangleright Returns selected tx-factors with the ARNI algorithm
8: $S = \text{area-score}(SM, L, b)$	\triangleright Get the weight score matrix with the area-score metric
9: Output: S	\triangleright Output the score matrix

3.2.4 基于 ARNI 的特征选择

对于给定节点 i 及其对应的微分方程, ARNI 转向获得哪些节点 j 的网络提供了直接的物理相互作用, 并出现在等式的右侧, 而不是探索方程中这些节点之间的交互函数的细节。

详细地, 对于 N 个节点的动态系统, ARNI 首先将单元 i 的动态性分解为与网络中其他单元的交互项 [154]:

$$\begin{aligned}\dot{x}_i &= f_i(\Lambda^i x) \\ &= \sum_{j=1}^N \Lambda_j^i g_j^i(x_j) + \sum_{j=1}^N \sum_{s=1}^N \Lambda_j^i \Lambda_s^i g_{js}^i(x_j, x_s) \\ &\quad + \sum_{j=1}^N \sum_{s=1}^N \sum_{w=1}^N \Lambda_j^i \Lambda_s^i \Lambda_w^i g_{jsw}^i(x_j, x_s, x_w) + \dots + \epsilon_i\end{aligned}\tag{3-4}$$

其中 $\dot{x}_i := [\dot{x}_{i,1}, \dot{x}_{i,2}, \dots, \dot{x}_{i,M}] \in \mathbb{R}^M$, $f : \mathbb{R}^N \rightarrow \mathbb{R}$ 是一个平滑函数, 对角矩阵 $\Lambda^i \in \{0, 1\}^{N \times N}$ 和 $\Lambda_j^i = 1$ 如果 j 直接作用于 i , 否则 $\Lambda_j^i = 0$, $g_j^i : \mathbb{R} \rightarrow \mathbb{R}$, $g_{js}^i : \mathbb{R}^2 \rightarrow \mathbb{R}$, $g_{jsw}^i : \mathbb{R}^3 \rightarrow \mathbb{R}$, 并且一般 $g_{j_1 j_2 \dots j_K}^i : \mathbb{R}^K \rightarrow \mathbb{R}$ 表示 (未知) 单元 $j_k (k \in \{1, 2, \dots, K\})$ 和单元 i 的第 K 阶相互作用, 最后一项 ϵ_i 代表于作用于 i 的额外噪声。

函数 $g_{j_1 j_2 \dots j_K}^i$ 无法访问, 可以将其分解为基函数 h , 我们可以将等式 (3-4) 重写为 [154]。

$$\begin{aligned}\dot{x}_i &= \sum_{j=1}^N \Lambda_j^i \sum_{p=1}^{P_1} c_{j,p}^i h_{j,p}(x_j) \\ &\quad + \sum_{j=1}^N \sum_{s=1}^N \Lambda_j^i \Lambda_s^i \sum_{p=1}^{P_2} c_{js,p}^i h_{js,p}(x_j, x_s) \\ &\quad + \sum_{j=1}^N \sum_{s=1}^N \sum_{w=1}^N \Lambda_j^i \Lambda_s^i \Lambda_w^i \sum_{p=1}^{P_3} c_{jsw,p}^i h_{jsw,p}(x_j, x_s, x_w) \\ &\quad + \dots + \epsilon_i\end{aligned}\tag{3-5}$$

其中, P_k 表示扩展函数中采用的基函数数目 [160]。 $c_{j,p}^i$, $c_{js,p}^i$, $c_{jsw,p}^i$ 为未知系数。适当的基函数 h 有利于形成相关的函数空间。例如, 对偶基函数类 $g_{ij}^i(x_i, x_j)$ 可以是 $h_{ij,p}^i(x_i, x_j) = (x_j - x_i)^p$ 或 $h_{ij,p}^i(x_i, x_j) = x_i^{p_1} x_j^{p_2}$ 等形式。

需要注意的是, 该框架旨在揭示动态系统中各单位的直接交互作用, 尤其是时间序列数据。对于 GRN 推理问题, 尤其是来自非时间序列数据的推理, 可以对等式 (3-5) 做一个修改。更特别的是, 将等式 (3-5) 中左边的时变项 \dot{x}_i 替换为 x_i 。与一个非时间变化的项 x_i , 这是一个矢量。不考虑自我作用的同时, 修改后的方程可

以定义为:

$$\begin{aligned}
 x_i = & \sum_{j=1}^N \Lambda_j^i \sum_{p=1}^{P_1} c_{j,p}^i h_{j,p}(x_j) \\
 & + \sum_{j=1}^N \sum_{s=1}^N \sum_{w=1}^N \Lambda_j^i \Lambda_s^i \Lambda_w^i \sum_{p=1}^{P_3} c_{jsw,p}^i h_{jsw,p}(x_j, x_s, x_w) \\
 & + \dots + \epsilon_i
 \end{aligned} \tag{3-6}$$

从等式 (3-5) 到等式 (3-6) 的转换是合理的。在这种情况下, 等式 (3-6) 就是等式 (3-3) 的详细实现。重构问题就变成了识别等式 (3-6) 中的非零相互作用项。系数向量 $c_{j,p}^i$, $c_{js,p}^i$, $c_{jsw,p}^i$ 是未知的, 阻碍了 Λ^i 的计算。在等式 (3-6) 中加上一个由零和非零系数组成的块状结构约束即可, 分别代表不存在和现有的相互作用。这些结构化的解是由沿 c^i 分布的非零条目 (代表作用于单位 i 的非零交互作用) 的块 c_s^i 构成的。提出了揭示网络交互作用的算法 (ARNI) 来解决这个数学分组变量的回归问题。这是一种基于块正交最小二乘 (BOLS) 算法的贪婪方法 [161]。ARNI 在本质上可以看作是一种合适的特征选择方法。与著名的 Sparse Group Lasso [162] 相同。算法的细节在文献 [154] 的附件中详细解释。

3.2.5 抽样 (bootstrapping)

D3GRN 算法采用抽样方法, 以获得更可靠的目标基因的调控因子选择。一般来说, 抽样 [163] 是用于从经验分布的中估计参数。抽样 [163] 从经验分布中产生多组样本。通过从观察样本中重采样, 然后计算每个重采样集里面的未知参数。最后, 通过对所有重新采样的集合进行平均, 就可以得到有关参数的估计值。在重采样中, 从观察样本中随机抽取样本 (均匀随机, 有替换)。重采样技术经常被应用于在欠确定问题的情况下得到稳定的结果 [164]。在当前的 D3GRN 实现中, 抽样运行 $b=200$ 次。在每次抽样过程中, y 和 X 是从给定的基因表达数据中均匀随机选择重新采样与替换。随后, ARNI 算法被用来选择这些抽样的调节因子。所有抽样运行的结果使用基于面积的评分 [74] 技术进行汇总。需要注意的是, D3GRN 算法只应用抽样方法来获得每个目标基因的高置信度调控因子, 并不是同 [74] 那样在许多抽样网络上进行汇总。

3.2.6 基于面积的评分

基于面积的评分法 [152] 是根据它在指定的抽样运行次数中的频率, 给每个候选调控因子打分。在每次抽样运行中, ARNI 提供的目标基因的调控因子的有序列表在数学上是独立的。这种评分方法旨在利用选择的调控因子的整体排序信息。这是通过基于面积的评分方法实现的, 具体如下所述。

设 ϕ_{ijl} 为第 j 个调控因子在 ARNI 的第 l 步中的累积选择频率。 $l = 1, \dots, L$, 显然 ϕ_{ijl} 在 $[0, 1]$ 。平均值取所有抽样运行的平均值, 基因 i 的调节因子 j 在总 L 步数中的得分 S_{ij} 定义为:

$$S_{ij} = \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \phi_{ijl} \quad (3-7)$$

例如, 假定 $\phi_{ij1} = 0.3, \phi_{ij2} = 0.5, L = 5$ 。在第 5 个步骤中, 第 j 个调控因子在第一个 ARNI 步骤中 30% 的次数被选择, 在第二个 ARNI 步骤中 20% 的次数被选择, 那么累计选择频率 ϕ_{ij2} 为 50%。分数 S_{ij} 有一个自然的解释, 即由总面积 L 归一化的累积选择频率曲线下的面积。显然, 这个分数不仅考虑了转录因子的总体选择频率, 而且还倾向于奖励早期选择到的 ARNI 步骤。与基于整体选择频率 ϕ_{ij} 的简单排名相比, 这种方法对 ARNI 步骤数的敏感性较低。

3.2.7 计算复杂度

算法的计算复杂度主要取决于 ARNI, 每个目标基因需要 $O(t^2 * (tp)^3)$ 。其中 t 为转录因子的数目, p 为基本函数的数目 (即方程 (3-5) 中的 P_k)。 $O((tp)^3)$ 是由于 BOLS 算法的 Moore-Penrose 伪逆复杂性。因此, 该算法的总体计算复杂度为 $O(t^5 p^3 n b)$ 。其中, n 是目标基因的数量, b 是抽样数, 由于 t 通常比 n 小得多, 时间复杂度的上界是 $O(n^6 p^3 b)$ 。由于 t 通常比 n 小得多, 所以时间复杂度的上界是 $O(n^6 p^3 b)$ 。算法 2 中的 “for” 循环是完全可以并行的, 可以在多核甚至分布式集群机器上同时进行。

3.3 实验结果

3.3.1 输入数据

在过去十年中, GRN 推理一直是一个相当活跃的研究领域。因此, 一个名为“逆向工程对话”的社区联合体 (DREAM)[158] 成立, 在过去十年中一直在积极地研究 GRNs 推理。DREAM 联盟举办国际逆向工程挑战赛, 提供标准化的通用输入数据集和性能评估指标来比较不同的方法。该组织提供的数据集成为了 GRN 推理领域的金标准, 经常用于评估新算法的性能。

在实验中, 我们使用 DREAM4 和 DREAM5 挑战赛中的 6 个模拟数据集 [116]。数据集详情如表 3-2 所示, 其中列分别代表基因的数量, 调控因子的数量 (调控因子), 实验样本数和已知的相互作用数目。如果一个数据集用矩阵表示, 那么样本表示行, 基因表示列。我们采用 DREAM4 挑战赛中的 5 个多因素数据集, 每个包含 100 个基因和 100 个样本。这 5 个数据集中的样本是通过从原始数据中同时微扰动所有基因表达值, 借助于使用开源的 GeneNetWeaver 软件 [165] 生成的。因此, 这 5 个数据集中的每个样本都代表了一个多因素扰动实验。调控因子可以被

看作是自己,因为在这些小网络中并没有明确指定谁是调控因子。我们还采用了一个 DREAM5 数据集 1, 这也是一个由 GeneNetWeaver 模拟生成的网络。这个模拟网络的拓扑结构是基于模型生物的已知 GRNs。与 DREAM4 中的网络不同的是, DREAM5 数据集中的转录因子 (TFs) 是作为调控因子显式提供的, 它是提供的所有基因中一个子集。

表 3-2 Detail of the datasets

Network	#Genes	#Regulators	#Samples	#Verified interactions
DREAM4 Network 1	100	100	100	176
DREAM4 Network 2	100	100	100	249
DREAM4 Network 3	100	100	100	195
DREAM4 Network 4	100	100	100	211
DREAM4 Network 5	100	100	100	193
DREAM5 Network 1	1643	195	805	4012

3.3.2 效果评价指标

为了评估 GRN 推理算法的效果, 我们使用准确率-召回率曲线下的面积 (AUPR) 作为评价指标。除了 AUPR 之外, 受试者特性曲线下的面积 (AUROC) 也被广泛用于评估效果。一般来说, AUROC 和 AUPR 值越高, 说明 GRN 预测越准确。需要注意的是, 在稀疏的生物网络中, 不存在的边数目 (阴性边) 大大超过现有边的数量 (阳性边), 因而 AUPR 比 AUROC [126] 更有参考价值。

我们首先通过比较金标准网络中的调节边和 D3GRN 的排序列表输出前 q 条边, 计算出真阳性 (TP)、真阴性 (TN)、假阳性 (FP) 和假阴性 (FN) 边的数量。

精确度-召回曲线是通过绘制精确度 $\frac{TP}{TP+FP}$ 与召回度 $\frac{TP}{TP+FN}$ 在增加 q 的情况下构建的。 $q = 1, 2, \dots, N \times (N - 1)$, 其中 N 为基因数。通过计算曲线下的面积得到 AUPR。

3.3.3 D3GRN 的实验结果

等式 (3-5) 中基函数的类型、阶数 K 和基函数的数量 P_k 在 ARNI 中的模型分解中起着至关重要的作用。对于一大类动态系统, 使用多项式非线性是充分的 [166]。作为参考, 在我们基因调控网络的构建中, 也采用了多项式基函数, 形式为 $h_{j,p}(x_j) = x_j^p$, 基函数的数目表示为:

$$P_k = \begin{cases} 5, & k = 1 \\ 0, & k > 1 \end{cases} \quad (3-8)$$

这隐含表达了我们不考虑一个目标基因的 2 阶及以上的阶的交互作用。事实上, bLARS [152] 只考虑了一阶交互作用。我们在本研究中也遵循这种简化的方式。换句话说,其他基因对目标基因的调控是基于多项式非线性函数的混合。

D3GRN 中有两个参数,包括抽样运行的次数 b 和 ARNI 步数 L 。图 3-1 展示了通过改变 DREAM5 网络 1 的 ARNI 步数和抽样运行次数这两个参数的结果。一般来说, 较大的抽样运行次数 b 运行时间越长,但是它的性能会越趋于稳定和优异。然而,D3GRN 的性能对抽样运行次数相当稳定,只要它大于某一阈值,通常是 200 次左右。对于 ARNI 的步数 L ,一个直觉是如果 L 接近网络中先验的平均调控因子的数量,那么结果将是最佳的,可以用 $\frac{2 \times \# \text{Verified interactions}}{\# \text{Genes}}$ 估计到。

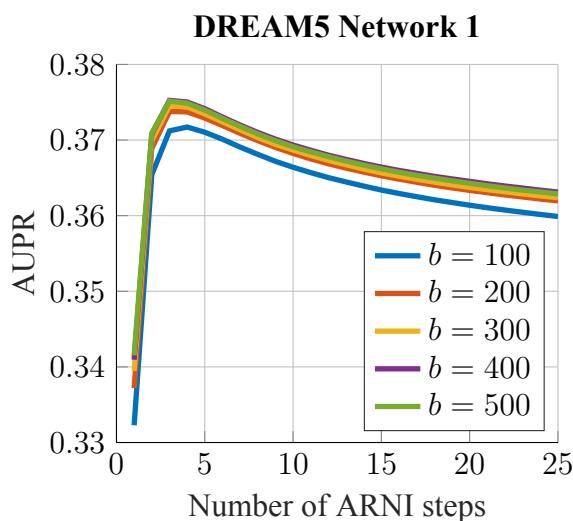


图 3-1 AUPR by varying ARNI steps L and the bootstrapping number b in DREAM5 Network 1.

我们在 DREAM4 和 DREAM5 网络进行了两次对比实验,来评测我们提出的方法 D3GRN。NIMEFI 用 R 实现,而 GENIE3、TIGRESS 和 PLSNET 用 Matlab 实现。这些方法的代码从对应论文提供的 URL 进行下载,在实验中各方法中的参数使用它们代码注释中提供的默认值。我们提出的方法 D3GRN 也是在 Matlab 中实现的,使用的数据集及代码公开在仓库 <https://github.com/chenxofhit/D3GRN> 上。

表 3-3列出了 D3GRN 与其他 GRN 推理方法在五个 DREAM4 网络上比较的结果。其中,D3GRN 的参数是在抽样数 $b = 200$, ARNI 步数 $L = 2$ 下得到的。如表所示,除了在 DREAM4 网络 2 上, D3GRN 跟其它方法相比 AUPR 值最高。

表 3-4总结了 D3GRN 与其他网络的比较结果。GRN 推理方法在 DREAM5 数据集上的应用。在参数设置为抽样数 $b = 200$ 的情况下,得到 D3GRN 的结果。网络 1 的 ARNI 步数 $L = 5$ 。D3GRN 在网络 1 上跟其它方法相比 AUPR 值也最高。

表 3-3 Performance comparisons of different GRN inference methods on the DREAM4 networks in terms of AUPR

Method	Network 1	Network 2	Network 3	Network 4	Network 5
GENIE3	0.161	0.154	0.234	0.211	0.200
TIGRESS	0.158	0.161	0.233	0.225	0.233
NIMEFI	0.157	0.157	0.248	0.225	0.241
PLSNET	0.118	0.290	0.202	0.228	0.206
D3GRN	0.175	0.136	0.253	0.255	0.247

表 3-4 Performance comparisons of different GRN inference methods on the DREAM5 Network 1 in terms of AUPR

Network	GENIE3	TIGRESS	NIMEFI	PLSNET	D3GRN
Network 1	0.291	0.302	0.298	0.270	0.373

3.4 讨论和结论

在 GRN 推理中, 假设相互作用是稀疏的结构是合理的, 特别是在“小 n 大 p ”的情况下, 即可用样本数量少, 基因数量多。实际上稀疏性约束在机器学习中被广泛考虑。在 GRN 中, 稀疏性假设意味着每个基因只有少量的调控因子, 这个假设也很合理, 本文提出的 D3GRN 方法也遵循同样的假设。我们在 DREAM4 和 DREAM5 数据集上评估了我们的方法。我们认为, 其它基因对目标基因的调控是基多项式非线性函数的混合作用。我们方法的实验结果也验证了这一假设, 至于这个假设的理论分析需要后续的工作来支持。

另一个重要问题是关于 D3GRN 的计算复杂度。客观地讲, ARNI 适合于构建单元级的小型物理动态网络。ARNI 采用的 BOLS 算法的 Moore-Penrose 伪逆运算, 对于大型生物网络来说是很耗时的。D3GRN 中采用的抽样策略使其在处理大规模 GRNs 推理时更加糟糕。关于 ARNI 的改进空间, D3GRN 中抽样策略中的“for”循环是完全可以并行的, 可以在多核甚至集群中的分布式机器上同时进行。这也值得其他方法尝试, 比如用 BOMP [161] 来替代 BOLS 算法, 这是留给未来的工作。目前最先进的算法性能的差异性表明, 没有一种算法在所有数据集上都表现得同样出色。然而, 所有这些算法都可以应用于为元算法提供输入, 利用“聚合智慧”(Wisdom of crowds) 来创建一个共识和可靠的社区网络 [167-168]。另外, 从小网络到大网络, 所有算法的性能都在下降, 这或许反映了不同规模的底层调控网络的复杂性在增加。我们的方法推进了当前的技术水平, 但要把这个问题完全解决, 还有很长的路要走。

从基因表达数据构建 GRNs 是一项重要的任务, 可以潜在地促进我们对系统生物学中疾病和癌症等基本机制的理解。最近数据驱动的动态网络构建方法为我们推断 GRNs 提供了新的可能性。在本研究中, 我们提出了一种数据驱动的动态网络构建方法来推断基因调控网络, 该方法将每个目标基因的调控关系转化为功能分解问题, 并利用揭示网络相互作用的算法 (ARNI) 来解决。然而, 传统的数据驱动的动态网络恢复方法, 如 SINDy 和 ARNI 不具备构建网络的能力。为了解决这一局限性, 我们采用和基于面积的评分策略来获得最终的 GRN。在 DREAM4 和 DREAM5 基准数据集上, D3GRN 在 AUPR 方面的表现具有竞争力。

4 一种新的单细胞稀有细胞及类型识别方法

基于液滴的转录组学技术 (Drop-Seq) 的出现, 平台已经能实现对数千或数百万细胞的并发筛选。其中一个具有挑战性的问题是如何从超大规模的 scRNA-seq 数据中识别稀有细胞及其类型。现有的寻找稀有细胞的算法非常耗时或耗费内存。本文中, 我们提出了一种高效准确的方法 DoRC (Discovery of Rare Cells)。DoRC 产生的稀有度分数可以帮助生物学家们着重于下游分析, 只对超大规模内的部分表达细胞 scRNA-seq 数据进行分析。为了在随后的下游分析的过程中区分细胞类型, 我们提出了新颖有效的细胞聚类方法 RafClust。我们使用 ~68k 人血细胞的单细胞表达谱还证明了 DoRC 在划分人类血液树突状细胞亚型方面的效果。DoRC 可以识别仿真数据集里面的稀有细胞, 并且对细胞类型特征也很敏感。

4.1 介绍

单细胞 RNA-seq (scRNA-seq) 技术提供了单细胞水平的转录组测量。使不同组织中细胞类型的鉴定和表示成为可能。相比之下, 传统的批量 RNA 测序的表达值是数千或数百万细胞的平均值, 因此存在局限性。scRNA-seq 技术的出现提供了一个从细胞水平研究生物机制的前所未有的视角, 使得研究人员更严格地处理一些生物问题, 比如组织的细胞组成、转录组的异质性, 以及细胞在发育过程中或在疾病和癌症中类型是如何变化 [169-170]。

scRNA-seq 技术的一个非常迫切和具有挑战性的应用, 是从组织中的一堆细胞中捕获稀有细胞。稀有细胞代表了生物体内的次要细胞类型, 当测序细胞的数量在数百个规模时, 即使是一个孤立的离群点 (singleton) 也值得关注。然而, 随着吞吐能力的提高, 研究重点转换到次要细胞类型的发现, 再也不仅仅是单个细胞。稀有细胞类型包括循环肿瘤细胞、癌症干细胞、循环内皮细胞、内皮祖细胞、抗原特异性 T 细胞、不变性自然杀伤性 T 细胞等。尽管丰度较低, 但稀有细胞群在决定癌症的发病机制、介导免疫反应、癌症和其他疾病的血管生成等方面起着核心作用。抗原特异性 T 细胞对免疫学记忆的形成至关重要 [171-173]。内皮祖细胞, 来源于骨髓, 已被证明是肿瘤血管生成的可靠生物标志物 [174-175]。干细胞可以替代受损细胞, 并用于治疗帕金森氏症、糖尿病、心脏病等疾病 [176]。循环肿瘤细胞提供了前所未有的洞察力, 为临床管理提供了实时线索 [177]。

由于最近发现了基于液滴的单细胞转录组学, 使得数以万计的单细胞的并行测序成为可能。单个细胞的测序成本显著降低的情况下, 稀有细胞的鉴别也变为可行。迄今为止, 已经有许多研究发表了使用的转录组, 细胞数量范围在 ~20k 和 ~70k 之间。大的转录组样本量通过削弱由于扩增阶段的失败所带来的影响, 可以更好地捕捉到组织中的微小细胞亚群。事实上, 稀有细胞检测已经成为目前下

游分析流程中的不可缺少的一环。

到目前为止, 聚焦于研究怎样去检测稀有细胞转录组的算法还很少。其中突出的方法有 RaceID [178], GiniClust [179] 和 FiRE [180]。RaceID 涉及到计算昂贵的参数模型, 并用于检测离群的表达谱值。它使用了 k -means 聚类这种典型的基于距离的方法和间隙统计计算, 作为识别大量细胞类型的中间步骤, 这些数据又反过来辅助确定离群点(基因)。另一方面, GiniClust 使用了一个相当直接的双管齐下的算法。它首先使用 Gini 指数选择信息量大的基因, 然后它应用基于密度的空间聚类应用与噪声(DBSCAN) [181], 来发现离群细胞。值得注意的是, RaceID 和 GiniClust 都使用聚类来区分主要和次要细胞类型之间。对于超大的 scRNA-seq 数据来说, 速度非常慢, 而且内存使用效率低。相比之下, FiRE 为研究中的每一个细胞表达谱计算出一个稀有度分数。它使用 Sketching 技术 [182] 来估计每个细胞的密度, 对于大量数据点的低维编码来说, FiRE 是非常强大的。对于大量的 scRNA-seq 数据, FiRE 的运行时间效率令人印象深刻。

我们提出了 DoRC, 从超大规模 scRNA-seq 数据中快速检测稀有细胞的方法。DoRC 的设计灵感来自于对稀有度估计的观察。多维空间中某一特定点, 可以看作是机器学习中的异常检测问题。据我们所知, DoRC 是第一个从超大规模 scRNA-seq 数据中发现稀有细胞的异常检测方法。在 DoRC 中, 每个细胞的稀有度用每个给定点的“异常得分”来表示。这是通过使用孤立森林 [183] 实现的。我们在多个真实和模拟数据集上对 DoRC 进行了评估。我们展示了 DoRC 在使用 ~68k 这个人血细胞的单细胞表达谱来划分人血树枝状细胞亚型。此外, 在其他两个模拟数据集上的实验显示 DoRC 可以识别仿真数据集中的稀有细胞, 并且对细胞类型特征也很敏感。我们对该方法的测试实验还表明, DoRC 是快速可扩展的的。

4.2 数据集和方法

4.2.1 数据集描述

第一个数据集 *PBMCs_68k* 由 68579 个从健康供体收集的 PBMCs 组成 [184]。11 个纯化的 PBMCs 亚群的单细胞表达谱被用作细胞类型注释的参考。该数据集可在 www.10xgenomics.com。

第二个数据集 *Jurkat_293T* 是由 Jurkat 和 293T 的两个表达谱构建的, 同样来自同一研究 [184]。Jurkat 数据集由 3258 个细胞组成, 而 293T 数据集由 2885 个细胞组成。首先, 从 293T 数据集中不放回抽样 1500 个细胞。然后, 通过从 Jurkat 数据集中取样不同数量的细胞, 产生 8 个数据集, 其中 Jurkat 细胞数分别为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、5%、10%、15%。这两个数据集的表达矩阵也可以从 www.10xgenomics.com 下载。

最后一个数据集 *Splatter_500* 是一个人工仿真 scRNA-seq 数据, 通过使用

splatter R 包 [185], 由 500 个细胞组成。与两种细胞类型: 25 个细胞是罕见的 (i.e.rare cells), 其它 475 个细胞是丰富的 (i.e. abundant cells)。在这个数据集中, 每个细胞有 5000 个基因。在 R 中我们使用下面的命令来生成这个数据集:

```
splatSimulate(group.prob = c(0.95, 0.05), method = groups,
verbose = F, batchCells = 500, de.prob = c(0.4, 0.4), out.prob
= 0, de.facLoc = 0.4, de.facScale = 0.8, nGenes = 5000)
```

4.2.2 DoRC 方法

DoRC 方法是用于从超大型 scRNA-seq 数据中发现稀有细胞, 包括几个子步骤, 如图 4-1 所示。所有子程序的细节在下文中详述。

4.2.3 数据规范化和基因选择

每个数据集上, 在至少 3 个细胞中读数超过 2 的基因被保留用于下游分析, 然后使用中位数归一化。除 *Splatter_500* 之外的其它数据集, 我们基于基于它们的相对分散度 (dispersion, 即方差/均值) 与具有相似平均表达量的基因之间的预期分散度 [184, 186] 选出 1000 个变化最大的基因。最后, 将处理后的伪数矩阵 (pseudo-count) 加 1 后进行对数变换。

4.2.4 使用孤立森林识别稀有细胞

孤立森林是一种无模型算法, 它的计算效率很高, 非常适合并行计算方法的使用 [187]。事实证明, 它在检测异常方面也是非常有效的 [188]。该算法的主要优越性在于, 它并不依赖于为数据设置一个配置文件, 以寻找不严格匹配该配置文件的样本。相反, 它利用了异常数据“少而不同”的特点。其他大多数异常检测算法都是通过了解异常数据的属性分布, 并将其从其他正常数据样本中分离出来, 从而找到异常数据 [189-191]。在孤立森林中结合树结构, 从数据中抽取子样本, 并根据数据集中随机选取的特征值进行随机切割。树枝路径越长, 那么该样本为异常样本的可能性越低; 相反, 路径越短的树枝越有可能是异常的。因此, 每个树枝的总长度可以被看作是对指定点的异常性衡量的“异常得分”。

孤立森林 [183, 192] 的算法思想同任何基于树结构的聚合方法一样, 也是在基于决策树结构之上的。在训练时, 给定一个维度为 N 的数据集, 该算法选择一个随机的数据子样本来构建一棵二叉树。树的分支过程通过选择一个随机维度 x_i , 也就是一个单一的变量或特征来进行, 其中 $i \in 1, 2, \dots, N$ 。如果一个给定的数据点在维度 x_i 的值小于 v , v 是该维度中最小值和最大值内的随机值, 那么这个点就会被送到左分支; 否则, 就会走到右分支。通过这种方式, 树节点当前的数据被分割成两个子数据集。这个分支过程在数据集上递归执行, 直到一个点被隔离, 或者达到预定的深度限制。这个过程再次开始, 用一个新的随机子样本来建立另一棵

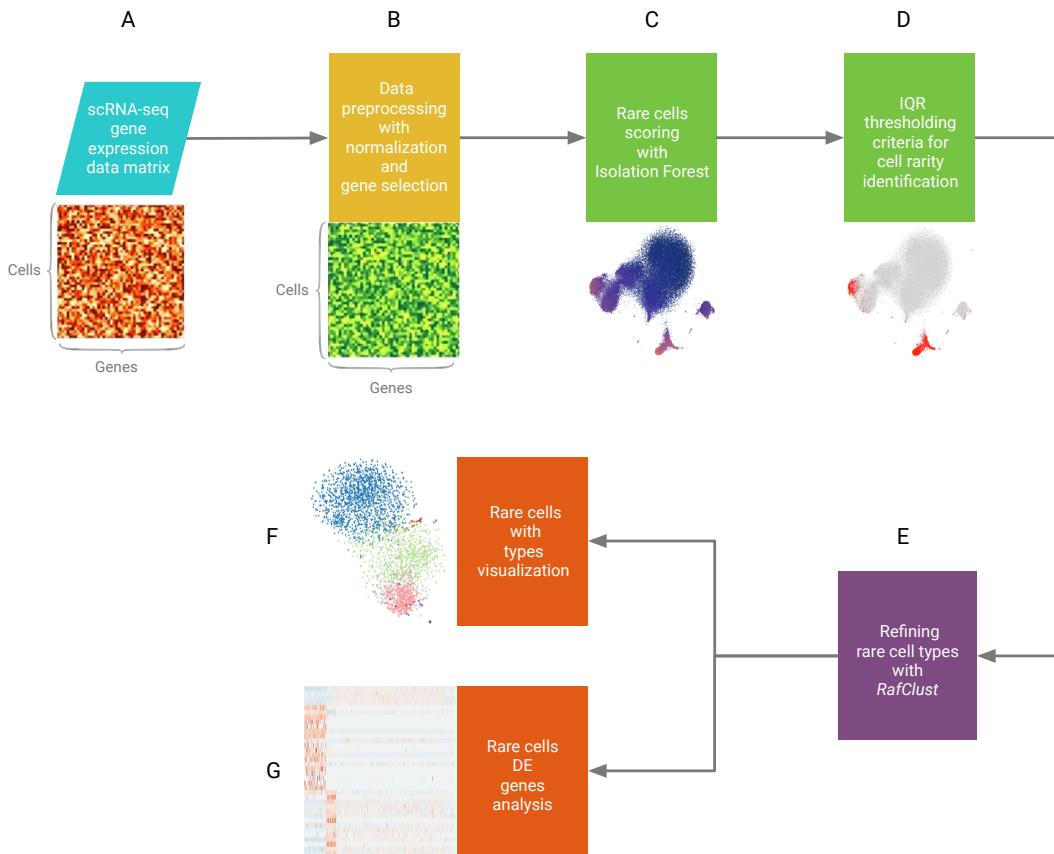


图 4-1 DoRC flowchart. The flowchart illustrates the processes of our proposed DoRC method for rare cells detection from ultra-large scRNA-seq data. Each annotated vignette in this figure represents the input or output visualization for the corresponding procedure. (A) The input is the scRNA-seq expression data 2D-matrix, whose row stands for cells, column for genes, respectively. (B) Data preprocessing with the input expression data, the output is a normalized and the column dimension reduced matrix. (C-D) Rare cells discovery with Isolation Forest, which are the workhorse procedures of DoRC. (C) Rare cells scoring with Isolation Forest, the output is a list of continuous anomaly scores for all the cells. The scores can be visualized in the t-SNE-based 2D plot of the dataset; (D) IQR thresholding criteria for cell rarity identification, the binary annotations are also visualized in the t-SNE-based 2D plot. (E) Refining rare cell types with RafClust. Notably, this sub-procedure is optional if we do not care about the types of rare cells. (F) Rare cells with types visualization, different colors represent different rare cell types in the t-SNE-based 2D plot of the rare cells. (G) Different expression genes analysis with different types of rare cells, the cell type specific genes are consequently obtained.

随机化树。在建立一个大的树的集合后，也就是一片森林，训练的过程就完成了。在评分步骤中，新的候选数据点或用于创建树的现有数据点贯穿所有树。根据指定点在每棵树中达到的深度，聚合的异常得分的计算方法是：

$$s(x, n) = 2^{-E(h(x))/c(n)} \quad (4-1)$$

其中， $E(h(x))$ 是单个数据点 x 在所有树中达到的深度的平均值， $h(x)$ 代表 x 在树中的深度（高度）。 $c(n)$ 是归一化因子，定义为二叉搜索树（BST）中搜索失败的平均深度。

$$c(n) = 2H(n - 1) - (2(n - 1)/n) \quad (4-2)$$

其中 $H(i)$ 为谐波数, 可由 $\ln(i) + 0.5772156649$ (欧拉常数) [192] 估计, n 为建树时所用的点数。 $s(x, n)$ 的值接近 1 表示异常, 远小于 0.5 表示正常观测值。我们在这里使用的参数默认值与 [183, 192] 一样, 即在所有实验中子样本数据为 256, 树的集合数目为 100。

虽然连续的异常得分是很有帮助的, 但有时关于细胞稀有度的二进制注释可以极大地简化分析管道。因此, 如果一个细胞的 DoRC 得分, 即聚合异常得分, 大于 $q_3 + 1.5 \times IQR$, 则 DoRC 将其标记为罕见, 其中 q_3 和 IQR 分别表示所有细胞中 DoRC 分数的第三分位数和四分位数范围 (第 75 百分位数 – 第 25 百分位数)。

4.2.5 使用 RafClust 确定细胞类型

为了从稀有细胞集合中确认不同的细胞类型, 我们提出了一种无监督的基于随机森林的相似性学习算法, 命名为 RafClust。

类似于其它的许多方法 [193-199], RafClust 也是两个步骤的方法, 第一个步骤是我们使用随机森林进行相似度学习 (相似性学习步骤), 在第二步骤中我们使用层次聚类 (聚类步骤)。在相似度学习步骤中, 一个非常关键的预处理程序是特征矩阵的构建。我们假设归一化的 n 细胞的基因表达数据 (观测值) 和 p 的基因 (特征), 组成成一个 $n \times p$ 的表达式矩阵 $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)^T$ 。其中 x_i 表示 p 基因在细胞 i 中的表达。 $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})$ 。矩阵 X 在加上 1 的伪数后进行对数变换。 $X' = \log_2(X + 1)$ 。然后, 如果基因在所有细胞中的平均累积表达量低于一个预定义的分数 β , 则会被删除。默认情况下, β 设置为 0.06。基因过滤的动机是, 除了保守的基因外, 其它一些很普通的基因往往对聚类没有参考价值。基因过滤这一步骤是可选的, 如果基因本身都是高表达的, 这个步骤可以跳过。稀有细胞与丰富细胞不同, 我们打算选择更多不同类型的细胞和细胞的相似性来充分刻画它们的本性特征。因此, 在基于基因过滤后的表达矩阵 X' 上, 我们利用欧几里德 (Euclidean)、皮尔逊 (Pearson) 和斯皮尔曼 (Spearman) 指标分别计算出三种不同的细胞-细胞距离矩阵 $\{C_1, C_2, C_3\}$ 。然后将 PCA 应用于每个距离矩阵, 也用 X' , 来减少数据维度的同时也去除其本能噪声。每个矩阵中信息量最大的成分由 “elbow 法” [200] 保留。这就产生了四个 $\{F_i \in \mathbb{R}^{n \times m_i}\}_{i=0}^3$ 矩阵。最终的人工指定的特征矩阵 F 由这些矩阵并列拼接组成。

$$F = (F_0, F_1, F_2, F_3) \quad (4-3)$$

F 中的列数 (维度) (即特征总数 $\tilde{p} = \sum_{i=1}^k m_i$) 与数据有关。和细胞 j 现在用特征向量 $f_i \in \mathbb{R}^{\tilde{p}}$ 表示。 F 是这样得到的, 对于每个细胞, 其自身表达值和与其他细胞的相似性关系都被表示出来。接着, 利用特征矩阵 F 来进行基于随机森林 (RF) 的相似性学习。举一个例子, 在 15×15 基因表达矩阵的数据集上来说明整个特征矩阵的构建步骤如图 4-2 所示。

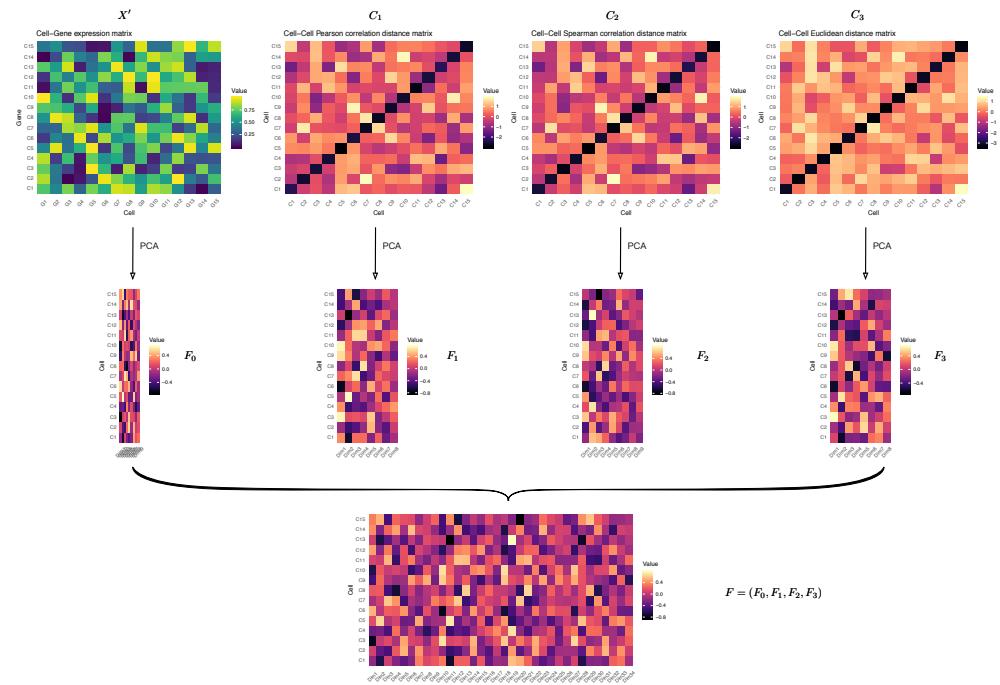


图 4-2 Illustration of the hand-crafted feature matrix construction in a toy dataset with 15 cells and 15 genes. The final feature matrix F is in a 15×34 shape in this case

RF (随机森林,Random Forest) 是一种应用非常广泛的基于决策树的分类和回归方法 [201]。另外,它也可以用无监督的方式来推断对象之间的相似性 [194, 202-203]。另外,基于 RF 的相似性学习很容易适应于并行计算,对离群值的鲁棒性,内在具有特征选择的特性,这些特点特别适合用来分析高维和噪声数据,特别是像单细胞 RNA 测序图谱。我们按照以下步骤来学习细胞-细胞的相似性。在选择一个单一的特征 j (特征矩阵 F 中的第 j 列) 后,我们使用围绕质心点的分区,并估计类别的数量,如由 R 包中的 *pamk* 函数 *fpc* [204] 来获取该特征 j 的向量中的类标签。然后,我们从 F 中去掉第 j 列,并且使用 RF 分类器对缩减后的数据集 F_{-j} 进行类别的标签学习。让 f_p 表示 F_{-j} 的第 p 行,如果 RF 分类器包含 N 树,并定义 $nt(f_p, f_q)$,作为通过同一片叶子对细胞 f_p 和 f_q 进行分类的树的数量。基于 RF 的 $n \times n$ 相似度矩阵 S_j 是通过以下方式定义: $S_{j_{pq}} = nt(f_p, f_q)/N, 1 \leq p, q \leq n$ 。我们使用 R 包 [205],其默认森林大小为 500 棵,即 $N = 500$ 。对所有的 \tilde{p} 特征重复这个过程,得到 \tilde{p} 相似度矩阵 $S_j, j = 1, 2, \dots, \tilde{p}$ 。通过对所有 S_j 进行平均,得到最终的细胞-细胞相似度矩阵 S ,并通过 $D = 1 - S$ 得到异质矩阵 D 。

接下来,对异质矩阵 D , 使用平均联结分层聚类来对细胞进行分组。要对树枝图进行切割,可以使用 *cutreeDynamic* 函数。是使用了来自 *dynamicTreeCut* 的 R 包 [206-207] 自动确定细胞的类别,并为每个细胞分配正确的类标签。另外,我们还提供了使用 *dynamicTreeCut* R 包中的 *cutree* 函数来支持用户自定义细胞的类别数。

RafClust 旨在围绕细胞的类型或子类型的发现或表征。在本研究中,应用 DoRC 的一个子程序 RafClust 来解决稀有细胞的异质性。但实际上,它可以适应一般的单细胞聚类问题。它是一种纯粹的无模型和数据驱动的方法,不需要其他的先验信息,如细胞或基因的群体结构、通路信息。实验表明,RafClust 与其它知名的单细胞聚类方法相比具有一定的优越性。

RafClust R 包可在 <https://github.com/chenxofhit/RafClust> 免费下载和使用。

4.2.6 差异基因分析

在至少 2 个细胞中表达数超过 3 的基因被考虑进行后续分析。我们使用 NODES [208] 这一快速的非参数化、差异化表达 (DE) 分析工具进行 DE 基因分析。以 0.05 作为假发现率 (FDR) 的阈值, 阈值的倍数变化为 log2(5)。在 DE 基因中, 在特定类中相对于其余各类显著上调的基因被命名为细胞类型特异基因。

4.2.7 调整后的 Rand 指数和 F1 得分

聚类的效果是使用真实的类别标签 L_T 和估计的类别标签 L_E 之间的相似性来衡量, 使用的是调整后的 Rand 指数 [209-210]:

$$ARI(L_E, L_T) = \frac{\sum_{e,t} \binom{n_{et}}{2} - [\sum_e \binom{n_e}{2} \sum_t \binom{n_t}{2}] / \binom{n}{2}}{\frac{1}{2} [\sum_e \binom{n_e}{2} + \sum_t \binom{n_t}{2}] - [\sum_e \binom{n_e}{2} \sum_t \binom{n_t}{2}] / \binom{n}{2}} \quad (4-4)$$

其中 n 是单细胞的总个数, n_e 和 n_t 分别是估计的类别 e 和真实的类别 t 中的单细胞数目; 并且 n_{et} 是估计的类别 e 和真实的类别 t 共享的单细胞的数目。

ARI 的范围是 -1 到 1, 其中 1 表示估计的聚类与真实的聚类完全相同。ARI 值越高, 聚类算法的预测能力越强。

在两类实验中, 直接构建一个混淆矩阵, 其数字为真阳性 (TP)、假阳性 (FP)、真阴性 (TN)、假阴性 (FN)。混淆矩阵上的精确性、召回率和 F1-score 可以很容易地计算如下:

$$\text{Precision} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}} \quad (4-5)$$

$$\text{Recall} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \quad (4-6)$$

$$\text{F1-score} = 2 \times \frac{\text{Precision} \times \text{Recall}}{\text{Precision} + \text{Recall}} \quad (4-7)$$

在模拟实验中, 对于其 DoRC 分数满足 IQR 阈值的标准的被认定为是稀有细胞。对于实验中采用的 Jurkat93T 数据集, 计算出 Jurkat 细胞的 F1 分数。

4.3 实验结果

4.3.1 DoRC 概览

RaceID 和 GiniClust 都依靠无监督聚类来检测稀有细胞。RaceID 中的 k -means 聚类是基于距离的, 而 GiniClust 中的 DBSCAN 聚类是基于密度的。它们都属于基于近似的方法进行离群点检测。基于近似的方法假设一个离群物体与其最近邻居的接近程度与该物体与数据集中大多数其他物体的接近程度有很大的差异。聚类通常取决于一些敏感参数且工作效率低下, 因为不同分布的数据点之间的近似度不同。另一个主要问题是决定群体身份的解析。一般来说, 多级聚类变得至关重要, 因为次要的类经常在第一次筛选就被忽略 [211]。发生这种情况是因为其他主要细胞类型会影响数据集中的表达差异, 特别是在处理大型 scRNA-seq 数据集时, 情况变得更加糟糕。

为了解决上述问题, 我们提出了发现稀有细胞 (DoRC), 这是一种从超大规模 scRNA-seq 数据中检测稀有细胞的非常快速的方法。DoRC 的设计灵感来自于稀有细胞往往是“少而不同”的观察, 其中容易受到一种叫做孤立的机制影响。孤立森林可以充分捕捉稀有细胞的特征, 其中, 每个细胞的稀有性是以树枝的聚合长度为特征的。一个细胞的长度越长, 该细胞与其他细胞区分的因素就越多, 它成为稀有细胞的可能性就越大。从数量上看, 孤立森林中的聚合异常分数具有本质上的稀有特征。这为我们提供了自由度来调查和进一步决定细胞的稀有性。为了说明这一点, 我们将 DoRC 应用于包含 ~68k 外周血单核细胞的 scRNA-seq 数据集 (PBMCs) 的注释进行比对, 这个数据集是知名的纯化的免疫细胞亚型数据集 [184]。他们首先对细胞进行了无监督聚类, 然后根据之前已知的标记对类进行注释 (图 4-3 A)。我们将 DoRC 的分数叠加在这一个小范围研究的二维图上 (图 4-3 B)。最高 0.1% 的 DoRC 分数对应的是最小的, 清楚地注释了含有巨核细胞的 CD34+ 类别 (图 4-4 A)。据报道, 巨核细胞只含有整个剖析细胞的 0.3% [184]。然后, 我们将这一比例从 0.1% 增加到 1.0%, 随后又增加到 3.0%, 下一批次的细胞亚型被选入扩展的稀有细胞集合中。这些细胞包括单核细胞和树突状细胞亚型的亚类 (图 4-4 B-C)。这个案例研究展示了 DoRC 在检测不同比例的稀有细胞方面的表现。

虽然连续的分数是有意义的, 有时候细胞稀有性的二元标注有助于后续的简化分析。为了解决这个问题, 我们引入了一个基于分数分布特性的阈值方法。4-3 C 突出了 ~68k PBMC 数据中检测到的细胞。作为稀有细胞的基于阈值的二分法, 正如预期的那样, 大部分检测到的稀有细胞来源于已知的次要细胞类型, 包括巨核细胞、树状细胞和单核细胞, 即分别是 CD34+、树突状和 CD14+ 单核细胞在 4-3 A。

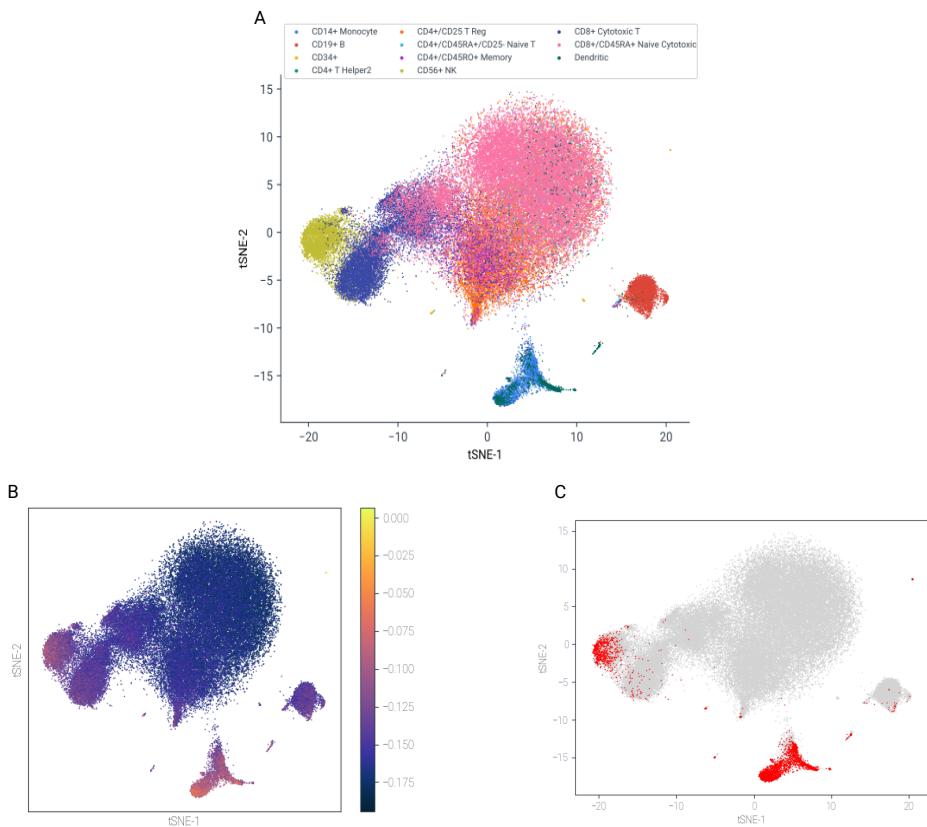


图 4-3 Performance evaluation of DoRC on PBMCs_68k. (A) t-SNE based 2D embedding of the data with color-marked cluster identities as reported by Zheng et al. [184]. (B) Heat map of DoRC scores for the cells on PBMCs_68k. The cluster of megakaryocytes (0.3%), the rarest of all the cell types are assigned the highest DoRC scores. (C) Rare cells identified by DoRC using IQR-thresholding-criteria

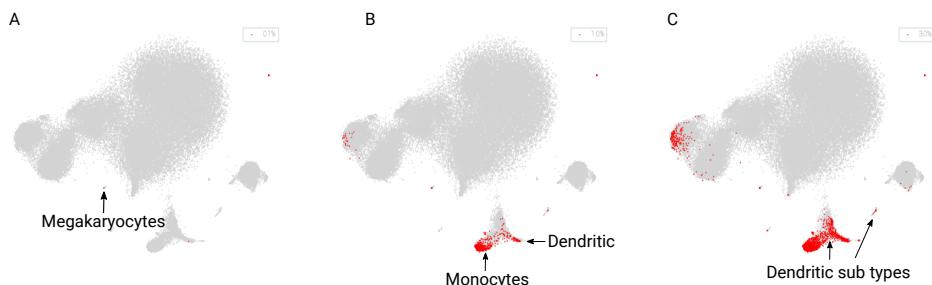


图 4-4 DoRC discovers cells with varying degrees of rarity. In the ~68k PBMC data [184], minor cell populations with different grades of rarity show up with an increase in the number of selected rare cells. (A-C) The top 0.1, 1.0 and 3.0% cells, respectively, selected on the basis of DoRC scores are highlighted

4.3.2 RafClust 提高了 scRNA-seq 数据的聚类效果

在本文提出的 RafClust 是为了区分稀有细胞的不同种类。实际上, 该方法对于任何一般的单细胞聚类都是可行的。因此, 为了验证 RafClust 在更一般情况下的性能, 我们将其应用在十个知名的 scRNA-seq 数据集上, 这些 scRNA-seq 数据集从小规模到中等规模不等。每个数据集以第一作者的姓氏命名如下: Biase [212],

Treutlein [213], *Pollen* [214], *Kolod* [215], *Usoskin* [216], *Zeisel* [217], *Darmanis* [218], *Tasic* [219], *Goolam* [220], *Li* [221] (4-1)。我们还将其结果 ARI 与其他六种基准方法进行比较, 包括 RaceID2 [222], CIDR [223], SIMLR [224], SAFE [225], RtsneK-means [226-228], RAFSIL [194]。这六种聚类方法均以 R 包的形式实现并公开了代码, 其概述见表 4-2 所示。通过将每种方法的聚类结果与每个基准数据集的细胞类型注释进行比较, 计算出对应的 ARI 值。实验在每个数据集上对每个方法重复 5 次, 结果中位数的 ARI 值如图 4-5 所示, 由图 4-5 可知, RafClust 在 ARI 上优于其他六种方法。我们还记录了每个方法在每个数据集上的执行时间, 并将平均执行时间与其他基准方法进行比较, 结果如图 4-6 所示。由图 4-6 可知, RafClust 针对数据规模从小型到中型的 scRNA-seq 数据在计算效率上是可以接受的。

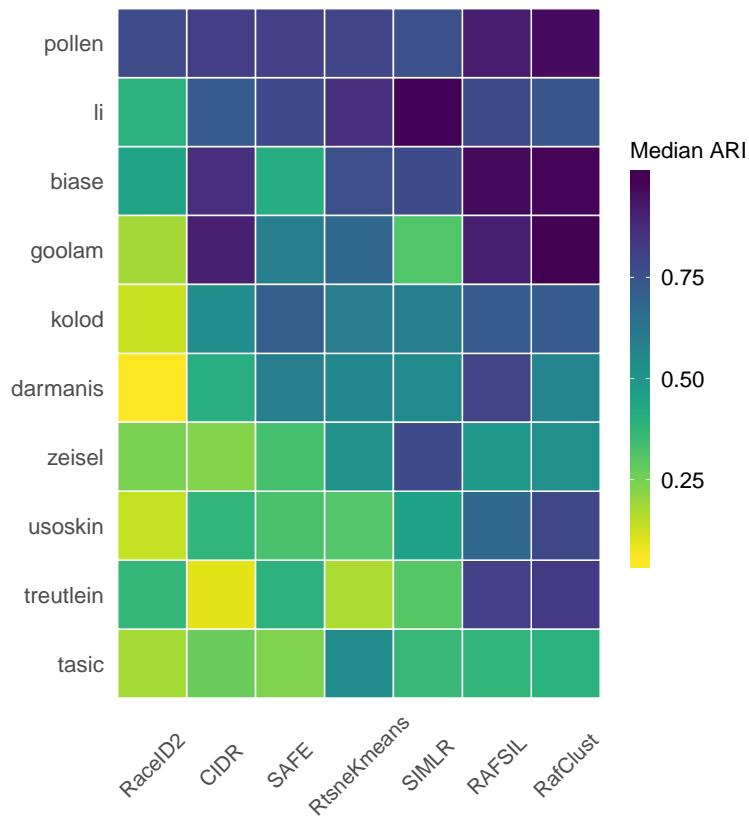


图 4-5 Median ARI across different runs on the same dataset for the methods

4.3.3 DoRC 揭示了树突状细胞之间的异质性

树突状细胞 (DC) 在感知、吞噬和抗原监视 [229] 方面起着至关重要的作用。DCs 是最罕见的免疫细胞类型之一, 构成约 0.5% 的 PBMCs [184]。Villani [229] 的研究划分了六种不同的树突状细胞的亚型。通过荧光激活细胞分选 (FACS) 分析树突状细胞的表达, 分选的 DCs 和单核细胞的情况图。他们在研究中报告的 DC 亚型如下: $CD141^+$ DCs (DC1), $CD1C^+_A$ 常规 DCs (DC2), $CD1C^+_B$ 常规 DCs (DC3),

表 4-1 Overview of the benchmark datasets for the clustering performance comparison of RafClust with the other competing methods

Dataset	Accession	Sequencing protocol	Units	#Cells	#Genes	#Populations	References
Biase	GSE57249	SMARTer	FPKM	56	25 734	5	[212]
Treutlein	GSE52583	SMARTer	FPKM	80	23 271	5	[213]
Pollen	SRP041736	SMARTer	TPM	301	23 730	11	[214]
Kolod	E-MTAB-2600	SMARTer	CPM	704	38 616	3	[215]
Usoskin	GSE59739	STRT-Seq	RPM	622	25 334	11	[216]
Zeisel	GSE60361	STRT-Seq	UMI	3 005	19 972	9	[217]
Darmanis	GSE67835	SMARTer	CPM	466	22 088	9	[218]
Tasic	GSE71585	SMARTer	RPKM	1 679	24 057	18	[219]
Goolam	E-MTAB-3321	Smart-Seq2	CPM	124	41 480	5	[220]
Li	GSE81861	SMARTer	CPM	561	55 186	9	[221]

Note: These ten publicly available datasets are used as the benchmark datasets in this study.

Seven of them are from GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>):

GSE57249, GSE52583, GSE59739, GSE67835, GSE71585, GSE81861; two of them are from ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>): E-MTAB-2600, E-MTAB-3321; and the last one is from SRA (Sequence Read Archive,

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>): SRP041736. Each dataset is named as the first author's surname. If two or more files are available in different units, we only download the file in the corresponding unit shown in the "Units" column. The numbers of cells, genes, and populations delivered in each dataset are also summarized in this table. These ten datasets are also available in <https://hemberg-lab.github.io/scRNA.seq.datasets>, which contains a collection of publicly available datasets in this field.

表 4-2 Overview of the benchmark clustering methods

Method	Description	Reference
CIDR (v0.1.5)	PCA dimension reduction based on zero-imputed similarities, followed by hierarchical clustering	[223]
RaceID2 (March 3, 2017 version)	K-medoids clustering based on Pearson correlation dissimilarities	[222]
RtsneKmeans	t-SNE dimension reduction (initial PCA dim=50, t-SNE dim=3, perplexity=30) and K-means clustering with 25 random starts	[226-228]
SAFE (v2.1.0)	Ensemble clustering using SC3, CIDR, Seurat and t-SNE + Kmeans	[225]
SIMLR	An appropriate cell to cell distance metric by multi-kernel learning, followed by spectral clustering	[224]
RAFSIL	Random forest based cell to cell similiy learning, followed by Kmeans or hierarchical clustering	[194]

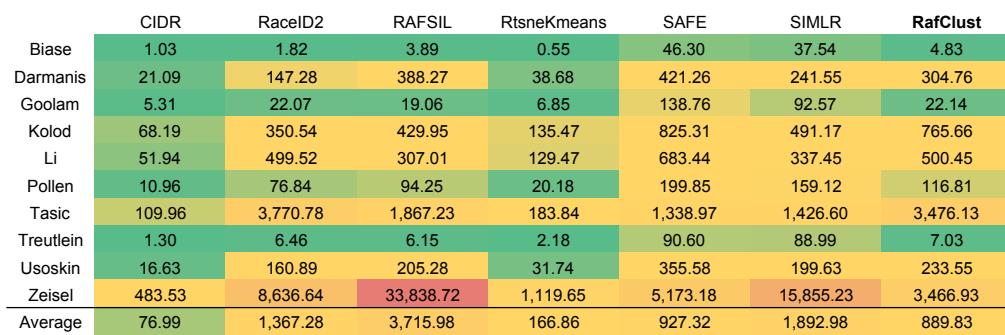


图 4-6 Median execution time details (in seconds) across different runs for each dataset with the benchmark methods. The time measurements were taken on a workstation that running GNU Linux/Ubuntu 16.04 operating system with 4.15.0-46-generic kernel with the following hardware configuration: Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2630 v4 @ 2.20GHz with 40 cores and 256 GB of RAM.

CD1C⁻CD141⁻ (DC4), DC5 和浆细胞 DCs (DC6, pDCs)。

我们很好奇树突状细胞亚型是否可以在 PBMCs 数据中被识别。首先, 我们在~68k PBMCs 数据集上应用 DoRC。DoRC 通过使用基于 IQR 的二分法, 共发现了 3844 个稀有细胞。然后通过 RafClust 对稀有细胞进行聚类(见 4.2.5), 得到 12 个子类别。在这 12 个可区分的聚类中 (C0-C11), C4、C5、C9 和 C11 完全由树枝状细胞组成, 根据 Zheng 等人提供 [184] 的注释, 如图 4-7 A-C 所示。对于这 4 个 DC 类别, 我们进行差异表达分析, 找出细胞类型特异性基因(见 4.2.6)。共有 21 个基因被检测为细胞类型特异性基因, 使用截止 $\log_2(1.5)$ 的 FC (fold change)。通过将我们的差异基因与 Villani [229] 报道的基因进行叠加。我们可以有信心地解析 6 个亚型中的 5 个 (DC1、DC2、DC4、DC6) (图 4-7 D、表 4-3)。从 [229] 可以看出, DC5 是未解决的, 因为该类型是新分离的罕见类型。在基于 t 分布的随机邻域嵌入 (t-SNE) 的二维嵌入图中, DC3 与 DC2 属于同一类 [227]。在 DoRC 检测到的稀有细胞上进行 RafClust 聚类, 不能完全划分出树突状细胞亚型正确的数量。然而, 在最初 [184] 的研究中, DC1 和 DC4 并没有被无监督聚类解决。事实上, 在 t-SNE 图中 [184], 这些细胞类型在视觉上共同聚集在自身或单核细胞内。

表 4-3 The dendritic cell types correspond to class types reported by Villani [229]

Class type	Marker gene(s)	Corresponding class type
C4	ANXA2, BLVRB, FCER1A , LGALS1	DC2
C5	CLIC3, GPX1, GZMB , IGJ , IL3RA , IRF7 , LRRC26, MS4A6A, MYBL2, PLA2G16, PLAC8, PTGDS, RPL13, SCT, SMIM5, SNORD3D, TCL1A, TPM2	DC6
C9	B2M, CCL5, CTSS, FCN1, FTH1, FTL , GNLY, HLA-B, IFI30, IFITM3 , LST1 , NKG7, S100A11, SAT1	DC4
C11	CD74, HLA-DPB1	DC1

Note: Those genes marked in bold are acting as marker genes in the corresponding class type.

4.3.4 DoRC 能够识别人工伪造的稀有细胞

我们设计了一个模拟实验来评估 DoRC 关于细胞类型识别相关的事实真实信息的性能。我们使用了一个 scRNA-seq 数据集 Jurkat_293T, 由 293T 和 Jurkat 细胞在体外以不同比例混合组成(见节 4.2.1)。作者利用每个细胞的单核苷酸变异(SNV) 谱来确定其系谱。我们认为这种基于基因型的注释方案接近于事实。

随着 Jurkat (稀有) 细胞在所有细胞中的占比变化, 比例从 0.5% 到 15%, 我们得到八个数据集。对于每个数据集, F1-score 是用通过 DoRC 评分和 IQR 阈值标准确定预测标签, 然后与两个类的真实标签对照计算。重复这个过程 100 次, 可以得到该数据集的 F1 分数的标准差。标准差反映了该方法识别人工伪造的稀有细胞的稳定性(图 4-8 A)。F1-score 反映了精度和灵敏度之间的平衡。当稀有比处于低水平时, 即 0.5% 和 1% 时, DoRC 无法匹配 FiRE。但是, 当稀有率从 1.5% 增加

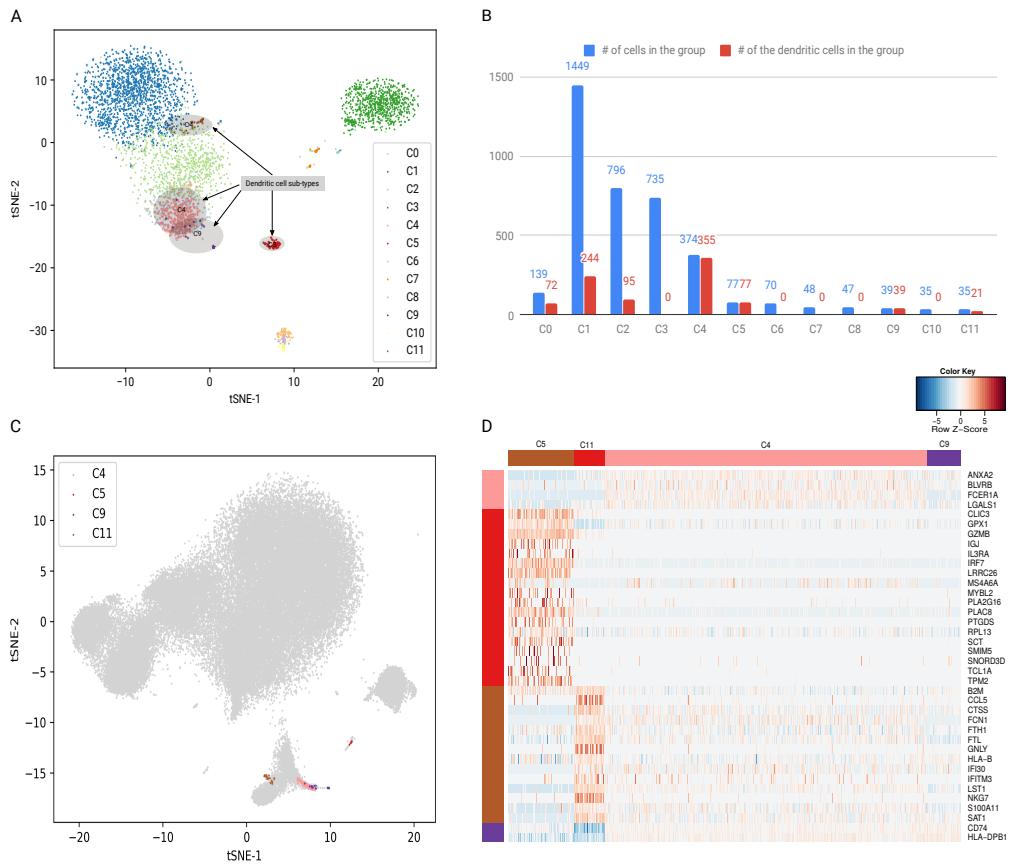


图 4-7 Human blood dendritic cell heterogeneity delineated by DoRC. (A) DoRC detected rare cells are clustering into 12 sub types with RafClust, i.e. C0 (a singleton class), C1, ..., C11. With the annotation given by [184], C4, C5, C9, C11 are mostly dendritic cells sub types. Dots with the same color represent one subpopulation by clustering the rare cells with RafClust. For each subpopulation, the cells annotated with asterisks marking are also dendritic cells according to the annotation given by [184]. (B) The cells number for each subpopulation and the number of dendritic cells in this group. Apparently, dendritic cells hold the majority of the subpopulation in C4, C5, C9, C11. (C) These four dendritic sub-types cells are highlighted on the *PBMCs_68k* dataset t-SNE-based 2D plot. (D) Characterization of dendritic cell sub-types utilizing markers obtained from DE analysis (See 4.2.6)

到 15% 时 DoRC 的性能优于 FiRE。此外,FiRE 的性能在 15% 的罕见比例下急剧下降,但是 DoRC 更保守,性能损失较小。

我们仔细研究一下在稀有细胞占比为 2.5% 时的细节。从 100 个生成的数据集中随机选取了一个有 1539 个细胞的混合数据集,作为基准数据集。39 个稀有细胞和 1500 个丰富细胞非常清晰地聚成两组(图 4-8 B)。在这两种方法中,稀有细胞的得分都毫不含糊地高于丰富细胞类型(图 4-8 C-D)。与每个方法得到的二元注释(图 4-8 E-F),DoRC 的表现优于 FiRE,因为它有能力来检测更多的稀有细胞(图 4-8 G-H)。

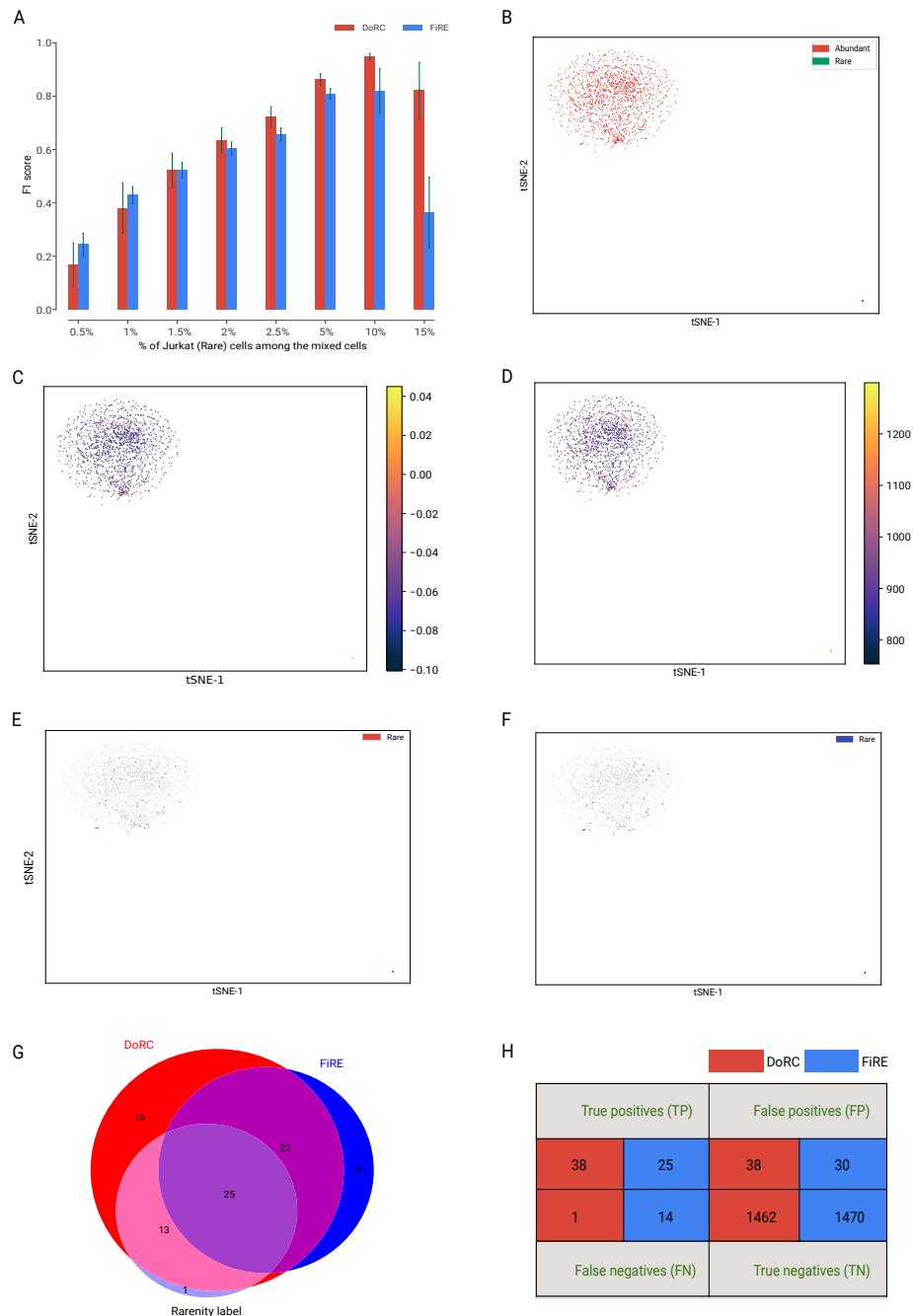


图 4-8 Detectability of minor cell types in a simulated dataset consisting of Jurkat and 293T cells. (A) The F1-scores are calculated w.r.t. the rare (Jurkat) population for DoRC and FiRE, while bioinformatically varying the proportion of artificially planted rare cells. (B) The t-SNE-based 2D embedding of the cells with color-coded identities of the benchmark dataset. (C-D) DoRC and FiRE score intensities plotted on the t-SNE-based 2D map, respectively. (E-F) The rare cells detected by DoRC and FiRE, respectively, are highlighted. (G) DoRC, FiRE detected rare cells and true rare cells overlap with each other, shown in this Venn diagram. (H) Detail of the confusion matrices with TP, FP, FN, TN prediction metrics for DoRC and FiRE.

4.3.5 DoRC 对细胞类型敏感

我们设计了一项模拟研究来分析 DoRC 评分的鲁棒性和敏感性与差异表达基因数量的关系。我们首先生成一个由 500 个两种细胞类型组成的人工 scRNA-seq 数据。数量小的细胞类型约占细胞的 5 (见节 4.2.1)。我们将通过严格的标准选择的差异表达 (DE) 基因保留在一边。对于每次实验的迭代, 我们将预先确定的 DE 基因附加到固定数量的非 DE 基因上。我们在 1 和 150 之间改变差异表达基因的计数, 以跟踪 DoRC 在检测规模小的类别细胞的敏感性。随着给定的 DE 基因集合, 计算获得 DoRC 分数, 并对小类别细胞进行计算受试者测试工作曲线 (ROC) 下面积 (AUC)。对于每一种数量的 DE 基因, 上述过程重复 1000 次。汇总后的平均 AUC, 以及所有的 AUC 的标准差如图 4-9 中所示。随着 DE 基因数量的减少, DoRC 难以检测到次要细胞群。然而, 当引入 20 个或更多的 DE 基因时, DoRC 的预测率急剧提升。同时, 随着偏差变小, 预测变得更加稳定。另外从给出的 t-SNE 图来看, 由于 DE 基因的增加, 两类细胞能够更加直观地区分出来。这个实验反应了 DoRC 对噪声的鲁棒性。

此外, 由于 DoRC 和 FiRE 都可以给一个细胞做二元标注, 我们对其性能差异感到好奇。在这个数据集中, 我们考虑了 DoRC 和 FiRE 之间的 AUC、召回率、精度和 F1-score。由于 F1-score 取决于召回率和精度, 我们也包括这两个指标作为参考。把细胞类型标注为真实标签,AUC 是用 DoRC 评分计算的。而 F1-score 是用 DoRC 评分产生的稀有度标注与 IQR 阈值标准获得的。在总共 25 个稀有细胞中, DoRC 和 FiRE 都能正确检测出 23 个相同的稀有细胞。DoRC 可以检测到其他 2 个稀有细胞和 1 个假阳性稀有细胞, 而 FiRE 未能识别出左边 2 个稀有细胞 (图 4-10A)。在这个数据集中, 阳性样品 (丰富细胞) 和阴性样品 (稀有细胞) 的数量是不平衡的。这两种方法的 AUC 和精度基本没有变化, 但 DoRC 的召回率和 F1-score 均高于 FiRE (图 4-10B)。

4.3.6 DoRC 是可扩展和快速的

DoRC 的核心算法孤立森林(Isolation Forest)的时间复杂度为 $O(nt\log\psi)$ [183]。其中 n 、 t 和 ψ 分别代表样本数、树的数目和每棵树的子样本数。值得注意的是, DoRC 中的 Isolation Forest 在这种情况下没有训练的阶段。该方法的参数我们使用默认值, t 设置为 100, ψ 设置为 256。因此, DoRC 的时间复杂度为 $O(n)$ 。Raf-Clust 的稀有细胞类型细化的复杂性没有考虑。因为如果不需要稀有细胞的类型, 这个步骤是可选的, FiRE 和 LOF 这两种方法中也没有包含这个步骤。

我们改变输入数据大小, 统计了 DoRC、FiRE、GiniClust、LOF [230] 和 RaceID 所花费的时间, 如图 4-11 所示。测试机器为一台运行 GNU Linux/Ubuntu 16.04 操作系统 4.15.0-47-generic 内核的工作站上, 硬件配置如下: Intel(R) Xeon(R) Silver

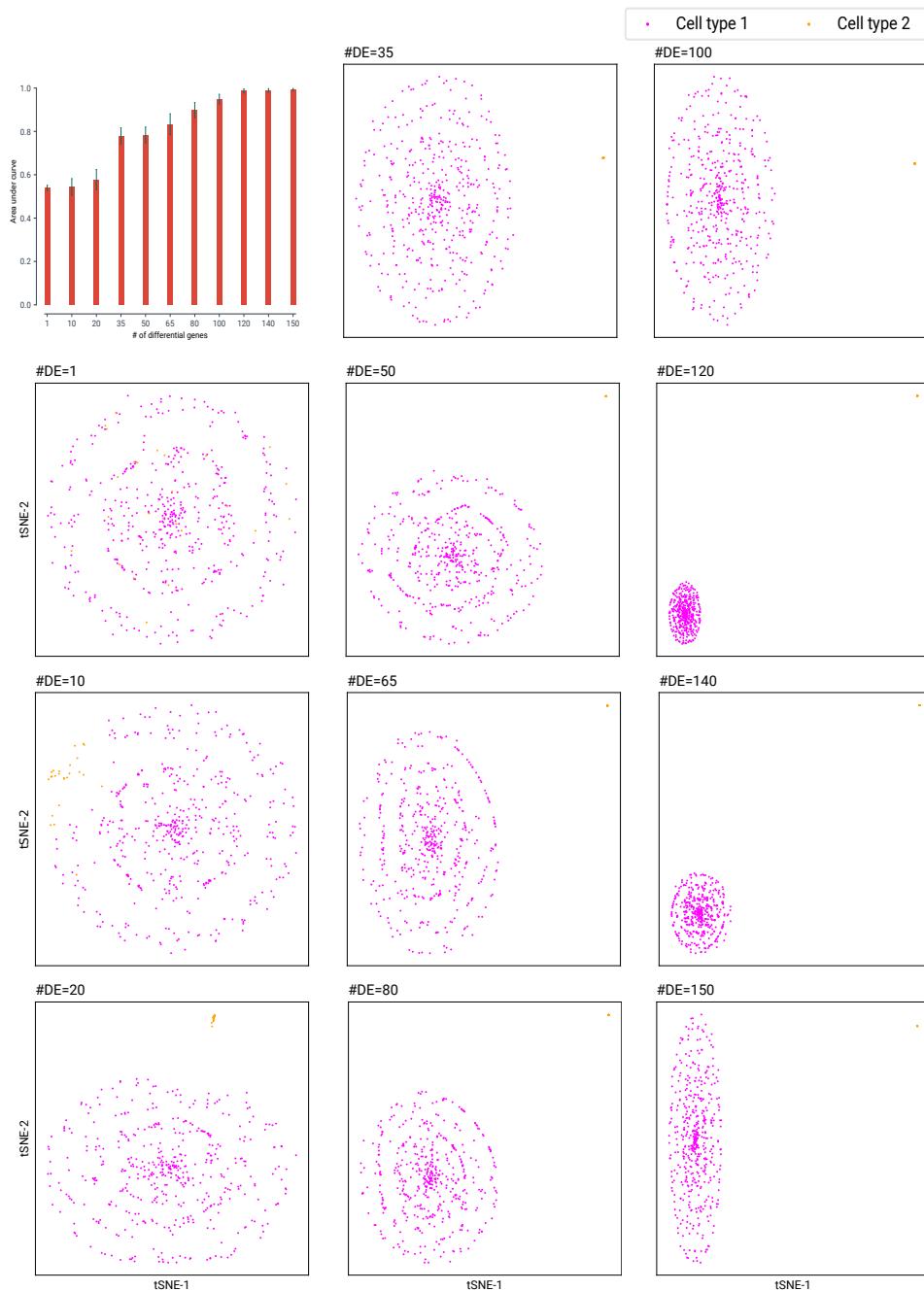


图 4-9 The sensitivity of DoRC to cell-type identities. On the scRNA-seq dataset *Splatter_500*, DoRC starts with recognizing the minor cell type correctly, as soon as the number of differentially expressed genes becomes adequate to give rise to a tiny cluster representing the minor cell subpopulation. The top-left corner figure serves as a legend for the subsequent AUC plots. Each t-SNE and ROC plot pair serves as a representative of the 1000 repetitions of the experiment concerning a specific number of differentially expressed genes. The AUC analysis is performed using cell-type annotations, and DoRC scores are assigned to individual cells.

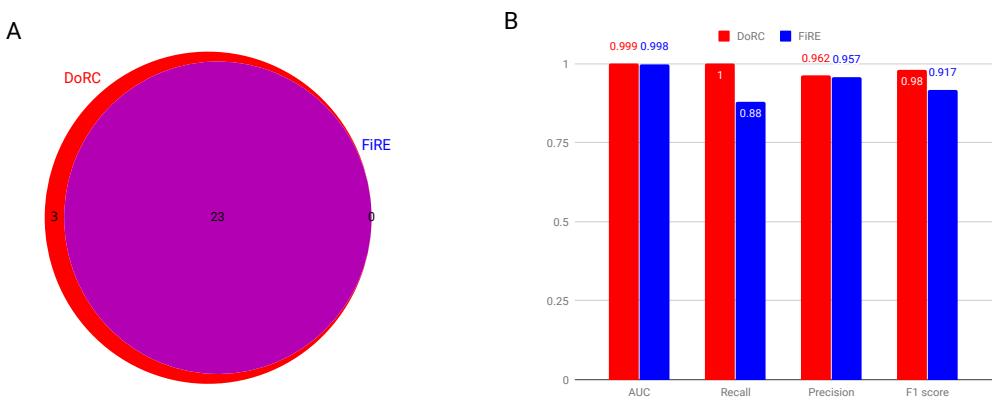


图 4-10 Comparsion of DoRC and FiRE for rare cells detection in the dataset *Splatter_500*. (A) Among all the 25 rare cells, 23 rare cells are all detected by DoRC and FiRE. DoRC could detect other 2 rare cells and 1 false positive rare cells, while FiRE failed to identify the left 2 rare cells. (B) The AUC and precision of DoRC and FiRE are almost the same, while the Recall and F1-score of DoRC is higher than FiRE.

4116 CPU @ 2.10GHz, 48 核, 64GB 内存。DoRC 由 Python 实现, 使用 scikit-learn 包(版本 0.20.2) [231] 和 pyod 包(版本 0.6.7) [232]。由于其他方法不能区分稀有细胞类型, 在 DoRC 中我们也因此省略 RafClust 的稀有细胞类型细化子程序。FiRE 从 <https://github.com/princethewinner/FiRE> 下载(分支:master, 最新提交的 abcba5b)。因为其内核算法是用 C++ 编写的, 我们在实验中使用的是其 Python 扩展分支。GiniClust 从 <https://github.com/lanjiangboston/GiniClust> 下载(分支:master, 最新提交 a442d45)。我们在命令行界面直接使用 R 脚本, 额外的步骤包括 t-SNE 可视化和 DE 分析被省略。RaceID 从 <https://github.com/dgrun/RaceID> 下载(分支:master, 最新提交 0a1e21c)。LOF (local outlier factor) 是数据挖掘领域应用广泛的算法。我们也直接使用 Pyod 包(0.6.7 版本) [232] 的 Python 实现 LOF。值得注意的是, RaceID 和 GiniClust 仅输出了稀有细胞的二分标签预测。而 DoRC、FiRE 和 LOF 则同时提供连续得分和二分类标签预测。

如图 4-11 所示, 为了从 ~68k scRNA-seq 数据中发现稀有细胞。GiniClust 和 RaceID 要么耗时, 要么耗内存; LOF 对输入数据规模非常敏感; 然而, DoRC 和 FiRE 都是非常快的, 因为它们只需要不到 2 分钟就可以完成任务。与 DoRC 相比, FiRE 的速度明显更快。然而, 孤立森林可以很容易地使用并行计算 [187]。因此, 我们认为 DoRC 的性能还有提升空间。

4.4 讨论和结论

近来, 单细胞转录组学大大改善了我们对细胞表型性质的理解。它还加速了新细胞类型的发现。这些新的细胞类型大多是罕见的, 因为显然一种丰富的细胞类型如果在很长一段时间内不被我们观察到是很不可能的。一个真正稀有的细

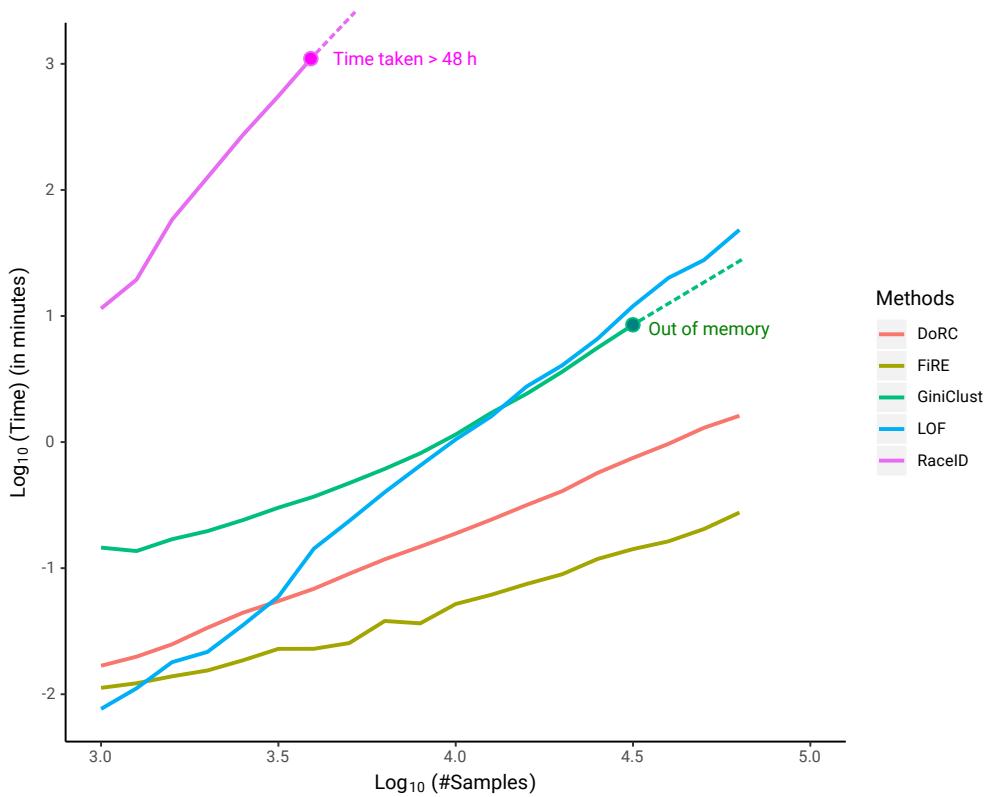


图 4-11 DoRC is fast. Execution time is recorded for DoRC, FiRE, GiniClust, LOF and RaceID, while varying the number of cells from 1k to ~68k

胞类型只有通过分析成千上万的细胞才能被发现。虽然过去几年的技术进步使我们能够进行超高通量的单细胞测序, 稀有细胞检测的可扩展方法几乎不存在。与 FiRE 方法类似, DoRC 试图用一种务实和适用的设计来填补这一空白。最值得一提的是, DoRC 避免了使用聚类作为中间步骤。因为典型的聚类技术不仅耗时, 但也不可能一次性完全绘制复杂组织中的细胞类型。

DoRC 给每一个单独的表达图谱都给出了一个稀有度分数。通过 IQR 阈值, DoRC 也可以像 RaceID 和 GiniClust 一样提供二元预测。DoRC 的核心是通过使用 Isolation Forest 作为核心算法实现的。Isolation Forest 是机器学习中被广泛研究、应用得很广的一种无监督的异常点(离群值)检测方法。每个细胞的稀有度用“异常点得分”来表示, 对于每个给定的点在相应的高维空间中。我们展示了 DoRC 在利用~68k 人血细胞单细胞表达谱划分人血树突状细胞亚型的表现。这是通过我们提出的新颖有效的细胞聚类方法 RafClust 实现的, 可以解决稀有细胞异质性的问题。RafClust 方法可以应用于一般的单细胞转录组聚类。此外, 在其他两个模拟数据集上的实验显示 DoRC 可识别人工伪造的稀有细胞并且对细胞类型特征也很敏感。我们还表明, DoRC 是可扩展的, 而且速度很快。

其实, 除了孤立森林外, 最近在一些领域提出了这几种方法 [232-235] 也值得关注。特别是当处理超大型 scRNA-seq 数据的稀有细胞发现。据我们所知, DoRC 是

首次将异常检测方法之一应用于稀有细胞的发现。因此,我们相信 DoRC 在未来检测稀有细胞领域上对于生物学家来说是一个很有前途和潜力的工具。

4.5 可重复性

DoRC 方法的 Python 实现代码可在以下网址获得 <https://github.com/chenxofhit/DoRC>。其他代码和相关数据集根据用户的要求酌情提供。

5 一种新的单细胞基因表达调控网络方法

识别细胞类型特征和细胞的基因表达活动程序(如生命周期过程、对环境因素的反应)对于理解细胞和组织的组成至关重要。虽然单细胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) 可以量化成个体细胞中的转录本, 每个细胞的表达谱可能是这两种类型的程序的混合物, 使它们难以分离。在这里, 我们提出了一个使用矩阵分解的算法 WSSMFA 来解决这个问题。通过在公开的大脑类器官 scRNA-Seq 数据集上的实验表明, 我们提出的 scGRNHunter 方法可以准确地推断出身份和活动性的子程序, 并在此基础上构建成基于细胞类别身份的基因调控网络和基于细胞活动的基因调控网络。

5.1 介绍

在基因调控网络中, 基因的协同作用, 维持细胞作为特定细胞类型的身份, 对外界信号作出反应, 并进行复杂的细胞活动, 如复制和代谢。协调这些功能所需的基因通常是通过转录共同调控来实现的, 即基因作为一个基因表达程序 (GEP) 一起被诱导, 以响应适当的内部或外部信号 [236-237]。通过实现对整个转录组的无偏的测量, RNA-Seq 等剖析技术正在为系统地发现 GEPs 并揭示其支配的生物机制铺平道路 [238]。

单细胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) 极大地提高了我们解析 GEPs 的潜力, 通过让可以观察到许多单个细胞的基因表达变化。即使如此, 推断出 GEPs 仍然具有挑战性, 因为 scRNA-Seq 数据是高噪声和高维度的, 需要合适的计算方法来发现潜在的模式。此外, 技术上的人为因素, 如双胞 (doublets, 两个或两个以上不同的细胞被错误地折叠成一个细胞) 和高度表达值缺失 (dropout) 可能会混淆分析。在降维、聚类、系谱轨迹追踪和差异表达分析方面的办法进展有助于克服其中一些问题 [16, 134, 239-240]。

在这里, 我们专注于从 scRNA-Seq 数据中推断基因调控网络的关键是, 推断出表达程序: 事实上, 单个细胞可能表达多个 GEPs, 但我们只检测反映它们组合的细胞表达谱, 而不是 GEPs 本身。一个细胞的基因表达是由许多因素形成的, 包括其细胞类型, 其在时间依赖性过程中的状态, 如细胞周期, 以及其对不同环境刺激的反应 (Wagner 等, 2016)。我们可以在 scRNA-Seq 数据中检测到的表达程序归为两个大类:

1. 对应于特定细胞类型身份, 如肝细胞或黑色素细胞的 GEPs (identity program);
2. 独立于细胞类型表达, 在任何正在进行特定活动的细胞中, 如细胞分裂或免疫细胞激活中表达的 GEPs (activity program)。

在这种表述中, 身份程序在特定细胞类型的细胞中唯一表达, 而活动程序在一种或

多种类型的细胞中可能动态变化, 并且可能是连续的或离散的。

如果由 scRNA-Seq 剖析的细胞子集表达一个给定的活动 GEP, 有可能直接从数据推断程序, 而不需要控制实验。然而, 这可能是显着更具有挑战性的比确定身份 GEPs; 虽然一些细胞可能有表达配置文件, 主要是身份程序的输出, 活动程序将总是表达一个或常常伴随着许多细胞类型的身份程序。因此, 虽然寻找相似细胞群的平均表达量往往足以找到合理准确的身份 GEPs, 但对于活性 GEPs 来说, 它往往会失败。

我们看到三个主要动机, 在 scRNA-Seq 数据共同推断身份和活动 GEPs。首先, 系统地发现 GEPs 可以揭示在原生生物组织背景下意想不到的或新颖的活动程序, 反应重要的生物过程(如免疫激活或缺氧)。其次, 它可以描述每个活动 GEP 在组织中各个细胞类型间普遍性的特征。最后, 活动程序的鉴别可以通过避免活动程序基因被错误地包含在身份程序中, 从而来改进身份程序的推断。众所周知, 对于细胞周期不同阶段的 GEP 是广泛存在活动程序的, 并且会混淆 scRNA-Seq 数据中的身份(细胞类型)程序推断 [241-242]。在这项研究中, 我们提出了一个带约束的矩阵分解模型, 称为加权半非负稀疏矩阵分解的方法, 在 scRNA-Seq 数据共同推断身份和活动 GEPs, 然后在此基础上结合 TRRUST 这个 TF-TG(调控子-靶标基因)数据库构建基因调控网络。据我们所知, 目前还没有在已发表的文章中发现有类似的思路来解决单细胞数据集上的基因调控问题。

5.2 方法

scGRNHunter 方法的流程图如图 5-1 所示。总共包括四个步骤:

1. 单细胞数据的预处理, 涉及到细胞数据的过滤, 归一化, 和基因选择;
2. 单细胞抽样;
3. GEP 识别, 使用我们提出的算法 WSSMFA;
4. 基因调控网络构建。

下文中我们将详细介绍这四个步骤。

5.2.1 预处理

通常假定输入的单细胞数据是二维矩阵, 行代表细胞, 列代表基因, 矩阵中元素值代表细胞中对应基因的表达量。对于每个数据集, 首先剔除少于 1000 个独特的分子标识符(UMIs)检测的细胞, 然后过滤掉平均 500 个细胞中累加没有 1 个 count 的基因。这个过滤后的计数矩阵我们表示为 X_{ij} ($i = 1, \dots, C$ 个细胞, $j = 1, \dots, G$ 个基因)。然后我们选择由 v-score [243] 确定的 H 个分散度(dispersion)最高的基因作为后续输入。对于本文中分析的所有数据集上, H 被设置为 500。

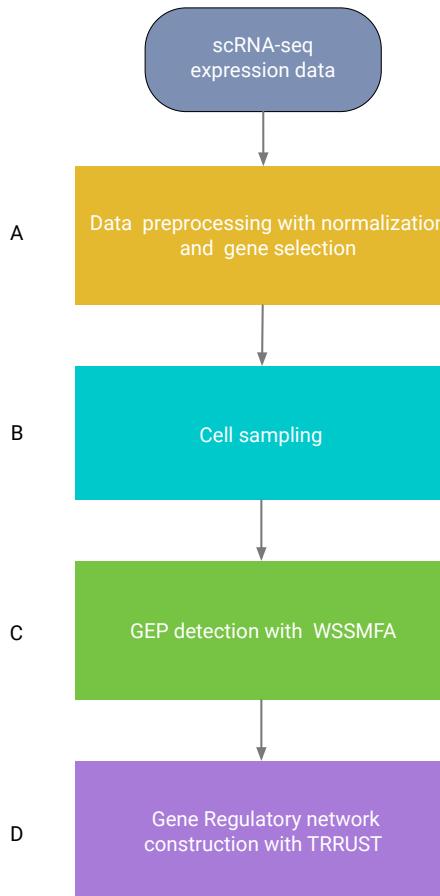


图 5-1 scGRNHunter flowchart. The input is the scRNA-seq expression data 2D-matrix, whose row stands for cells, column for genes, respectively. (A) Data preprocessing with the input expression data, the output is a normalized and the column dimension reduced matrix. Highly expressed genes with a fixed number are chosen for downstream analysis. (B) Cell sampling with a user-defined ratio or a fixed number of cells from the reduced expression data. (C) GEP detection with the algorithm WSSMFA. (D) Gene regulatory network construction with TRRUST.

在归一化之前选择一个高分散的基因集合是至关重要的, 因为如果噪声导致的 lower-variance 基因的信号与生物学上有意义的基因信号处在同一个量级上, 那么会对计算不利。H 被设置为 500, 主要考虑的是包括足够的基因以检测微妙的生物信号与尽量不包括太多无关基因来加速计算这两方面的权衡。

5.2.2 细胞抽样

由于类似于 Drop-seq 等技术使得细胞测序规模比较大, 而且我们在这个方法中主要倾向考虑的对象是基因(矩阵中的列), 为了加速计算, 可以约定如果处理的单细胞数据集上细胞的个数大于一个预定的数值, 比如 5000, 我们需要对矩阵的行(也就是细胞)采用行随机采样。如果细胞个数小于预定的数值, 这一步不是必须的, 可以把所有的细胞纳入到后续计算之中。

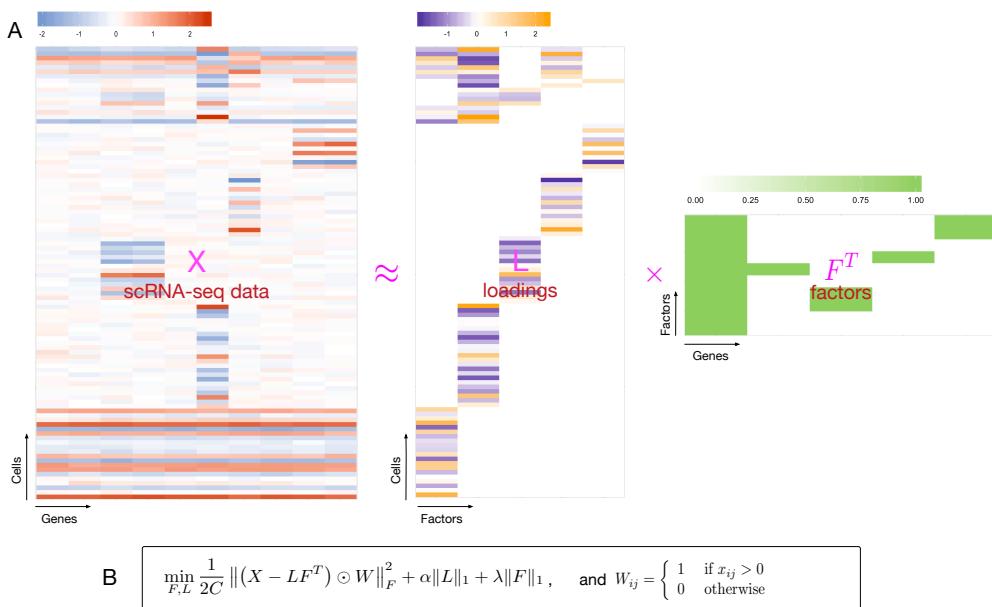


图 5-2 Illustration of the algorithm WSSMFA. A. Matrix factorization with the scRNA-seq data 2D-matrix. B. The objective function, where W is the mask matrix, α and λ are sparsity penalty parameters, and C is the number of cells.

5.2.3 加权半非负稀疏矩阵分解算法 WSSMFA

经过上述步骤处理后的单细胞数据可以表示为一个矩阵 $X_{C \times G}$, C 为细胞的数目, G 为基因的数目, 矩阵中的每个值表示该基因在对应的细胞中的表达量。对于矩阵 X , 可以表示为一个因子矩阵 (factor matrix) $F_{G \times K}$ 和一个负荷矩阵 (loading matrix) $L_{C \times K}$, 并且满足 $X = LF^T$, 如图 5-2 a 所示。

我们设计了一个具有以下三个特征的矩阵分解目标函数:

- 对残差加权和的惩罚: 为了考虑基因表达值本身的不确定性, 也就是 dropout 效应带来的影响, 具有 dropout 值的对应位置处的残差被赋予零权重。通过这种方式, 基因具有更确定的表达值的对最优参数估计有更大的影响。
- 稀疏性: 为了减少过拟合, 对分解后的矩阵进行了 l_1 惩罚。
- 分解矩阵的半非负性: 因子矩阵捕捉组织间的影响模式, 因此, 使因子矩阵非负易于解释是一个自然约束。同时, 由于输入矩阵中数值可能有正有负, 因此对负荷矩阵没有这样的约束。

基于此, 最终的目标函数定义如下 (如图 5-2 b 所示):

$$\min_{F,L} \frac{1}{2C} \| (X - LF^T) \odot W \|_F^2 + \alpha \| L \|_1 + \lambda \| F \|_1 \quad (5-1)$$

其中, F 是非负的, W 是 binary 掩码矩阵 (mask matrix), C 是细胞个数, α 和 λ 是惩罚系数。 W 跟 X 的维度相同, 并且有:

$$W_{ij} = \begin{cases} 1 & \text{if } x_{ij} > 0 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (5-2)$$

这个目标函数是双凸 (biconvex) 的, 也就是说, 只在 F 中凸, 或者只在给定的 L 中凸, 但在两者共同存在时不凸。我们使用交替最小二乘法 (ALS, alternating least squares) 与梯度下降 (gradient descent) 法来优化目标函数 (算法 3, 在 R 版本 3.5.1 中实现,[244-245])。在每一次迭代中我们固定 F 并更新 L , 然后固定 L 并更新 F , 当两次迭代之间 F 的差值的 Frobenius 范数 < 0.01 时, 更新结束。在每一步更新中, 优化问题都是有约束条件的线性回归。由于线性回归的解保证了均方误差与惩罚之和最小, 所以代价函数单调下降。

算法 3 Weighted semi-nonnegative sparse matrix factorization algorithm (WSSMFA)

```

1: Input:  $X_{G \times C}$                                  $\triangleright G$  genes,  $C$  cells, I index set of  $n$  regulators
2: Output:  $L_{G \times K}, F_{C \times K}$                  $\triangleright$  Loading matrix and factor matrix
3: while not converged do
4:   for  $i = 1 \rightarrow G$  do                       $\triangleright$  For each bootstrapping run
5:      $l_i \leftarrow \min_{l_i} \| (x_i - l_i F^T) \odot w_i \|_F^2 + \alpha \| l_i \|_1$   $\triangleright$  Resampling with replacement
6:     which is equivalent to
7:      $l_i \leftarrow \min_{l_i} \| x_i \odot w_i - l_i (F^T \text{diag}(w_i)) \|_F^2 + \alpha \| l_i \|_1$ 
8:   for  $j = 1 \rightarrow T$  do
9:      $f_j \leftarrow \min_{f_j} \| (x_j - f_j L^T) \odot w_j \|_F^2 + \lambda \| f_j \|_1, \| f_j \| \geq 0$ 
10:    which is equivalent to
11:     $f_j \leftarrow \min_{f_j} \| (x_j \odot w_j - f_j (L^T \text{diag}(w_j))) \|_F^2 + \lambda \| f_j \|_1, \| f_j \| \geq 0$ 

```

5.2.4 构建基因调控网络

TRRUST (version 2, [246]) 是一个采用数据挖掘辅助建立的人类和小鼠转录调控网络数据库, 并提供了网页版本的服务。当前版本的 TRRUST 分别包含 800 个人类 TFs (调控因子) 和 828 个小鼠 TFs 的 8,444 和 6,552 个 TF-target 调控关系。TRRUST 数据库还提供了调控模式的信息 (激活或抑制)。目前已知调控模式的调控关系有 8972 个 (59.8%)。

针对因子矩阵 (factor matrix) $F_{G \times K}$, 每一个因子代表了一个 GEP, 身份 GEPs 里面的基因没有交集, 活动 GEPs 跟各个身份 GEP 之间一般存在相交的基因, 针对身份 GEP 和活动 GEP 我们根据基因列表可以在 TRRUST 线上服务上查询关键的调控因子, 然后构建调控网络。

5.3 实验数据

本文中使用的数据集如表 5-1所示。

表 5-1 The published dataset we used

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Quadrato G, et.	2017	Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE86153	Gene Expression Omnibus, GSE86153

5.4 实验结果

5.4.1 模型选择

我们需要设置 WSSMFA 算法的超参数, 包括因子个数 (K) 和稀疏惩罚参数 (α, λ)。我们在 [20,25,30,35,40] 范围内评估 K , 在 [4.9,24.5,49,245,490] 范围内评估 α 和 λ 。这些范围的选择是通过考虑单细胞中的一些已知的先验知识比如类别数来定义 K 的可信值, 并通过手动检查 α 和 λ 变化很大的范围, 以避免对这些超参数的范围进行高分辨率搜索, 导致明显不合理的解, 如因子缺乏稀疏性或者大量为空, 或者与原始数据间没有关联性。

在指定的搜索空间内, 我们利用 (1) 之前定义的矩阵分解稳定性标准和 (2) 学习因子的独立性, 即代表足够的稀疏性, 对所有 K 、 α 和 λ 组合的模型进行了评估。考虑到矩阵因子化的随机性, Brunet 等人提出了一种寻找最稳定的因子化结果的方法, 这种方法已经在各种研究中得到应用 [247-248]。我们对每个模型进行随机初始化, 运行 30 次后得到共识矩阵 C 。 C 中的值在 0 和 1 之间, 代表一对细胞被分配到同一个因子的比例。利用 C 矩阵, 我们计算了共识相关性, 用于衡量 C 矩阵的离散程度。共识相关度越高, 说明因子矩阵越稳定。

在这里, 对于每一个观察到的学习到的非空因子 K' 的平均数 (可能小于输入的 K), 我们对 λ 和 α 的不同取值进行了汇总, 并计算了中位共线性相关性 (cophenetic correlation,[247])。我们从考虑中剔除了任何对应于 K 的中位共时相关性 < 0.9 的 K' 。接下来, 在剩下的单个设置中, 我们排除任何一个共线性相关性 < 0.9 的参数取值。最后, 在这些明显稳定的设置中, 我们根据因子对之间的最小皮尔逊相关性选择最终的超参数, 使得独立的因子和与数据中独立信号的稀疏程度相匹配。在这里, 我们计算了每对因子的皮尔逊相关性, 取了对偶相关矩阵的 Frobenius norm, 并在 30 个相同设置的随机初始化运行中取平均值。

5.4.2 WSSMFA 揭示了 GEPs 的存在

在大脑类器官数据集上, 我们在数据预处理之后保留了 500 个分散度最高的基因 ($H = 500$), 按照 0.05% 的比例随机抽取了 2623 个细胞, 按照模型选择的准则操作后, 最终确定 $K = 15$, $\alpha = 50$, $\lambda = 5$, 即 15 个因子 (f_1, f_2, \dots, f_{15}), 也就是对应 15 个 GEP。负荷矩阵 L 揭示了各细胞的表达量与因子之间的组合线性关系, 我们按照细胞类别对负荷矩阵进行统计, 针对每个 GEP 我们可以画出对应类别的

负荷的箱形图 (boxplot), 如图 5-3 所示。另外, 为了辅助说明, 我们也对该单细胞数据结合已知的细胞的标注类别信息使用基于 t 分布的随机邻域嵌入 (t-SNE) 进行二维可视化, t-SNE 图反应了单细胞数据中细胞分布的宏观结构, 可以看出单细胞数据是否有不同的类别, 即细胞是否存在异质性。结合该数据集提供的细胞类别标签, 我们对抽样之后的数据可视化, 如图 5-4 所示。

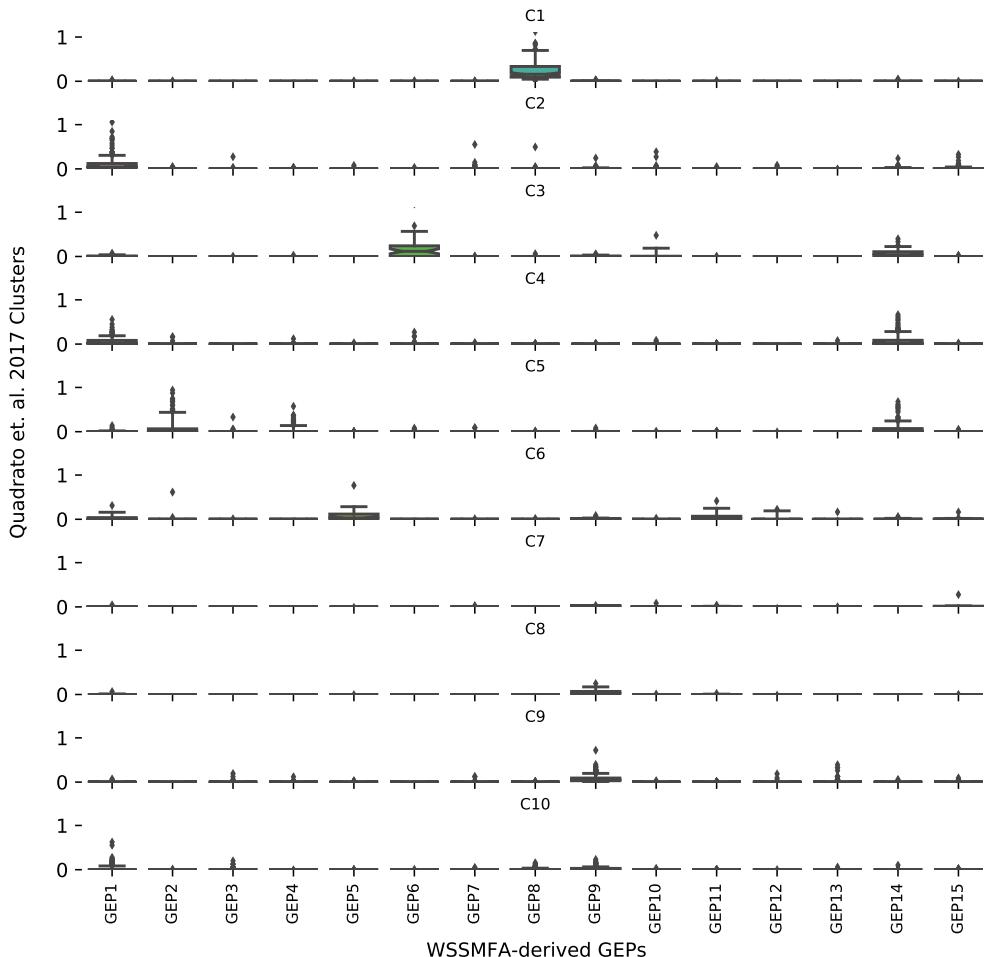


图 5-3 GEPs detected with WSSMFA. GEP1, GEP2, …, GEP15 are the 15 GEPs derived with WSSMFA algorithm. For each GEP, the loading values based on the 10 different clusters, i.e. C1, C2, …, C10, are visualized with boxplot.

如果一个 GEP 仅仅在一个细胞类别中表达, 很显然它就是一个身份 GEP; 如果在两个或者多个细胞类别中表达, 那么它就属于活动 GEP。结合图 5-3 和图 5-4 可以看出, GEP6 和 GEP8 是典型的身份 GEPs (分别对应到类别 C3 和 C1), GEP1、GEP9 和 GEP14 是典型的活动 GEPs。GEP1 牵涉到类别 C2, C4, C6 和 C10; GEP14 牵涉到类别 C3, C4, C5。

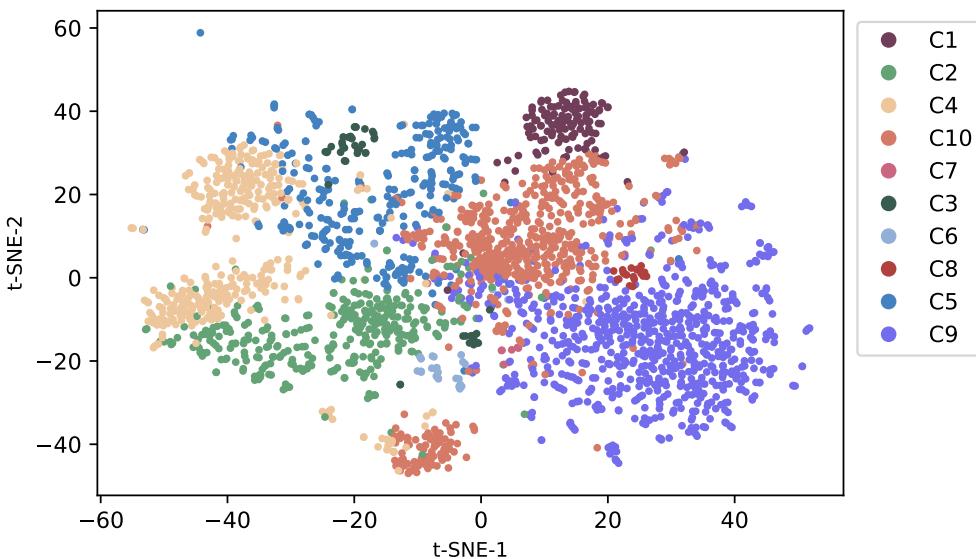


图 5-4 The sampled brain organisms data visualized with t-SNE.

5.4.3 身份调控网络与活动调控网络的构建

结合因子矩阵 F , 每一列中系数不为零的基因即是该因子(也就是 GEP) 中所包含的基因, 针对每个 GEP, 我们可以结合 TRRUST (version 2) 构建其调控网络。如图所示, 即为每个 GEP 所对应的大脑类器官数据集上的基因调控网络。

由 GEP6 构建的基因调控网络如图 5-5 所示:

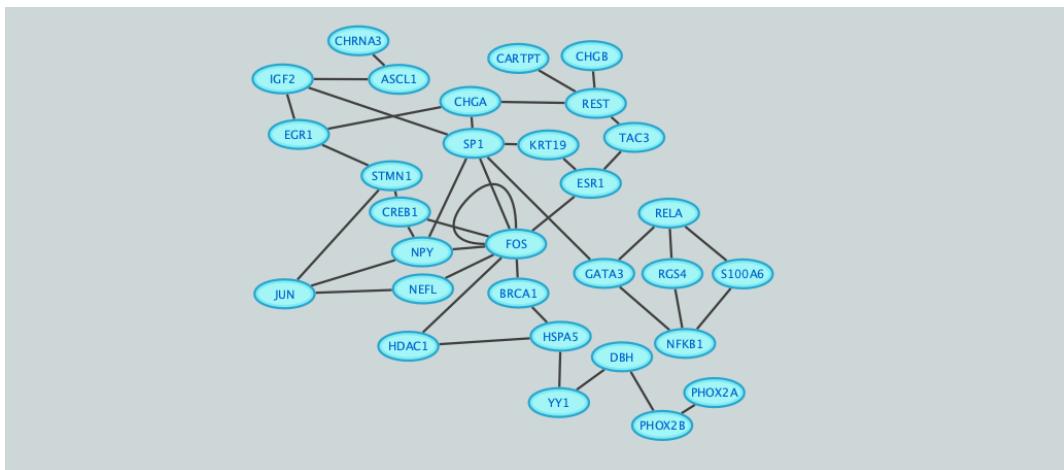


图 5-5 The gene regulatory network of GEP6, constructed with the TRRUST database.

由 GEP8 构建的基因调控网络如图 5-6 所示:

由于 GEP14 构建的基因调控网络如图 5-7 所示:

5.5 讨论

scGRNHunter 的核心算法依赖 WSSMFA 这个矩阵分解方法, 该方法的一个基本限制是前提假设, 即细胞的表达可以被建模为 GEPs 的线性组合。值得注意

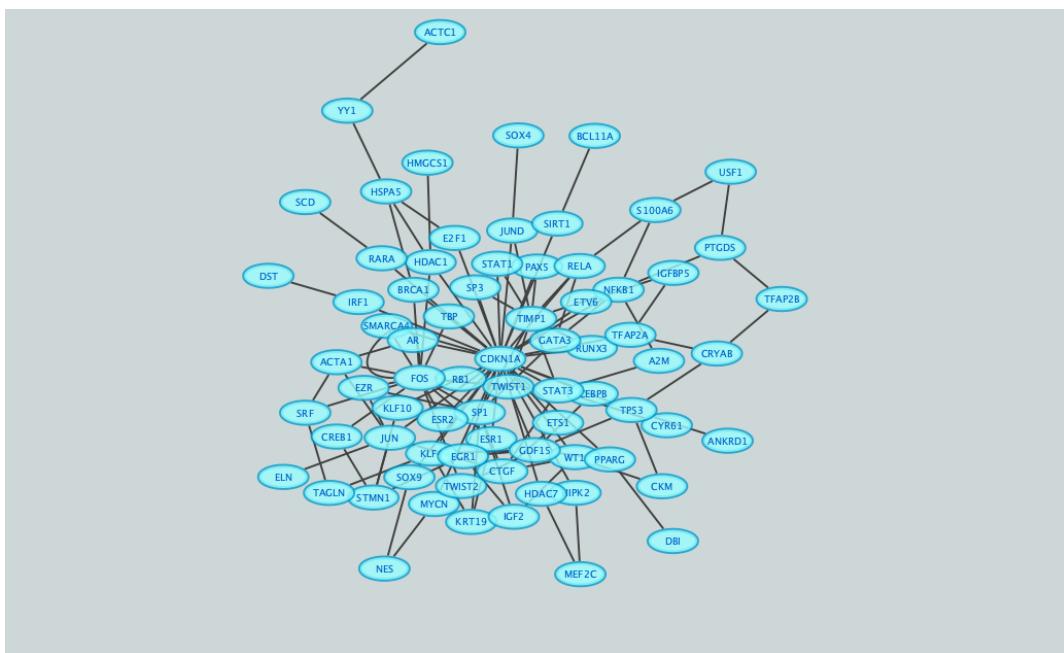


图 5-6 The gene regulatory network of GEP8, constructed with the TRRUST database.

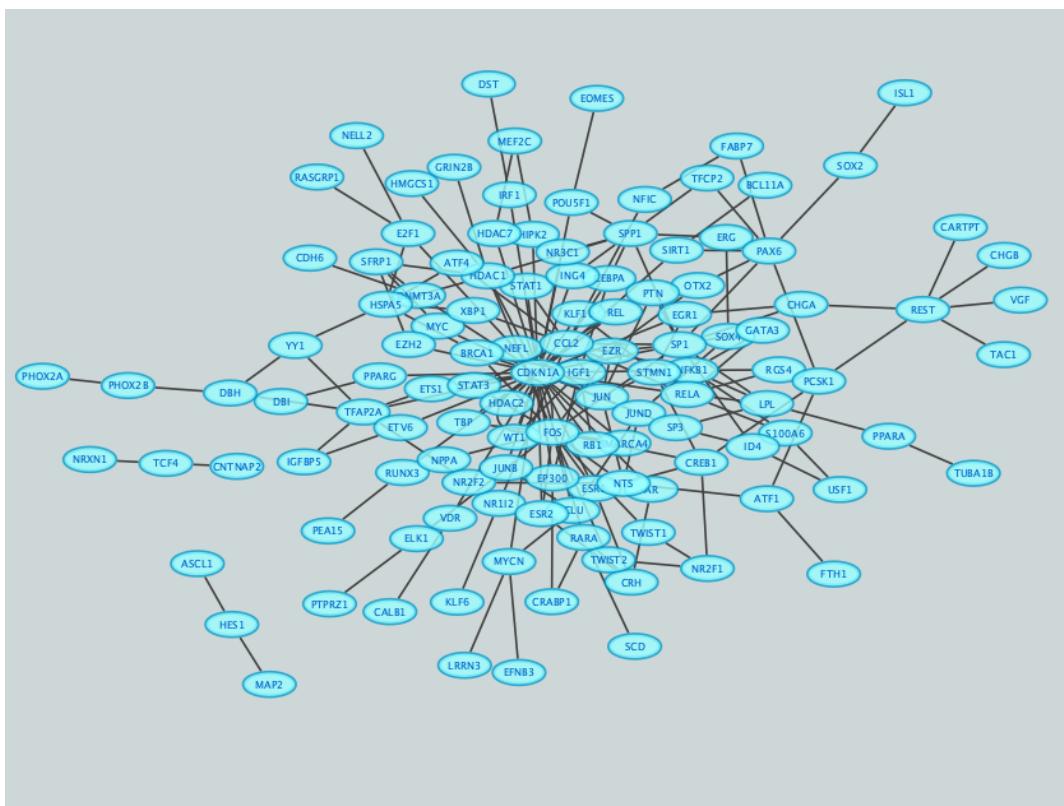


图 5-7 The gene regulatory network of GEP14, constructed with the TRRUST database.

的是, 这排除了转录抑制的建模, 也就是说其中一个或多个基因将被一个 GEP 诱导, 当第二个抑制 GEP 在同一细胞中活跃时, 其表达量会显著降低。据我们所知, 这种关系还没有在矩阵因子化框架中表示, 但它们可能更容易纳入新的潜变量模型类别, 如变分自动编码器 (VAEs) [249-250]。VAEs 代表了一个高度灵活的隐式空间中的单元, 可以捕捉隐式变量之间的非线性和相互作用。然而, 虽然隐变量的设计是为了促进输入基因表达数据的准确重建, 但它们是否可以直接或间接地解释为不同的 GEPs 相互作用, 还有待证明。在可预见的未来, 需要综合权衡考虑模型本身的灵活性与训练和解释它们的输出的难度这两个方面。

随着 RNA 捕获效率和通量的不断技术进步, scRNA-Seq 数据可能会变得更加丰富和广阔。这将使得检测越来越细微的 GEPs 成为可能, 从而捕捉细胞类型、细胞状态和活动的生物变异性。在这里, 我们已经展示了一个计算方法框架 scGRNHunter, 可以用来直接从 scRNA-Seq 中推断出这样的 GEPs, 而不需要进行实验操作, 从而为细胞和组织行为提供了至关重要的解释, 并为基因调控网络的构建提供了一个全新的思路。

6 总结与展望

6.1 研究工作总结

作为生物分化过程和生长机制中的重要一环,基因调控网络的研究是系统生物学的基础和热点问题。基因调控网络是通过测量基因的表达值进行预处理,按照设计的推断策略,并结合已知的先验知识,构建得出基因之间相互作用的网络。技术上,近十几年来,工业界和学术界在大数据、机器学习等技术上的积累和应用也十分成熟,这为我们解决系统生物学最核心基础的基因调控网络构建的问题提供了强大的技术支撑。数据上,这些年随着测序技术的快速发展,基因表达数据的获取成本大幅降低,生成速度大幅加快,数据来源越来越多,数据种类越来越丰富,数据规模也越来越大。而且,单细胞技术的出现和成熟,为研究者从单个细胞层次测定基因的表达量提供了可能,减少了传统技术的噪声,为基因调控网络的构建提供了更加细粒度精确的数据。单细胞技术还能够获得不同类型和周期细胞的表达数据,这为研究特定细胞类型中的调控网络以及参与细胞分化过程的调控网络提供了可能。在技术和数据的双重加持下,研究者可以利用基因调控网络来探究基因间的调控关系,发掘隐藏的功能特征,最终应用于生物信息、医学制药等领域。目前,一个不容忽视的问题是,基因调控网络的预测准确性还有很大的提高空间,许多疾病的发病机理以及细胞间的相互作用还有待发掘。随着技术的进步,基因调控网络的研究经过结合计算机、医学、生物学和数学等科学,形成交叉学科,基因调控网络在今后的生物研究中仍将会获得持续的关注,扮演着极其重要的角色。

本文在总结和分析已有的基因调控网络构建的基础上,主要的工作如下:

(1) 基于信息理论的各种 GRN 推断方法被提出来。然而,由于原始数据中存在的外部噪声、网络结构中的拓扑稀疏性和非线性基因之间的依赖等因素,这些方法在网络推断中会引入冗余的依赖关系。特别是随着网络规模的增加,这些方法的表现大幅降低。我们提出了一种新的网络结构推断方法 Loc-PCA-CMI: 首先识别局部重叠基因簇,然后基于条件互信息 (PCA-CMI) 的路径一致性算法推断每个簇的局部网络结构,最终通过聚合局部网络结构,也就是基因之间的依赖性网络,来构造最终的 GRN。我们在 DREAM3 敲除数据集上对 LOC-PCA-CMI 进行了评估,将其性能与其它基于信息理论的网络结构推断方法,包括 ARACNE、MRNET、PCA-CMI 和 PCA-PMI,进行了比较。实验结果证明,Loc-PCA-CMI 在 DREAM3 数据集上特别是在基因数目为 50 和 100 的网络上表现优于其它四种基准方法。

(2) 基于回归的各种 GRN 推断方法被提出来。这几年的关于数据驱动的动态网络构建的研究,为我们提供了解决回归问题的新视角。我们提出了一种数据驱动的动态网络构建方法来推断基因调控网络 (D3GRN)。其中,将每个目标基因的调控关系转化为功能分解问题,并利用揭示网络相互作用的算法 (ARNI) 解决

各个子问题。为了弥补 ARNI 仅从单元级构建网络的局限性, 我们采用抽样和基于面积的评分方法来推断最终的网络。在 DREAM4 和 DREAM5 基准数据集上, D3GRN 在 AUPR 这个评价指标上与最先进的算法相比具有竞争力。

(3) 构建单细胞调控网络之前一个具有挑战性的问题是如何从超大规模的 scRNA-seq 数据中识别稀有细胞和区分细胞类型。现有的寻找稀有细胞的算法非常耗时或耗费内存。我们提出了一种高效准确的方法 DoRC (Discovery of Rare Cells)。DoRC 产生的稀有度分数可以帮助生物学家们着重于下游分析, 只对超大规模内的部分表达细胞 scRNA-seq 数据进行分析。为了在随后的下游分析的过程中区分细胞类型, 我们提出了新颖有效的细胞聚类方法 RafClust。我们使用 ~68k 人血细胞的单细胞表达谱还证明了 DoRC 在划分人类血液树突状细胞亚型方面的效果。DoRC 可以识别仿真数据集里面的稀有细胞, 并且对细胞类型特征也很敏感。

(4) 构建单细胞基因调控网络中, 识别细胞类型特征和细胞的基因表达活动程序(如生命周期过程、对环境因素的反应)对于理解细胞和组织的组成至关重要。虽然单细胞 RNA-Seq (scRNA-Seq) 可以量化成个体细胞中的转录本, 每个细胞的表达谱可能是这两种类型的程序的混合物, 使它们难以分离。我们提出了一个使用矩阵分解的算法 WSSMFA 来解决这个问题。通过在公开的大脑类器官 scRNA-Seq 数据集上的实验表明, 我们提出的 scGRNHunter 方法可以准确地推断出身份和活动性的子程序(包括它们在每个细胞的相对贡献), 并在此基础上构建成基于细胞类别身份的基因调控网络和基于细胞活动的基因调控网络。

6.2 研究展望

(1) 基于互信息的调控网络结构推断改进

互信息是基于变量之间的依赖程度, 从数值上来看是概率的大小, 而从结构上来看就是变量之间的位置关系和紧密程度, MI 只考虑两两之间的信息量, 而 CMI 则考虑三者之间的关系, 运用联合概率提高了预测精确度。因此, 一方面可以继续分析变量结构关系尝试改进, 去识别网络中的间接调控作用。另一方面从基因的网络结构入手, 例如某些网络的部分结构很多方法都无法预测正确, 那么是否可以分析该结构来设计适用的算法, 比如针对常见的 FFT motif 结构, 然后针对性地和现有算法结合来提高准确度。

(2) 基于回归的调控网络推断改进

回归方法除了能推断出基因调控网络的结构之外, 更吸引人的是它能够推断出基因之间的相互作用的方向(即上调和下调)。回归模型将基因调控建模转化为机器学习特征选择的问题, 即是将靶标基因的表达看作是调控基因表达之间的相互线性作用或者非线性作用的结果。它们应用在基因调控网络构建上优点是计算效率高, 网络构建准确率高, 缺点是一些非线性的模型可解释性较低参数意义不

明确,缺少对生物结构的支持。D3GRN 尝试着从数据驱动的角度构建基因调控网络,注重可解释性,但是计算效率上只适合小型网络。针对大型的基因调控网络推断,还需要借助于深度学习等技术来构建回归模型,但是需要注重深度模型的可解释性。

(3) 基于深度学习的单细胞填充和聚类方法改进

单细胞填充和聚类是单细胞数据上游分析的核心任务,在很大程度上是构建与细胞类型相关的基因调控网络的必要步骤。随着高通量测序技术的发展,需要处理的细胞数以万计,同时大规模的单细胞表达数据也极度稀疏,深度学习方法先天具有计算上的高效率,已经在各种生物学应用中取得成功,包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、结构生物学。在填充上,现在的主流的 dropout imputation 方法大部分是基于矩阵分解和统计模型的,如果将矩阵分解和深度学习计算模型相结合,同时考虑融合先验知识,比如基因和基因之间的相互作用(比如调控,或者是共表达),将会给单细胞的数据填充带来革命性的变化。在聚类上,单细胞数据存在的批次效应对聚类的影响非常巨大,消除批次效应的影响,使得同类型不同批次的细胞表达数据尽量对齐,有研究者提出了使用深度学习而不是传统的统计学来消除单细胞测序中的批次差异的工具。现有的聚类方法比如 Seurat Clustering 和 SC3 在处理大规模单细胞数据集时稍显不足,即使是本文提出的 RafClust 方法也仅仅适合中等规模的数据集。基于图的聚类算法和基于深度表示学习的聚类算法,融合比如细胞的空间位置信息(Spatial information)或者是比如相对保守的染色质 ATAC-seq 数据,将会有极大的学术价值和产业应用前景。

(4) 基于深度学习的基因调控网络推断方法改进

虽然深度学习在生物信息学上取得了极大的应用成就,将深度学习技术应用到基因调控网络还存在许多挑战,考虑到生物数据的可变性以及数据来源的不同,在一个数据集上训练的模型可能无法很好地推广到其他数据集。基于深度学习的方法需要大量的基因表达数据和已知的基因表达调控关系,现在的数据集要么太小无法满足算法的要求,或者是像单细胞测序数据过于稀疏,而且深度学习模型缺乏很好的可解释性,导致深度学习模型在基因调控网络推断中未成为主流。在下一阶段的研究中,可以从两个角度来着手考虑:从数据角度看,可以考虑设计深度学习算法从图像数据中表征细胞的变化,因为虽然单细胞基因表达数据稀疏但是图像数据却十分稠密,可以将两种异构数据结合起来;或者考虑使用类似于 NLP 中的词嵌入模型(word embedding)对大规模稀疏的单细胞基因表达数据进行编码后进行后续处理;或者是使用生成对抗网络等模型生成具有实际数据属性的模拟数据;再或者是考虑基因表达数据融合 TF-gene 调控数据集, PPI 数据,和 DNA 甲基化数据等多模态数据。从计算角度看,可以把基因调控网络推断问题转化为深度学习模型擅长处理的分类问题,已知的 TF 和 Gene 之间的调控关

系当作正样本, TF 与 Gene 之间的调控关系预测转换为一个多分类的问题。

参考文献

- [1] IDEKER T, GALITSKI T, HOOD L. A new approach to decoding life: systems biology[J]. Annual review of genomics and human genetics, 2001, 2(1):343-372.
- [2] DE JONG H. Modeling and simulation of genetic regulatory networks: A literature review[J]. Journal of Computational Biology, 2002, 9(1):69-105.
- [3] HURLEY D, ARAKI H, TAMADA Y, et al. Gene network inference and visualization tools for biologists: application to new human transcriptome datasets[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 40(6):2377-2398.
- [4] KREEGER P K, LAUFFENBURGER D A. Cancer systems biology: a network modeling perspective[J]. Carcinogenesis, 2009, 31(1):2-8.
- [5] YAN W, XUE W, CHEN J, et al. Biological networks for cancer candidate biomarkers discovery[J]. Cancer informatics, 2016, 15:CIN-S39458.
- [6] SIMA C, HUA J, JUNG S. Inference of gene regulatory networks using time-series data: a survey[J]. Current genomics, 2009, 10(6):416-429.
- [7] SCHLITT T, BRAZMA A. Current approaches to gene regulatory network modelling[J]. BMC bioinformatics, 2007, 8(6):S9.
- [8] BUERMANS H, den Dunnen J. Next generation sequencing technology: Advances and applications[J/OL]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2014, 1842(10):1932 - 1941. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092544391400180X>.
- [9] CEREB N, KIM H R, RYU J, et al. Advances in dna sequencing technologies for high resolution hla typing[J/OL]. Human Immunology, 2015, 76(12):923 - 927. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885915004528>.
- [10] MORIN R D, BAINBRIDGE M, FEJES A, et al. Profiling the hela s3 transcriptome using randomly primed cdna and massively parallel short-read sequencing [J]. Biotechniques, 2008, 45(1):81.
- [11] VELCULESCU V E, ZHANG L, VOGELSTEIN B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science, 1995, 270(5235):484.
- [12] HOLSTEGE F C, JENNINGS E G, WYRICK J J, et al. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome[J]. Cell, 1998, 95(5):717-728.
- [13] GASCH A P, SPELLMAN P T, KAO C M, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes[J]. Molecular biology of the cell, 2000, 11(12):4241-4257.

- [14] TANG F, BARBACIORU C, WANG Y, et al. mrna-seq whole-transcriptome analysis of a single cell[J]. *Nature methods*, 2009, 6(5):377-382.
- [15] WAGNER A, REGEV A, YOSEF N. Revealing the vectors of cellular identity with single-cell genomics[J]. *Nature biotechnology*, 2016, 34(11):1145-1160.
- [16] KHARCHENKO P V, SILBERSTEIN L, SCADDEN D T. Bayesian approach to single-cell differential expression analysis[J]. *Nature methods*, 2014, 11(7):740-742.
- [17] BUETTNER F, NATARAJAN K N, CASALE F P, et al. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell rna-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells[J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(2):155-160.
- [18] KAUFFMAN S, PETERSON C, SAMUELSSON B, et al. Random boolean network models and the yeast transcriptional network[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(25):14796-14799.
- [19] AKUTSU T, MIYANO S, KUHARA S, et al. Identification of genetic networks from a small number of gene expression patterns under the boolean network model.[C]//Pacific symposium on biocomputing: volume 4. 1999: 17-28.
- [20] LIANG S, FUHRMAN S, SOMOGYI R, et al. Reveal, a general reverse engineering algorithm for inference of genetic network architectures[C]//Pacific symposium on biocomputing: volume 3. 1998: 18-29.
- [21] MARSHALL S, YU L, XIAO Y, et al. Inference of a probabilistic boolean network from a single observed temporal sequence[J]. *EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology*, 2007, 2007(1):32454.
- [22] CHEN H, GUO J, MISHRA S K, et al. Single-cell transcriptional analysis to uncover regulatory circuits driving cell fate decisions in early mouse development [J]. *Bioinformatics*, 2014, 31(7):1060-1066.
- [23] MOIGNARD V, WOODHOUSE S, HAGHVERDI L, et al. Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements[J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(3):269-276.
- [24] CHEN T, HE H L, CHURCH G M. Modeling gene expression with differential equations[M]//Biocomputing'99. World Scientific, 1999: 29-40.
- [25] MATSUMOTO H, KIRYU H, FURUSAWA C, et al. Scode: an efficient regulatory network inference algorithm from single-cell rna-seq during differentiation [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(15):2314-2321.
- [26] MATSUMOTO H, KIRYU H. Scoup: a probabilistic model based on the

- ornstein–uhlenbeck process to analyze single-cell expression data during differentiation[J]. BMC bioinformatics, 2016, 17(1):232.
- [27] FRIEDMAN N, LINIAL M, NACHMAN I, et al. Using bayesian networks to analyze expression data[J]. Journal of computational biology, 2000, 7(3-4):601-620.
- [28] COOPER G F, HERSKOVITS E. A bayesian method for the induction of probabilistic networks from data[J]. Machine learning, 1992, 9(4):309-347.
- [29] KIM S Y, IMOTO S, MIYANO S. Inferring gene networks from time series microarray data using dynamic bayesian networks[J]. Briefings in bioinformatics, 2003, 4(3):228-235.
- [30] JANSEN R, YU H, GREENBAUM D, et al. A bayesian networks approach for predicting protein-protein interactions from genomic data[J]. science, 2003, 302 (5644):449-453.
- [31] FRIEDMAN N. Inferring cellular networks using probabilistic graphical models [J]. Science, 2004, 303(5659):799-805.
- [32] HARTEMINK A J. Reverse engineering gene regulatory networks[J]. Nature biotechnology, 2005, 23(5):554-555.
- [33] WERHLI A V, HUSMEIER D, et al. Reconstructing gene regulatory networks with bayesian networks by combining expression data with multiple sources of prior knowledge[J]. Stat Appl Genet Mol Biol, 2007, 6(1):15.
- [34] YAVARI F, TOWHIDKHAH F, GHARIBZADEH S. Gene regulatory network modeling using bayesian networks and cross correlation[C]//Biomedical Engineering Conference, 2008. CIBEC 2008. Cairo International. IEEE, 2008: 1-4.
- [35] YANG B, ZHANG J, SHANG J, et al. A bayesian network based algorithm for gene regulatory network reconstruction[C]//Signal Processing, Communications and Computing (ICSPCC), 2011 IEEE International Conference on. IEEE, 2011: 1-4.
- [36] KUNGA T A, MOHAMADA M S. Using bayesian networks to construct gene regulatory networks from microarray data[J]. Jurnal Teknologi, 2012, 1.
- [37] YOUNG W C, RAFTERY A E, YEUNG K Y. Fast bayesian inference for gene regulatory networks using scanbma[J]. BMC systems biology, 2014, 8(1):47.
- [38] DONDELINGER F, LEBRE S, HUSMEIER D. Heterogeneous continuous dynamic bayesian networks with flexible structure and inter-time segment information sharing[J]. 2010.

- [39] GRZEGORCZYK M, HUSMEIER D. Improvements in the reconstruction of time-varying gene regulatory networks: dynamic programming and regularization by information sharing among genes[J]. *Bioinformatics*, 2010, 27(5):693-699.
- [40] HECKER M, LAMBECK S, TOEPFER S, et al. Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models—a review[J]. *Biosystems*, 2009, 96(1): 86-103.
- [41] SMITH V A, YU J, SMULDERS T V, et al. Computational inference of neural information flow networks[J]. *PLoS computational biology*, 2006, 2(11):e161.
- [42] WU H, LIU X. Dynamic bayesian networks modeling for inferring genetic regulatory networks by search strategy: Comparison between greedy hill climbing and mcmc methods[C]//Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology: volume 34. 2008: 224-234.
- [43] SONG L, KOLAR M, XING E P. Keller: estimating time-varying interactions between genes[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(12):i128-i136.
- [44] DEL GENIO C I, KIM H, TOROCZKAI Z, et al. Efficient and exact sampling of simple graphs with given arbitrary degree sequence[J]. *PloS one*, 2010, 5(4): e10012.
- [45] NETRAPALLI P, BANERJEE S, SANGHAVI S, et al. Greedy learning of markov network structure[C]//Communication, Control, and Computing (Allerton), 2010 48th Annual Allerton Conference on. IEEE, 2010: 1295-1302.
- [46] WERHLI A V, GRZEGORCZYK M, HUSMEIER D. Comparative evaluation of reverse engineering gene regulatory networks with relevance networks, graphical gaussian models and bayesian networks[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(20):2523-2531.
- [47] CHAI L E, MOHAMAD M S, DERIS S, et al. Inferring gene regulatory networks from gene expression data by a dynamic bayesian network-based model. [J]. *DCAI*, 2012, 151:379-386.
- [48] VINH N X, CHETTY M, COPPEL R, et al. Gene regulatory network modeling via global optimization of high-order dynamic bayesian network[J]. *BMC bioinformatics*, 2012, 13(1):131.
- [49] STUART J M, SEGAL E, KOLLER D, et al. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules[J]. *science*, 2003, 302(5643):249-255.
- [50] BABA K, SHIBATA R, SIBUYA M. Partial correlation and conditional corre-

- lation as measures of conditional independence[J]. *Australian & New Zealand Journal of Statistics*, 2004, 46(4):657-664.
- [51] BARZEL B, BARABÁSI A L. Network link prediction by global silencing of indirect correlations[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(8):720-725.
- [52] FEIZI S, MARBACH D, MÉDARD M, et al. Network deconvolution as a general method to distinguish direct dependencies in networks[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(8):726.
- [53] SZÉKELY G J, RIZZO M L, BAKIROV N K, et al. Measuring and testing dependence by correlation of distances[J]. *The annals of statistics*, 2007, 35(6):2769-2794.
- [54] KOSOROK M R. On brownian distance covariance and high dimensional data [J]. *The annals of applied statistics*, 2009, 3(4):1266.
- [55] SZEKELY G J, RIZZO M L, et al. Partial distance correlation with methods for dissimilarities[J]. *The Annals of Statistics*, 2014, 42(6):2382-2412.
- [56] COVER T M, THOMAS J A. Elements of information theory[M]. John Wiley & Sons, 2012.
- [57] DAUB C O, STEUER R, SELBIG J, et al. Estimating mutual information using b-spline functions—an improved similarity measure for analysing gene expression data[J]. *BMC bioinformatics*, 2004, 5(1):118.
- [58] BRUNEL H, GALLARDO-CHACÓN J J, BUIL A, et al. Miss: a non-linear methodology based on mutual information for genetic association studies in both population and sib-pairs analysis[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(15):1811-1818.
- [59] ZHANG X, ZHAO X M, HE K, et al. Inferring gene regulatory networks from gene expression data by path consistency algorithm based on conditional mutual information[J]. *Bioinformatics*, 2011, 28(1):98-104.
- [60] BASSO K, MARGOLIN A A, STOLOVITZKY G, et al. Reverse engineering of regulatory networks in human b cells[J]. *Nature genetics*, 2005, 37(4):382.
- [61] MARGOLIN A A, NEMENMAN I, BASSO K, et al. Aracne: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context [J]. *BMC bioinformatics*, 2006, 7(1):S7.
- [62] FAITH J J, HAYETE B, THADEN J T, et al. Large-scale mapping and validation of escherichia coli transcriptional regulation from a compendium of expression profiles[J]. *PLoS biology*, 2007, 5(1):e8.

- [63] MEYER P E, KONTOS K, LAFITTE F, et al. Information-theoretic inference of large transcriptional regulatory networks[J]. EURASIP journal on bioinformatics and systems biology, 2007, 2007(1):79879.
- [64] PENG H, LONG F, DING C. Feature selection based on mutual information criteria of max-dependency, max-relevance, and min-redundancy[J]. IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence, 2005, 27(8):1226-1238.
- [65] ALTAY G, EMMERT-STREIB F. Inferring the conservative causal core of gene regulatory networks[J]. BMC Systems Biology, 2010, 4(1):132.
- [66] DE MATOS SIMOES R, EMMERT-STREIB F. Bagging statistical network inference from large-scale gene expression data[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33624.
- [67] FRENZEL S, POMPE B. Partial mutual information for coupling analysis of multivariate time series[J]. Physical review letters, 2007, 99(20):204101.
- [68] SCHREIBER T. Measuring information transfer[J]. Physical review letters, 2000, 85(2):461.
- [69] ZHAO J, ZHOU Y, ZHANG X, et al. Part mutual information for quantifying direct associations in networks[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(18):5130-5135.
- [70] YU T, PENG H. Hierarchical clustering of high-throughput expression data based on general dependences[J]. IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 2013, 10(4):1080-1085.
- [71] CHAN T E, STUMPF M P, BABTIE A C. Gene regulatory network inference from single-cell data using multivariate information measures[J]. Cell systems, 2017, 5(3):251-267.
- [72] GUO M, WANG H, POTTER S S, et al. Sincera: a pipeline for single-cell rna-seq profiling analysis[J]. PLoS computational biology, 2015, 11(11):e1004575.
- [73] HUYNH-THU V A, IRRTHUM A, WEHENKEL L, et al. Inferring regulatory networks from expression data using tree-based methods[J]. PLoS One, 2010, 5 (9):1-10.
- [74] HAURY A C, MORDELET F, VERA-LICONA P, et al. TIGRESS: Trustful Inference of Gene REgulation using Stability Selection[J]. BMC Syst. Biol., 2012, 6(1):145.
- [75] HUYNH-THU V A. Machine learning-based feature ranking: statistical interpretation and gene network inference[D]. Université de Liège, Liège, Belgium, 2012.

- [76] HUYNH-THU V A, SANGUINETTI G, HUYNH-THU A, et al. Combining tree-based and dynamical systems for the inference of gene regulatory networks [J]. *Bioinformatics*, 2014, 31(10):1614-1622.
- [77] AIBAR S, GONZÁLEZ-BLAS C B, MOERMAN T, et al. Scenic: Single-cell regulatory network inference and clustering[J]. *bioRxiv*, 2017:144501.
- [78] SPECHT A T, LI J. Leap: constructing gene co-expression networks for single-cell rna-sequencing data using pseudotime ordering[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33 (5):764-766.
- [79] PAPILI GAO N, UD-DEAN S, GANDRILLON O, et al. Sincerities: inferring gene regulatory networks from time-stamped single cell transcriptional expression profiles[J]. *Bioinformatics*, 2017.
- [80] CORDERO P, STUART J M. Tracing co-regulatory network dynamics in noisy, single-cell transcriptome trajectories[C]//PACIFIC SYMPOSIUM ON BIOCOMPUTING 2017. World Scientific, 2017: 576-587.
- [81] DESHPANDE A, CHU L F, STEWART R, et al. Network inference with granger causality ensembles on single-cell transcriptomic data[J]. *BioRxiv*, 2019:534834.
- [82] VAN ERP M, SCHOMAKER L. Variants of the borda count method for combining ranked classifier hypotheses[C]//IN THE SEVENTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON FRONTIERS IN HANDWRITING RECOGNITION. 2000. AMSTERDAM LEARNING METHODOLOGY INSPIRED BY HUMAN' S INTELLIGENCE BO ZHANG, DAYONG DING, AND LING ZHANG. Cite-seer, 2000.
- [83] ELNITSKI L, JIN V X, FARNHAM P J, et al. Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques[J]. *Genome research*, 2006, 16(12):1455-1464.
- [84] MAETSCHKE S R, MADHAMSHETTIWAR P B, DAVIS M J, et al. Supervised, semi-supervised and unsupervised inference of gene regulatory networks [J]. *Briefings in bioinformatics*, 2013, 15(2):195-211.
- [85] MARGOLIN A A, WANG K, LIM W K, et al. Reverse engineering cellular networks[J]. *Nature protocols*, 2006, 1(2):662.
- [86] LIU L Z, WU F X, ZHANG W J. A group lasso-based method for robustly inferring gene regulatory networks from multiple time-course datasets[J]. *BMC systems biology*, 2014, 8(S3):S1.
- [87] LI M, ZHENG R, LI Y, et al. Mgt-sm: A method for constructing cellular signal

- transduction networks[J]. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, 2017.
- [88] ZHENG R, LI M, CHEN X, et al. Bixgboost: a scalable, flexible boosting-based method for reconstructing gene regulatory networks[J]. Bioinformatics, 2018.
- [89] SAKAMOTO E, IBA H. Inferring a system of differential equations for a gene regulatory network by using genetic programming[C]//Evolutionary Computation, 2001. Proceedings of the 2001 Congress on: volume 1. IEEE, 2001: 720-726.
- [90] CHOWDHURY A R, CHETTY M, EVANS R. Stochastic s-system modeling of gene regulatory network[J]. Cognitive neurodynamics, 2015, 9(5):535-547.
- [91] LI Z, LI P, KRISHNAN A, et al. Large-scale dynamic gene regulatory network inference combining differential equation models with local dynamic bayesian network analysis[J]. Bioinformatics, 2011, 27(19):2686-2691.
- [92] MURPHY K, MIAN S. Modelling gene expression data using dynamic bayesian networks[R]. Technical report, Computer Science Division, University of California, Berkeley, CA, 1999.
- [93] ZOU M, CONZEN S D. A new dynamic bayesian network (dbn) approach for identifying gene regulatory networks from time course microarray data[J]. Bioinformatics, 2004, 21(1):71-79.
- [94] VINH N X, CHETTY M, COPPEL R, et al. Globalmit: learning globally optimal dynamic bayesian network with the mutual information test criterion[J]. Bioinformatics, 2011, 27(19):2765-2766.
- [95] LIU F, ZHANG S W, GUO W F, et al. Inference of Gene Regulatory Network Based on Local Bayesian Networks[J]. PLOS Comput. Biol., 2016, 12(8): e1005024.
- [96] OMRANIAN N, ELOUNDOU-MBEBI J M, MUELLER-ROEBER B, et al. Gene regulatory network inference using fused lasso on multiple data sets[J]. Scientific reports, 2016, 6:20533.
- [97] WU F X, ZHANG W J, KUSALIK A J. Modeling gene expression from microarray expression data with state-space equations[M]//Biocomputing 2004. World Scientific, 2003: 581-592.
- [98] QUACH M, BRUNEL N, D'ALCHÉ BUC F. Estimating parameters and hidden variables in non-linear state-space models based on odes for biological networks inference[J]. Bioinformatics, 2007, 23(23):3209-3216.

- [99] WANG Y, JOSHI T, ZHANG X S, et al. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(19):2413-2420.
- [100] LONGABAUGH W J, DAVIDSON E H, BOLOURI H. Computational representation of developmental genetic regulatory networks[J]. *Developmental biology*, 2005, 283(1):1-16.
- [101] KARLEBACH G, SHAMIR R. Modelling and analysis of gene regulatory networks[J]. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2008, 9(10):770.
- [102] SHMULEVICH I, DOUGHERTY E R, KIM S, et al. Probabilistic boolean networks: a rule-based uncertainty model for gene regulatory networks[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(2):261-274.
- [103] KIM H, LEE J K, PARK T. Boolean networks using the chi-square test for inferring large-scale gene regulatory networks[J]. *BMC bioinformatics*, 2007, 8(1):37.
- [104] BORNHOLDT S. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations[J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2008, 5(Suppl 1):S85-S94.
- [105] ZHOU J X, SAMAL A, D'HÉROUËL A F, et al. Relative stability of network states in boolean network models of gene regulation in development[J]. *Biosystems*, 2016, 142:15-24.
- [106] CHEN X W, ANANTHA G, WANG X. An effective structure learning method for constructing gene networks[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(11):1367-1374.
- [107] NEEDHAM C J, BRADFORD J R, BULPITT A J, et al. A primer on learning in bayesian networks for computational biology[J]. *PLoS computational biology*, 2007, 3(8):e129.
- [108] LO L Y, WONG M L, LEE K H, et al. High-order dynamic bayesian network learning with hidden common causes for causal gene regulatory network[J]. *BMC bioinformatics*, 2015, 16(1):395.
- [109] GARDNER T S, DI BERNARDO D, LORENZ D, et al. Inferring genetic networks and identifying compound mode of action via expression profiling[J]. *Science*, 2003, 301(5629):102-105.
- [110] DI BERNARDO D, THOMPSON M J, GARDNER T S, et al. Chemogenomic profiling on a genome-wide scale using reverse-engineered gene networks[J]. *Nature biotechnology*, 2005, 23(3):377-383.
- [111] BANSAL M, GATTA G D, DI BERNARDO D. Inference of gene regulatory networks and compound mode of action from time course gene expression profiles

- [J]. Bioinformatics, 2006, 22(7):815-822.
- [112] HONKELA A, GIRARDOT C, GUSTAFSON E H, et al. Model-based method for transcription factor target identification with limited data[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(17):7793-7798.
- [113] LU T, LIANG H, LI H, et al. High-dimensional odes coupled with mixed-effects modeling techniques for dynamic gene regulatory network identification[J]. Journal of the American Statistical Association, 2011, 106(496):1242-1258.
- [114] LEE W P, TZOU W S. Computational methods for discovering gene networks from expression data[J]. Briefings in bioinformatics, 2009, 10(4):408-423.
- [115] CHICKERING D M, HECKERMAN D, MEEK C. Large-sample learning of bayesian networks is np-hard[J]. Journal of Machine Learning Research, 2004, 5 (Oct):1287-1330.
- [116] MARBACH D, COSTELLO J C, KÜFFNER R, et al. Wisdom of crowds for robust gene network inference[J]. Nature methods, 2012, 9(8):796-804.
- [117] WU F X. Inference of gene regulatory networks and its validation[J]. Current Bioinformatics, 2007, 2(2):139-144.
- [118] LIU L Z, WU F X, ZHANG W J. Reverse engineering of gene regulatory networks from biological data[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Data Mining and Knowledge Discovery, 2012, 2(5):365-385.
- [119] LI M, GAO H, WANG J, et al. Control principles for complex biological networks [J]. Briefings in bioinformatics, 2018.
- [120] WANG Y R, HUANG H. Review on statistical methods for gene network reconstruction using expression data[J]. Journal of theoretical biology, 2014, 362: 53-61.
- [121] RUYSSINCK J, GEURTS P, DHAENE T, et al. Nimefi: gene regulatory network inference using multiple ensemble feature importance algorithms[J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92709.
- [122] MARBACH D, PRILL R J, SCHAFFTER T, et al. Revealing strengths and weaknesses of methods for gene network inference[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2010, 107(14):6286-6291.
- [123] JEONG H, TOMBOR B, ALBERT R, et al. The large-scale organization of metabolic networks[J]. Nature, 2000, 407(6804):651-654.
- [124] SPIRITES P, GLYMOUR C N, SCHEINES R. Causation, prediction, and search

- [M]. MIT press, 2000.
- [125] SCHAFFTER T, MARBACH D, FLOREANO D. Genenetworker: in silico benchmark generation and performance profiling of network inference methods [J]. Bioinformatics, 2011, 27(16):2263-2270.
- [126] SAITO T, REHMSMEIER M. The precision-recall plot is more informative than the roc plot when evaluating binary classifiers on imbalanced datasets[J]. PloS one, 2015, 10(3):e0118432.
- [127] MEYER P E, LAFITTE F, BONTEMPI G. minet: R/bioconductor package for inferring large transcriptional networks using mutual information[J]. BMC bioinformatics, 2008, 9(1):461.
- [128] OLSEN C, MEYER P E, BONTEMPI G. On the impact of entropy estimation on transcriptional regulatory network inference based on mutual information [J]. EURASIP Journal on Bioinformatics and Systems Biology, 2008, 2009(1): 308959.
- [129] MEYER P, MARBACH D, ROY S, et al. Information-theoretic inference of gene networks using backward elimination.[C]//BioComp. 2010: 700-705.
- [130] LI M, MENG X, ZHENG R, et al. Identification of protein complexes by using a spatial and temporal active protein interaction network[J]. IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 2017.
- [131] LI M, YANG J, WU F X, et al. Dynetviewer: a cytoscape app for dynamic network construction, analysis and visualization[J]. Bioinformatics, 2017, 34(9):1597-1599.
- [132] LEE T I, RINALDI N J, ROBERT F, et al. Transcriptional regulatory networks in *saccharomyces cerevisiae*[J]. science, 2002, 298(5594):799-804.
- [133] HARBISON C T, GORDON D B, LEE T I, et al. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome[J]. Nature, 2004, 431(7004):99.
- [134] TRAPNELL C, CACCHIARELLI D, GRIMSBY J, et al. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells[J]. Nature biotechnology, 2014, 32(4):381.
- [135] BOYLE E A, LI Y I, PRITCHARD J K. An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic[J]. Cell, 2017, 169(7):1177-1186.
- [136] LE NOVERE N. Quantitative and logic modelling of molecular and gene networks[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(3):146.

- [137] HUYNH-THU V A, SANGUINETTI G. Gene regulatory network inference: an introductory survey[J]. arXiv preprint arXiv:1801.04087, 2018.
- [138] STEUER R, KURTHS J, DAUB C O, et al. The mutual information: detecting and evaluating dependencies between variables[J]. Bioinformatics, 2002, 18(suppl_2):S231-S240.
- [139] UDA S, SAITO T H, KUDO T, et al. Robustness and compensation of information transmission of signaling pathways[J]. Science, 2013, 341(6145):558-561.
- [140] MC MAHON S S, LENIVE O, FILIPPI S, et al. Information processing by simple molecular motifs and susceptibility to noise[J]. Journal of The Royal Society Interface, 2015, 12(110):20150597.
- [141] Chen X, Li M, Zheng R, et al. A novel method of gene regulatory network structure inference from gene knock-out expression data[J]. Tsinghua Science and Technology, 2019, 24(4):446-455.
- [142] KAUFFMAN S. Homeostasis and differentiation in random genetic control networks[J]. Nature, 1969, 224(5215):177.
- [143] LIANG J, HAN J. Stochastic boolean networks: an efficient approach to modeling gene regulatory networks[J]. BMC systems biology, 2012, 6(1):113.
- [144] FRIEDMAN N, KOLLER D. Being bayesian about network structure. a bayesian approach to structure discovery in bayesian networks[J]. Machine learning, 2003, 50(1-2):95-125.
- [145] HILL S M, LU Y, MOLINA J, et al. Bayesian inference of signaling network topology in a cancer cell line[J]. Bioinformatics, 2012, 28(21):2804-2810.
- [146] BONNEAU R, REISS D J, SHANNON P, et al. The inferelator: an algorithm for learning parsimonious regulatory networks from systems-biology data sets de novo[J]. Genome biology, 2006, 7(5):1.
- [147] KIKUCHI S, TOMINAGA D, ARITA M, et al. Dynamic modeling of genetic networks using genetic algorithm and s-system[J]. Bioinformatics, 2003, 19(5): 643-650.
- [148] WANG H, QIAN L, DOUGHERTY E. Inference of gene regulatory networks using s-system: a unified approach[J]. IET systems biology, 2010, 4(2):145-156.
- [149] LIU L Z, WU F X, ZHANG W J. Inference of biological s-system using the separable estimation method and the genetic algorithm[J]. IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, 2012, 9(4):955-965.

- [150] HUYNH-THU V A, IRRTHUM A, WEHENKEL L, et al. Inferring regulatory networks from expression data using tree-based methods[J]. PLoS ONE, 2010, 5(9):e12776.
- [151] ZOU H, HASTIE T. Regularization and variable selection via the elastic net[J]. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology), 2005, 67(2):301-320.
- [152] SINGH N, VIDYASAGAR M. blars: an algorithm to infer gene regulatory networks[J]. IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 2016, 13(2):301-314.
- [153] BRUNTON S L, PROCTOR J L, KUTZ J N. Discovering governing equations from data by sparse identification of nonlinear dynamical systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(15):3932-3937.
- [154] CASADIEGO J, NITZAN M, HALLERBERG S, et al. Model-free inference of direct network interactions from nonlinear collective dynamics[J]. Nature communications, 2017, 8(1):2192.
- [155] ŚLAWEK J, ARODŹ T. Ennet: inferring large gene regulatory networks from expression data using gradient boosting[J]. BMC systems biology, 2013, 7(1):106.
- [156] GUO S, JIANG Q, CHEN L, et al. Gene regulatory network inference using pls-based methods[J]. BMC bioinformatics, 2016, 17(1):545.
- [157] ZHENG R, LI M, CHEN X, et al. An ensemble method to reconstruct gene regulatory networks based on multivariate adaptive regression splines[J]. IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 2019.
- [158] STOLOVITZKY G, MONROE D, CALIFANO A. Dialogue on reverse-engineering assessment and methods[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1115(1):1-22.
- [159] NASRABADI N M. Pattern recognition and machine learning[J]. Journal of electronic imaging, 2007, 16(4):049901.
- [160] FRIEDMAN J, HASTIE T, TIBSHIRANI R. The elements of statistical learning: volume 1[M]. Springer series in statistics New York, 2001.
- [161] MAJUMDAR A, WARD R K. Fast group sparse classification[J]. Canadian Journal of Electrical and Computer Engineering, 2009, 34(4):136-144.
- [162] FRIEDMAN J, HASTIE T, TIBSHIRANI R. A note on the group lasso and a sparse group lasso[J]. arXiv preprint arXiv:1001.0736, 2010.

- [163] EFRON B, TIBSHIRANI R J. An introduction to the bootstrap[M]. CRC press, 1994.
- [164] WANG S, NAN B, ROSSET S, et al. Random lasso[J]. The annals of applied statistics, 2011, 5(1):468.
- [165] MARBACH D, SCHAFFTER T, MATTIUSSI C, et al. Generating realistic in silico gene networks for performance assessment of reverse engineering methods [J]. Journal of computational biology, 2009, 16(2):229-239.
- [166] MANGAN N M, BRUNTON S L, PROCTOR J L, et al. Inferring biological networks by sparse identification of nonlinear dynamics[J]. IEEE Transactions on Molecular, Biological and Multi-Scale Communications, 2016, 2(1):52-63.
- [167] VERA-LICONA P, MARBACH D, IRRTHUM A, et al. Wisdom of crowds for robust gene network inference[J]. Nature Methods, 2012, 9(8):796-804.
- [168] ZHENG C H, HUANG D S, KONG X Z, et al. Gene expression data classification using consensus independent component analysis[J]. Genomics, proteomics & bioinformatics, 2008, 6(2):74-82.
- [169] KUMAR P, TAN Y, CAHAN P. Understanding development and stem cells using single cell-based analyses of gene expression[J]. Development, 2017, 144(1): 17-32.
- [170] PATEL A P, TIROSH I, TROMBETTA J J, et al. Single-cell rna-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma[J]. Science, 2014, 344(6190): 1396-1401.
- [171] SLANSKY J E. Antigen-specific t cells: analyses of the needles in the haystack [J]. PLoS biology, 2003, 1(3):e78.
- [172] ALTMAN J D, MOSS P A, GOULDER P J, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific t lymphocytes[J]. Science, 1996, 274(5284):94-96.
- [173] MANZO T, HESLOP H E, ROONEY C M. Antigen-specific t cell therapies for cancer[J]. Human molecular genetics, 2015, 24(R1):R67-R73.
- [174] KUO Y H, LIN C H, SHAU W Y, et al. Dynamics of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in breast cancer patients receiving cytotoxic chemotherapy[J]. BMC cancer, 2012, 12(1):620.
- [175] CIMA I, KONG S L, SENGUPTA D, et al. Tumor-derived circulating endothelial cell clusters in colorectal cancer[J]. Science translational medicine, 2016, 8(345): 345ra89-345ra89.

- [176] JANG Y Y, SHARKIS S J. Stem cell plasticity[J]. *Stem cell reviews*, 2005, 1(1): 45-51.
- [177] KREBS M G, HOU J M, WARD T H, et al. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes[J]. *Therapeutic advances in medical oncology*, 2010, 2(6):351-365.
- [178] GRÜN D, LYUBIMOVA A, KESTER L, et al. Single-cell messenger rna sequencing reveals rare intestinal cell types[J]. *Nature*, 2015, 525(7568):251.
- [179] JIANG L, CHEN H, PINELLO L, et al. Giniclust: detecting rare cell types from single-cell gene expression data with gini index[J]. *Genome biology*, 2016, 17 (1):144.
- [180] JINDAL A, GUPTA P, SENGUPTA D, et al. Discovery of rare cells from voluminous single cell expression data[J]. *Nature communications*, 2018, 9(1):4719.
- [181] ESTER M, KRIEGEL H P, SANDER J, et al. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise.[C]//Kdd: volume 96. 1996: 226-231.
- [182] WANG Z, DONG W, JOSEPHSON W, et al. Sizing sketches: a rank-based analysis for similarity search[C]//ACM SIGMETRICS Performance Evaluation Review: volume 35. ACM, 2007: 157-168.
- [183] LIU F T, TING K M, ZHOU Z H. Isolation forest[C]//2008 Eighth IEEE International Conference on Data Mining. IEEE, 2008: 413-422.
- [184] ZHENG G X, TERRY J M, BELGRADER P, et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells[J]. *Nature communications*, 2017, 8:14049.
- [185] ZAPPIA L, PHIPSON B, OSHLACK A. Splatter: simulation of single-cell rna sequencing data[J]. *Genome biology*, 2017, 18(1):174.
- [186] MACOSKO E Z, BASU A, SATIJA R, et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets[J]. *Cell*, 2015, 161 (5):1202-1214.
- [187] HARIRI S, KIND M C. Batch and online anomaly detection for scientific applications in a kubernetes environment[C]//Proceedings of the 9th Workshop on Scientific Cloud Computing. ACM, 2018: 3.
- [188] SUSTO G A, BEGHI A, MCLOONE S. Anomaly detection through on-line isolation forest: An application to plasma etching[C]//Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics (MIPRO), 2017 40th International Convention on. IEEE, 2017: 89-94.

- [189] NOTO K, BRODLEY C, SLONIM D. Anomaly detection using an ensemble of feature models[C]//Data Mining (ICDM), 2010 IEEE 10th International Conference on. IEEE, 2010: 953-958.
- [190] CHEN G, CAI Y L, SHI J. Ordinal isolation: An efficient and effective intelligent outlier detection algorithm[C]//Cyber Technology in Automation, Control, and Intelligent Systems (CYBER), 2011 IEEE International Conference on. IEEE, 2011: 21-26.
- [191] DAS S, WONG W K, DIETTERICH T, et al. Incorporating expert feedback into active anomaly discovery[C]//Data Mining (ICDM), 2016 IEEE 16th International Conference on. IEEE, 2016: 853-858.
- [192] LIU F T, TING K M, ZHOU Z H. Isolation-based anomaly detection[J]. ACM Transactions on Knowledge Discovery from Data (TKDD), 2012, 6(1):3.
- [193] KISELEV V Y, KIRSCHNER K, SCHaub M T, et al. Sc3: consensus clustering of single-cell rna-seq data[J]. Nature methods, 2017, 14(5):483.
- [194] POUYAN M B, KOSTKA D. Random forest based similarity learning for single cell rna sequencing data[J]. Bioinformatics, 2018, 34(13):i79-i88.
- [195] MOHAMMADI S, RAVINDRA V, GLEICH D F, et al. A geometric approach to characterize the functional identity of single cells[J]. Nature communications, 2018, 9(1):1516.
- [196] SINHA D, KUMAR A, KUMAR H, et al. dropclust: efficient clustering of ultra-large scrna-seq data[J]. Nucleic acids research, 2018, 46(6):e36-e36.
- [197] SRINIVASAN S, JOHNSON N T, KORKIN D. A hybrid deep clustering approach for robust cell type profiling using single-cell rna-seq data[J/OL]. bioRxiv, 2019. <https://www.biorxiv.org/content/early/2019/01/04/511626>.
- [198] LI X, LYU Y, PARK J, et al. Deep learning enables accurate clustering and batch effect removal in single-cell rna-seq analysis[J/OL]. bioRxiv, 2019. <https://www.biorxiv.org/content/early/2019/01/25/530378>.
- [199] ZHENG R, LI M, LIANG Z, et al. Sinnlrr: a robust subspace clustering method for cell type detection by nonnegative and low rank representation[J]. Bioinformatics, 2019.
- [200] THORNDIKE R L. Who belongs in the family?[J]. Psychometrika, 1953, 18(4): 267-276.
- [201] BREIMAN L. Random forests[J]. Machine learning, 2001, 45(1):5-32.

- [202] SHI T, HORVATH S. Unsupervised learning with random forest predictors[J]. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 2006, 15(1):118-138.
- [203] BREIMAN L, CUTLER A. Manual—setting up, using, and understanding random forests v4. 0. 2003[J]. URL https://www.stat.berkeley.edu/~breiman/Using_random_forests_v4.0.pdf, 2011.
- [204] HENNIG C. fpc: Flexible procedures for clustering[M/OL]. 2018. <https://CRAN.R-project.org/package=fpc>.
- [205] LIAW A, WIENER M. Classification and regression by randomforest[J/OL]. *R News*, 2002, 2(3):18-22. <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>.
- [206] LANGFELDER P, ZHANG B, HORVATH S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the dynamic tree cut package for r[J]. *Bioinformatics*, 2007, 24 (5):719-720.
- [207] LANGFELDER P, ZHANG B, WITH CONTRIBUTIONS FROM STEVE HORVATH. dynamicTreeCut: Methods for detection of clusters in hierarchical clustering dendrograms[M/OL]. 2016. <https://CRAN.R-project.org/package=dynamicTreeCut>.
- [208] SENGUPTA D, RAYAN N A, LIM M, et al. Fast, scalable and accurate differential expression analysis for single cells[J/OL]. *bioRxiv*, 2016. <https://www.biorxiv.org/content/early/2016/04/22/049734>.
- [209] HUBERT L, ARABIE P. Comparing partitions[J]. *Journal of classification*, 1985, 2(1):193-218.
- [210] WU F X, ZHANG W J, KUSALIK A J. Dynamic model-based clustering for time—course gene expression data[J]. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2005, 3(04):821-836.
- [211] CAMPBELL J N, MACOSKO E Z, FENSELAU H, et al. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types[J]. *Nature neuroscience*, 2017, 20(3):484.
- [212] BIASE F, CAO X, ZHONG S. Cell fate inclination within 2-cell and 4-cell mouse embryos revealed by single-cell rna sequencing[J]. *Genome research*, 2014:gr-177725.
- [213] TREUTLEIN B, BROWNFIELD D G, WU A R, et al. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell rna-seq[J]. *Nature*, 2014, 509(7500):371.
- [214] POLLEN A A, NOWAKOWSKI T J, SHUGA J, et al. Low-coverage single-cell

- mrna sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex[J]. *Nature biotechnology*, 2014, 32(10):1053.
- [215] KOLODZIEJCZYK A A, KIM J K, TSANG J C, et al. Single cell rna-sequencing of pluripotent states unlocks modular transcriptional variation[J]. *Cell stem cell*, 2015, 17(4):471-485.
- [216] USOSKIN D, FURLAN A, ISLAM S, et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell rna sequencing[J]. *Nature neuroscience*, 2015, 18(1):145.
- [217] ZEISEL A, MUÑOZ-MANCHADO A B, CODELUPPI S, et al. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell rna-seq[J]. *Science*, 2015, 347(6226):1138-1142.
- [218] DARMANIS S, SLOAN S A, ZHANG Y, et al. A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(23):7285-7290.
- [219] TASIC B, MENON V, NGUYEN T N, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics[J]. *Nature neuroscience*, 2016, 19(2):335.
- [220] GOOLAM M, SCIALDONE A, GRAHAM S J, et al. Heterogeneity in oct4 and sox2 targets biases cell fate in 4-cell mouse embryos[J]. *Cell*, 2016, 165(1):61-74.
- [221] LI H, COURTOIS E T, SENGUPTA D, et al. Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors[J]. *Nature genetics*, 2017, 49(5):708.
- [222] GRÜN D, MURARO M J, BOISSET J C, et al. De novo prediction of stem cell identity using single-cell transcriptome data[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(2):266-277.
- [223] LIN P, TROUP M, HO J W. Cidr: Ultrafast and accurate clustering through imputation for single-cell rna-seq data[J]. *Genome biology*, 2017, 18(1):59.
- [224] WANG B, RAMAZZOTTI D, DE SANO L, et al. Simlr: A tool for large-scale genomic analyses by multi-kernel learning[J]. *Proteomics*, 2018, 18(2):1700232.
- [225] YANG Y, HUH R, CULPEPPER H W, et al. Safe-clustering: Single-cell aggregated (from ensemble) clustering for single-cell rna-seq data[J]. *bioRxiv*, 2018: 215723.
- [226] HARTIGAN J A, WONG M A. Algorithm as 136: A k-means clustering algorithm[J]. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*, 1979, 28(1):100-108.

- [227] MAATEN L V D, HINTON G. Visualizing data using t-sne[J]. *Journal of machine learning research*, 2008, 9(Nov):2579-2605.
- [228] VAN DER MAATEN L. Accelerating t-sne using tree-based algorithms[J]. *The Journal of Machine Learning Research*, 2014, 15(1):3221-3245.
- [229] VILLANI A C, SATIJA R, REYNOLDS G, et al. Single-cell rna-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors[J]. *Science*, 2017, 356(6335):eaah4573.
- [230] BREUNIG M M, KRIEGEL H P, NG R T, et al. Lof: identifying density-based local outliers[C]//ACM sigmod record: volume 29. ACM, 2000: 93-104.
- [231] PEDREGOSA F, VAROQUAUX G, GRAMFORT A, et al. Scikit-learn: Machine learning in python[J]. *Journal of machine learning research*, 2011, 12(Oct):2825-2830.
- [232] ZHAO Y, NASRULLAH Z, LI Z. Pyod: A python toolbox for scalable outlier detection[J/OL]. arXiv preprint arXiv:1901.01588, 2019. <https://arxiv.org/abs/1901.01588>.
- [233] AGGARWAL C C, SATHE S. Theoretical foundations and algorithms for outlier ensembles[J]. *ACM Sigkdd Explorations Newsletter*, 2015, 17(1):24-47.
- [234] LIU Y, LI Z, ZHOU C, et al. Generative adversarial active learning for unsupervised outlier detection[J]. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*, 2019.
- [235] WENG Y, ZHANG N, XIA C. Multi-agent-based unsupervised detection of energy consumption anomalies on smart campus[J]. *IEEE Access*, 2019, 7:2169-2178.
- [236] EISEN M B, SPELLMAN P T, BROWN P O, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(25):14863-14868.
- [237] SEGAL E, SHAPIRA M, REGEV A, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data [J]. *Nature genetics*, 2003, 34(2):166-176.
- [238] LIBERZON A, BIRGER C, THORVALDSDÓTTIR H, et al. The molecular signatures database hallmark gene set collection[J]. *Cell systems*, 2015, 1(6):417-425.
- [239] AMIR E A D, DAVIS K L, TADMOR M D, et al. visne enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity

- of leukemia[J]. *Nature biotechnology*, 2013, 31(6):545-552.
- [240] SATIJA R, FARRELL J A, GENNERT D, et al. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data[J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(5):495-502.
- [241] SCIALDONE A, NATARAJAN K N, SARAIVA L R, et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data[J]. *Methods*, 2015, 85:54-61.
- [242] CHEN M, ZHOU X. Controlling for confounding effects in single cell rna sequencing studies using both control and target genes[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1):1-14.
- [243] KLEIN A M, MAZUTIS L, AKARTUNA I, et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells[J]. *Cell*, 2015, 161(5):1187-1201.
- [244] GOEMAN J, MEIJER R, CHATURVEDI N, et al. penalized: L1 (lasso and fused lasso) and l2 (ridge) penalized estimation in glms and in the cox model[J]. URL <http://cran.r-project.org/web/packages/penalized/index.html>, 2012.
- [245] GOEMAN J J. L1 penalized estimation in the cox proportional hazards model[J]. *Biometrical journal*, 2010, 52(1):70-84.
- [246] HAN H, CHO J W, LEE S, et al. Trrrust v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions[J]. *Nucleic acids research*, 2018, 46(D1):D380-D386.
- [247] BRUNET J P, TAMAYO P, GOLUB T R, et al. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2004, 101(12):4164-4169.
- [248] WU S, JOSEPH A, HAMMONDS A S, et al. Stability-driven nonnegative matrix factorization to interpret spatial gene expression and build local gene networks[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(16):4290-4295.
- [249] DING J, CONDON A, SHAH S P. Interpretable dimensionality reduction of single cell transcriptome data with deep generative models[J]. *Nature communications*, 2018, 9(1):1-13.
- [250] GRØNBECH C H, VORDING M F, TIMSHEL P N, et al. scvae: Variational auto-encoders for single-cell gene expression datas[J]. *bioRxiv*, 2018:318295.

攻读学位期间主要研究成果

学术论文

- [1] **Daxia Guo**, Director, Someone. CSU Latex Template[J]. CSU player: 1(1):1-10.
(SCI 检索,JCR 1 区)
- [2] Director, **Daxia Guo**, Someone, Someother. XXXXXX[J]. Transactions on Image Processing. (SCI Under Review,JCR 1 区)
- [3] Director, **Daxia Guo**, Someone, Someother. XXXXXX[J]. Transactions on Circuits and Systems for Video Technology. (SCI Under Review,JCR 1 区)

发明专利

- [1] 郭大侠,XXX,XXX. 一种用 Latex 写中南大学学位论文的方法. 申请号:CN20190415xxxx,
公开号: CNXXXXXXXXXXA

主持和参与的科研项目

- [1] 国家自然科学基金面上项目《XXXXXXXXXXXXXX》, 项目编号: XXXXXXXX,
参与.

个人获奖情况

- [1] XX 金奖
- [2] XX 奖学金

致谢

六年的博士生涯就要画上一个句点, 行笔至此, 黯然神伤不能自己。回想自己从程序员转变为科研工作者, 从师弟转变为师兄, 从单身转变为两个孩子的父亲, 斗转星移, 仿佛过了很久, 恍惚又觉得是刹那之间。这六年的研究生涯, 也许是人生之旅压力最大、自我反省最为频繁的时段, 幸好有幸遇到了各位良师益友, 和家人的陪伴, 常思奋不顾身以全力以赴, 然而个人能力实在有限, 但是只取得了一点点成绩, 也留下很多遗憾。博士阶段从本质上讲是一种不断思考不断妥协不断前进的生活状态, 学位只在其表, 博士虽然即将结束了但这种状态将会常伴一生。

首先要万分感谢我的导师李敏教授, 亦师亦友。六年里面耳濡目染, 学术上严谨、认真, 有目标, 有计划, 敢想敢执行; 工作上认真负责, 一丝不苟, 不骄不躁; 生活上待人接物温文尔雅, 让人如沐春风。论文的最初的选题立意和旷日持久的实验, 离不开李老师的谆谆教导。生活上李老师给予了我极大的帮助, 排忧解难, 让我安心科研。祝李老师万事如意、身体健康, 永远美丽, 永远幸福。十分感谢王建新教授、潘毅教授、吴方向教授、黎耀航教授。王建新老师学术渊博, 潘毅老师幽默风趣, 吴方向老师严谨认真, 黎耀航老师亲和有为。他们在学术上功力深厚, 看问题一针见血, 散发着独特的人格魅力。高山仰止, 景行行止, 虽不能至, 然心向往之。感谢钟坚成老师、罗军伟老师、罗慧敏老师、彭晓清老师、刘锦老师、李洪东老师, 感谢你们对我生活和学业上的无私帮助和指导, 祝您们步步高升。感谢段桂华老师、盛羽老师, 感谢您们这些年对实验室的支持。

其次我要感谢生物组这个大家庭, 感谢 213、216 实验室的各位同学, 六年时间遇到了太多值得学习的师兄师姐师弟和师妹, 他们身上闪烁着对知识的渴望, 对生活的热爱和对自我的不断超越, 点点滴滴时刻让我深受鼓舞、不敢懈怠。同学名单很长, 但恐有遗漏, 故不在这里详细罗列, 转而在网络上维护一份列表¹。在他们身上我学到了许多, 祝你们学业和事业心想事成, 幸福美满。

再次要感谢我的父母、岳父岳母、妻子、哥哥嫂子, 还有两个可爱的女儿。身体发肤受之于父母, 父母的爱如高山流水长; 岳父岳母是再生父母, 他们的恩情深沉而博大。四位老人年逾天命, 两鬓霜凝, 六年时间里, 间断帮我抚养小孩, 接济不时之需, 观父母容颜渐改, 垂垂老矣, 我狠未能建功立业, 每每念及至此羞愧难当。结草衔环, 当终身不忘。感谢妻子的默默陪伴, 与我组建了一个美满的家庭, 让你受了很多苦, 有时候惹你生气, 大部分时候是我错了。希望一如既往, 携手前进, 白头偕老。哥哥和嫂子远在深圳, 这六年间替我扛下了父母赡养之事代行子女之孝, 在生活上和思想上给了我诸多帮助和启发, 谢谢你们的支持和付出! 还要谢谢我的两个女儿陈康羲和陈康和, 你们的降临给家庭带来了无穷的欢乐和喜悦, 也祝你

¹<https://github.com/chenxofhit/PhdThesis/tree/master/acknowledgement.txt>

们永远幸福快乐健康。

最后感谢中南大学给了我这样的学习机会,让我在一流的平台里遇到诸多良师益友,安心学习和享受生活。祝愿中南大学计算机学院在王建新院长(教授)的带领下,在诸位老师的辛勤耕耘下,桃李满天下,更上一层楼。在我的本科和硕士论文的致谢末尾都有一句海子的诗,在此也献给读到这里的每一个人:愿你有一个灿烂的前程,愿你有情人终成眷属,愿你在尘世获得幸福。