甜过初恋！这次是真的批量做TCGA的生存分析

Original 2017-12-04 果子 生信技能树

大家好，今天是12月4号，农历10月17，额，好像今天除了要开组会以外，也不是个什么特别的日子。

在刚刚进入生信领域的时候，我想做的事情就是三个，

第一知道任何我想研究的基因在组织中的表达情况，

第二，我选的基因对肿瘤的生存有无影响，

第三这个基因可能的作用是什么？

这是来自临床医生的视角，研究疾病，最终希望能够服务临床，临床离不开诊断和治疗，假设一个基因的表达对肿瘤的预后有影响，他很可能就是我的盘中餐。

有一大堆网页工具可以实现生存分析，但是你看看jimmy已经写的帖子

都可以批量做生存分析了，还要网页工具干嘛？

一拳把人打翻在地，扶都扶不起来。 但是没有办法他是群主。即使会随时被朝阳群众扭送到派出所，他依然是群主，他的排版有问题，但是架不住他的内容有深度，群主喜闻乐见。

那么问题来了，上面的问题也可以反过来问，既然别人已经准备好了网页工具给你用，你还写代码做什么？！

> 四个字，批量，自由

大气一点就是高端定制。

就这么简单。 那开始我们的表演：

今天我们要对TCGA里面的任意基因做生存分析，最关键的我们要批量做生存分析，然后选取生存差异最显著的基因。

首先安装需要的包：

```
# Load the bioconductor installer.
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
options(BioC_mirror="https://mirrors.ustc.edu.cn/bioc/")

# Install the main RTCGA package
biocLite("RTCGA")

# Install the clinical and mRNA gene expression data packages
biocLite("RTCGA.clinical")
biocLite("RTCGA.mRNA")
```

然后是加载包

```
library(RTCGA)
#了解数据
infoTCGA <- infoTCGA() #这个命令会返回一个数据框，可以知道有哪些数据可被下载
#获得临床数据：
# Create the clinical data
library(RTCGA.clinical)
clin <- survivalTCGA(BRCA.clinical) #到这里临床部分的信息已经获得啦
```

得到数据后我们先看一下他是什么结构

```
class()
```

> [1] "data.frame"

再看一下前面几行数据

```
head(clin)
```

> times bcr*patient*barcode patient.vital_status 1 3767 TCGA-3C-AAAU 0 2 3801 TCGA-3C-AALI 0 3 1228 TCGA-3C-AALJ 0 4 1217 TCGA-3C-AALK 0 5 158 TCGA-4H-AAAK 0 6 1477 TCGA-5L-AAT0 0

简单说就是三列，TCAGid，生存时间，和发生的事件

获得gene表达数据：

```
library(RTCGA.mRNA) #加载数据包
class(BRCA.mRNA)  #查看数据类型发现是个数据框
dim(BRCA.mRNA)  #看一下数据维度发现有590个样本，17815个基因
BRCA.mRNA[1:5, 1:5] #看一下部分数据样子
```

```
      bcr_patient_barcode    ELMO2  CREB3L1    RPS11  PNMA1
```

> 1 TCGA-A1-A0SD-01A-11R-A115-07 0.5070833 1.43450 0.765000 0.52600 2 TCGA-A1-A0SE-01A-11R-A084-07 0.1814167 0.89075 0.716000 0.13175 3 TCGA-A1-A0SH-01A-11R-A084-07 0.4615000 2.25925 0.417125 0.32500 4 TCGA-A1-A0SJ-01A-11R-A084-07 0.8770000 0.43775 0.115000 0.75775 5 TCGA-A1-A0SK-01A-12R-A084-07 1.4123333 -0.63725 0.492875 0.94325

好了，行是样本，列为gene 下面我们挑选几个基因的表达数据出来，融合到生存的数据上去，因为表达量数据中TCGA的id号要长一点 所以在融合前，需要先裁剪一下，为了避免产生过多的中间变量，我们使用管道符号%>%,他的作用是 把前一个计算得到结果，作为第二个函数的参数，示例如下：

```
library(dplyr)
exprSet <- BRCA.mRNA %>%
  # then make it a tibble (nice printing while debugging)
  as_tibble() %>%
  # then get just a few genes,这里是测试用
  select(bcr_patient_barcode, PAX8, GATA3, ESR1) %>%
  # then trim the barcode (see head(clin), and substr)
  mutate(bcr_patient_barcode = substr(bcr_patient_barcode, 1, 12)) %>%
  # then join back to clinical data
  inner_join(clin, by="bcr_patient_barcode")
```

看一下数据，发现就是表达量加上time，event两列，所以记住这规律，最终批量的时候需要减掉这两列

	bcr_patient_barcode	PAX8	GATA3	ESR1	times	patient.vital_status
1	TCGA-A1-A0SD	-0.5422500	2.870500	3.08425000	437	0
2	TCGA-A1-A0SE	-0.5947500	2.166250	2.38600000	1321	0
3	TCGA-A1-A0SH	0.4997500	1.323500	0.79125000	1437	0
4	TCGA-A1-A0SJ	-0.5885000	1.841625	2.49541667	416	0
5	TCGA-A1-A0SK	-0.9647500	-6.025250	-4.86066667	967	1
6	TCGA-A1-A0SM	0.5727500	1.804500	2.79700000	242	0
7	TCGA-A1-A0SO	-0.6847500	-4.879250	-4.48608333	852	0

mark

开始做生存分析

```
1. library(survival)
2. library(survminer)
```

对需要做生存分析的样本分组，把连续变量变成分类变量，这里选择测试的基因是GATA3

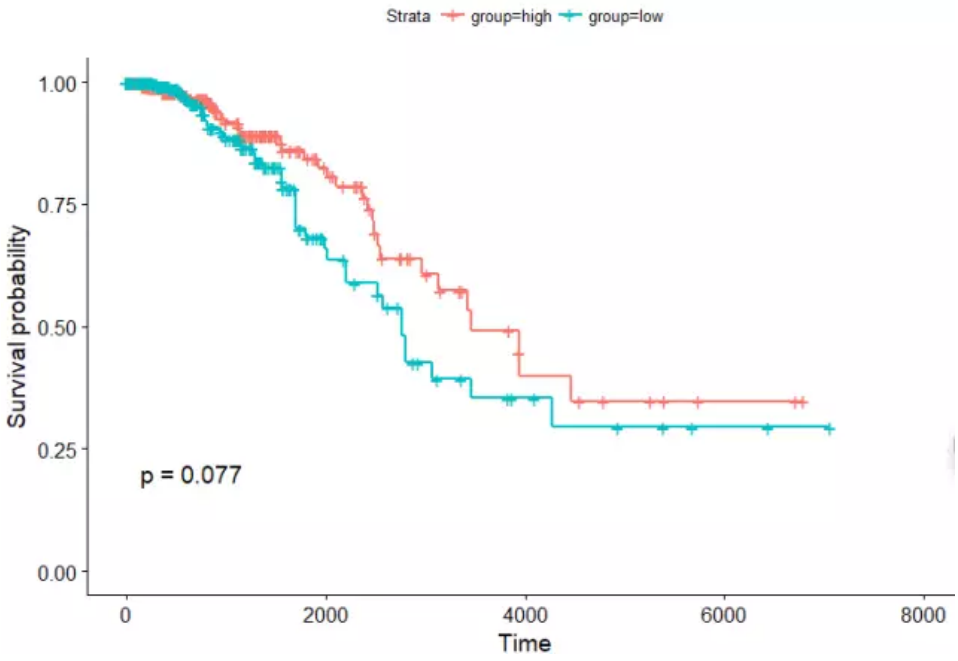
```
1. group <- ifelse(esprSet$GATA3>median(esprSet$GATA3),'high','low')
```

构建生存对象，并且进行数据处理，这里是两步，我只是融合在了一起

```
1. sfit <- survfit(Surv(times, patient.vital_status)~group, data=esprSet)
2. sfit
3. summary(sfit)
```

直接绘图

```
1. ggsurvplot(sfit, conf.int=F, pval=TRUE)
```



mark

单个基因绘制成功，我看一下能不能小规模循环操作 首先得到得到生存对象my.surv

```
1. my.surv <- Surv(esprSet$times, esprSet$patient.vital_status)
```

使用apply循环,对数据的2到4列进行操作，实际上就是PAX8, GATA3, ESR1这三个基因， 这里面使用了survdiff，用来比较差异大小，获得p值

```
1. log_rank_p <- apply(esprSet[,2:4], 2, function(values1){
2.   group=ifelse(values1>median(values1),'high','low')
3.   kmfit2 <- survfit(my.surv~group,data=esprSet)
4.   #plot(kmfit2)
5.   data.survdiff=survdiff(my.surv~group)
6.   p.val = 1 - pchisq(data.survdiff$chisq, length(data.survdiff$n) - 1)
7. })
```

运行完了之后返回的找出小于0.05的P.val，在这个例子里面因为没有基因的p.val小于0.05，所以筛选不出来

```
1. log_rank_p <- log_rank_p[log_rank_p<0.05]
```

筛选后排序，并获得基因名 gene*diff <- as.data.frame(sort(log*rank_p))

好了生存数据已经获取，

表达数据小规模试验可行，

批量操作也能实现，

下面就进入实战环节，前戏实在太长，但是你要相信你只要不睡着，这些都是值得的

获得完整的表达量数据

```
library(dplyr)
esprSet <- BRCA.mRNA %>%
  # then make it a tibble (nice printing while debugging)
  as_tibble() %>%
  # then trim the barcode (see head(clin), and ?substr)
  mutate(bcr_patient_barcode = substr(bcr_patient_barcode, 1, 12)) %>%
  # then join back to clinical data
  inner_join(clin, by="bcr_patient_barcode")
```

构建生存对象my.surv

```
library(survival)
my.surv <- Surv(esprSet$times, esprSet$patient.vital_status)
```

在进行下一步之前，我居然突发奇想，我想看一看，这个表达数据里面哪些基因的NA值最多，有没有NA值多过样本数量一般的基因呢？ 先构建了一个函数，他对数据的列起作用，统计NA值的个数，最终返回成一个数据框

```
rem <- function(x){
  r <-as.numeric(apply(x,2,function(i) sum(is.na(i))))
  return(data.frame(geneName=names(x)[which(r > 0)],na_num=r[which(r > 0)]))
}
```

然后对表达量数据进行统计

```
na_count <- rem(esprSet)
```

最终发现NA最多的基因是LCE1B，有17个，所以数据不需要特殊处理啦

```
na_count <- dplyr::arrange(na_count,desc(na_num))
```

那就开始批量运算了，一开始就用apply，发现大概需要运行50分钟以上，所以尝试使用并行化处理R语言里面的并行化有个专门的项目就是给apply的，使用起来也是很方便

```
#尝试使用并行运算
library(parallel)
#detectCores()检查当前电脑可用核数
cl.cores <- detectCores()
#makeCluster(cl.cores)使用刚才检测的核并行运算，我的服务器是28核56线程，我就用50吧
cl <- makeCluster(50)
#这是坑，parApply里面用到的函数以及变量都需要申明，不声明就必须用模块
clusterExport(cl,c("esprSet","my.surv"))
#length(names(esprSet))-2，为什么减去2，因为之前小规模测试时，我们知道最后两个是time和event，不是表达量
#数据从25开始，原因是从2开始会报错，暂时无法解决,还有要注意是parApply，A要大写的
log_rank_p <- parApply(cl,esprSet[,25:length(names(esprSet))-2],2,function(values){
  group=ifelse(values>median(na.omit(values)),'high','low')
  kmfit2 <- survival::survfit(my.surv~group,data=esprSet)
  #plot(kmfit2)
  data.survdiff=survival::survdiff(my.surv~group)
  p.val = 1 - pchisq(data.survdiff$chisq, length(data.survdiff$n) - 1)
})
```

这个运行的时间可能就是2分钟 终止并行化

```
stopCluster(cl)
```

找出小于0.05的P.val

```
log_rank_p <- log_rank_p[log_rank_p<0.05]
```

筛选后排序，并获得基因名

```
gene_diff <- as.data.frame(sort(log_rank_p))
```

最终得到的gene是2153个，这个数据是我之前留下的，本次写贴时要带孩子，在家没法运行运算。
数据保存可以这样：

```
save(gene_diff,file = "gene_df.Rda")
```

如果想用的时候就这样：

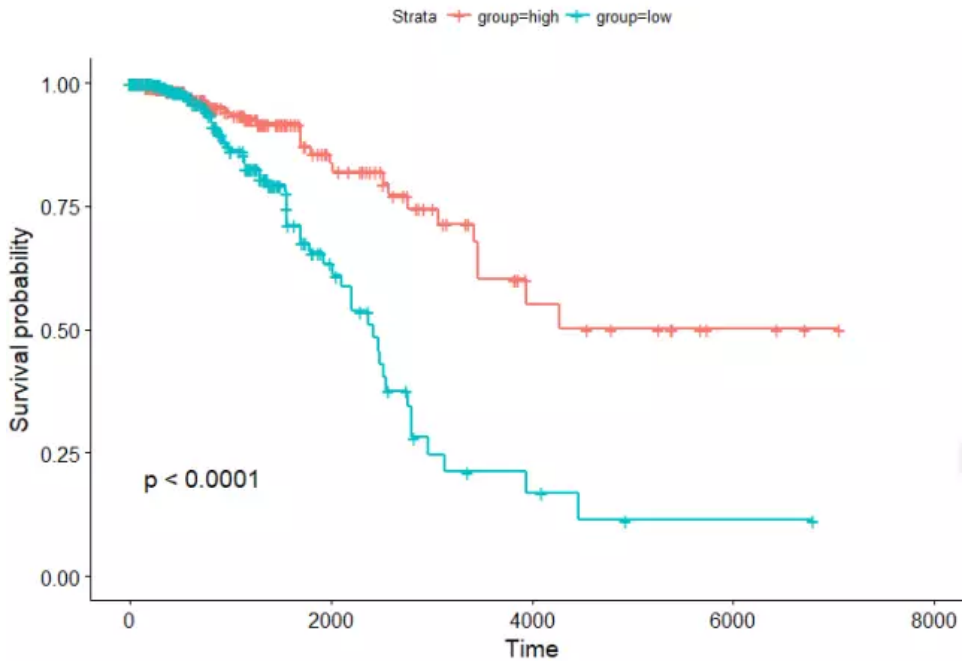
```
load(file = "gene_df.Rda")
```

没有必要先写成txt格式，然后要用的时候再读取进来，直接保存成R语言的格式即可，

你能想象每次用完word保存成图片，下次再使用时用OCR识别图片变成文字再编辑的状态么？

既然到了这一步，我们随便选取一个基因来作图，闭着眼睛都知道，都是有差异的

```
library(survminer)
group <- ifelse(esprSet$LRRC8D>median(esprSet$LRRC8D),'high','low')
sfit <- survfit(Surv(times, patient.vital_status)~group, data=esprSet)
ggsurvplot(sfit, conf.int=FALSE, pval=TRUE)
```



mark

好吧效果很不错嘛

这时候把癌和癌旁的数据作差异分析，得到的基因与今天获得的基因取交集，就可以获得又差异表达，又对生存有影响的基因了。

今天我们是用的别人已经下载好的数据，明天我们来尝试自己下载并且清理数据，而且只用一种语言，就是R语言

要知道，今天往后的ceRNA网络构建，单基因GSEA都是基于这些表达量数据的。

今天很美好，明天更有用，但是大部分人都。。。。马云说的。