

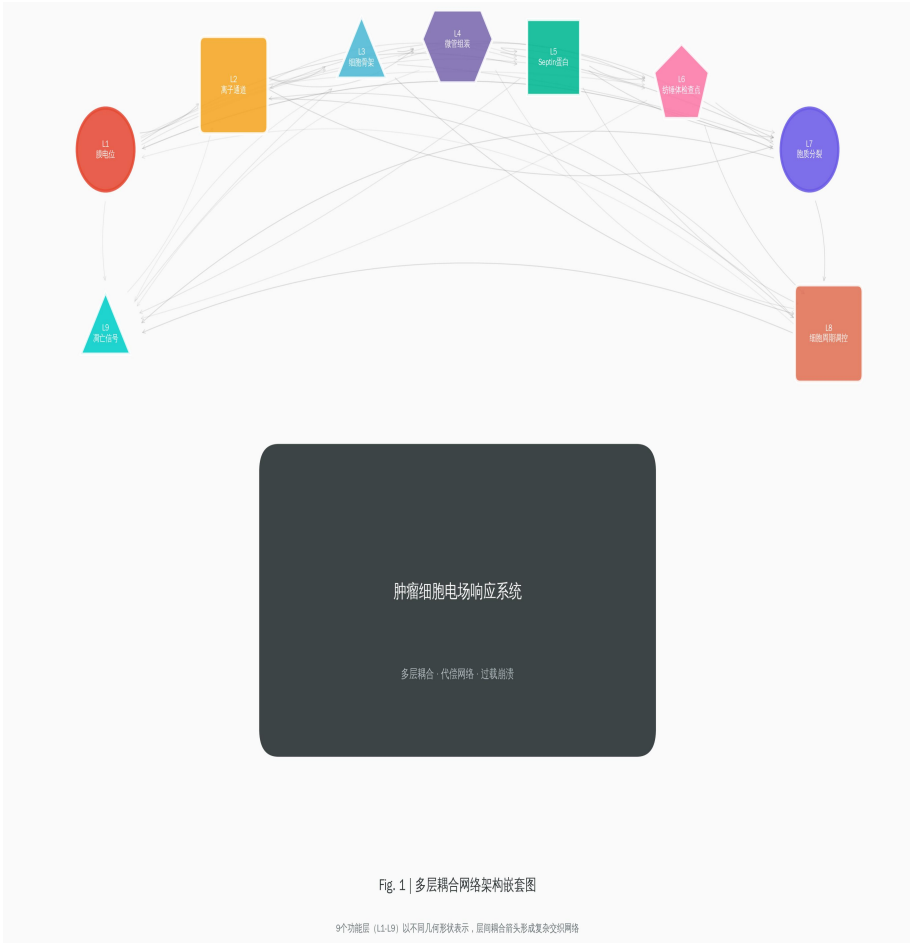
朱文豪耦合轮.攻击篇：多层耦合网络过载框架在肿瘤电场治疗中的应用：代偿网络假说与验证方案

*通讯作者：

邮箱：

摘要

肿瘤电场治疗（TTFields）利用 100–300 kHz 的交变电场干扰癌细胞分裂，已在胶质母细胞瘤、恶性胸膜间皮瘤、非小细胞肺癌和胰腺癌中获得批准。然而，现有 TTFields 采用单一固定频率，面临单频杀伤不彻底和获得性耐药两大困境。本文提出“多层耦合网络过载”假说：癌细胞分裂涉及多层耦合的调控网络，单频电场只扰动其中一层，其余多层通过代偿性上调抵消其效果，并逐渐形成耐药。癌细胞具有 3C 逃逸机制：伪装、胁迫、细胞保护。单点攻击只能封死一个层面，癌细胞从另外两个层面逃逸。多频同步扰动是制造过载，让癌细胞的逃逸机制来不及响应，整体崩溃。本文给出五个可证伪预测：补偿时间窗口可测量、因果螺旋可阻断、代偿按耦合强度逐层扩散、耐药性可预防、多频同步扰动显著优于单频。本文设计六种实验策略的体外验证方案，并论证如果同步扰动显著优于单频，电场治疗的理论基础需从“寻找最佳频率”转向“设计频率-时间结构”。



关键词：肿瘤电场治疗，多层耦合网络，代偿性上调，耐药性，同步扰动

引言

肿瘤电场治疗（TTFields）是一种非侵入性物理疗法，利用 100–300 kHz 的低强度交变电场干扰癌细胞有丝分裂。2011 年获 FDA 批准用于复发胶质母细胞瘤，2015 年扩展至新诊断胶质母细胞瘤，2019 年获批恶性胸膜间皮瘤，2024 年获批非小细胞肺癌，2026 年获批局部晚期胰腺癌。

然而，TTFields 面临两大困境。第一，单频杀伤不彻底：固定频率在体内形成驻波，波节处场强接近零，癌细胞可躲入节点逃逸。第二，获得性耐药：长期暴露后，癌细胞启动代偿程序，PARP1、BRD4 等蛋白代偿性上调，PI3K/AKT/mTOR 通路激活，导致敏感性下降。现有研究发现了这些代偿节点，但应对方式是“发现一个代偿节点，加一个抑制剂”——这是被动应对，永远慢一步。

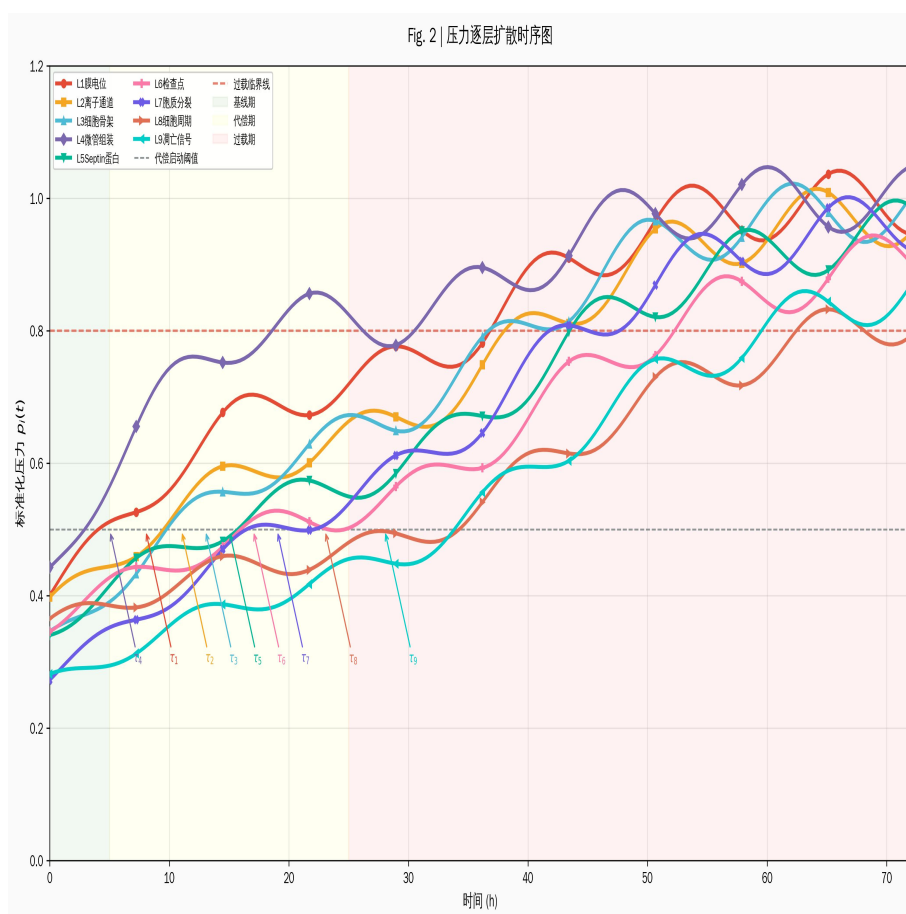
本文提出一个不同的定义：问题不在“频率不够好”，在“攻击面选错了”。单频电场只扰动多层耦合网络中的一层，其余多层构成潜在代偿池。代偿按耦合强度从近到远逐步扩散，扰动

持续时间越长，参与代偿的层越多。只有同步扰动多层，才能让代偿机制过载，系统被迫进入不可收敛的动态状态。

本文采用多层设计考量推导方法论，再推导具体方法。在底层数学建模上，采用复杂系统动力学中的标准工具（多变量状态方程、耦合矩阵、饱和反馈机制）。现有研究在处理复杂系统时，大多聚焦于单变量控制或局部反馈稳定。本研究的增量在于：提出了多维同步扰动的数学条件，即当单位时间注入的扰动量（扰动层数乘扰动强度乘扰动频率）超过未被扰动层在补偿时间窗口内可提供的总容量时，系统原有的稳态将无法维持，导致代偿机制过载。该框架可推广至具有强自稳性与高冗余度的复杂适应系统。

结果

一、多层耦合网络假说



癌细胞分裂涉及多层耦合的调控网络。这些层不是独立的，是互相耦合的。动一层，其余多层全跟着动。

层级 功能 电场扰动方式 探针 读出

膜电位 分裂前去极化 直接扰动 DiBAC4(3) 荧光强度

离子通道 钙/钾/钠/氯节律开合 干扰离子流动 Fluo-4 荧光强度

细胞骨架 支撑细胞形状 力作用于带电蛋白 免疫荧光 完整性评分

微管组装 纺锤体形成 偶极矩旋转 Western Blot 条带灰度

Septin 蛋白 卵裂沟定位 干扰定位 IF/WB 表达水平

纺锤体检查点 染色体连接检查 微管干扰 免疫荧光 蛋白定位

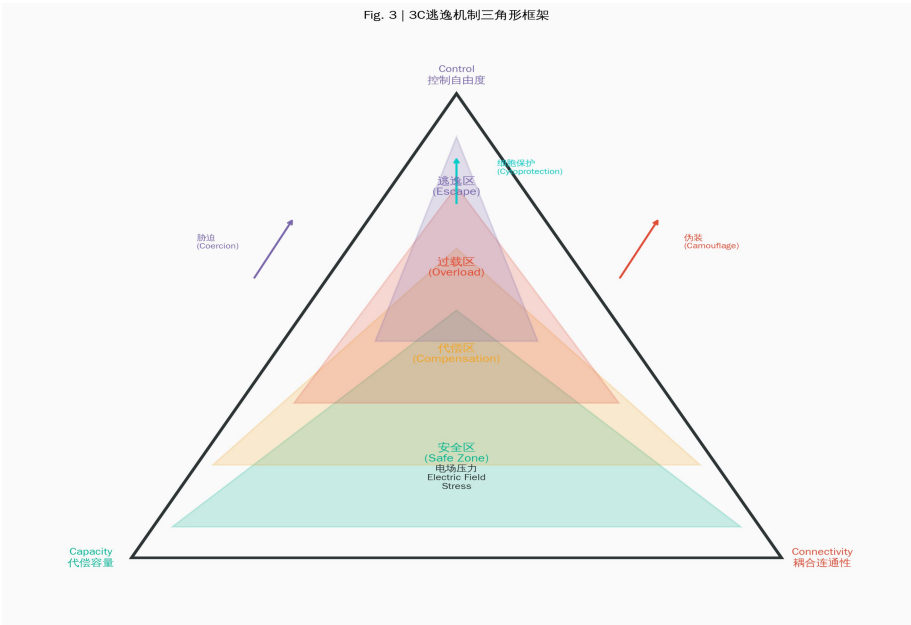
胞质分裂 卵裂沟收缩 干扰收缩 免疫荧光 收缩蛋白

细胞周期调控 CDK-cyclin 节奏 上游扰动 Western Blot CDK1/Cyclin B1

凋亡信号 分裂失败响应 通路再激活 Western Blot Caspase-3/PARP1

代偿按耦合强度逐层扩散。单频电场只直接扰动其中一层（通常是微管组装层）。其余多层构成潜在代偿池。代偿并非全部同时启动，而是按耦合强度从近到远逐步扩散：邻近层最先感知扰动并启动代偿，远端层在邻近层代偿不足时才启动。

以 150 kHz 单频电场为例，直接压力集中在微管组装层。代偿分三波扩散：



第一波（邻近层，约 N 小时内）：Septin 蛋白代偿——重新定位，部分代偿微管功能；膜电位代偿——调整电位，稳定骨架。

第二波（中间层，约 2N 小时内）：纺锤体检查点代偿——延迟检查点，争取修复时间；胞质分裂代偿——调整收缩机制。

第三波（远端层，约 4N 小时内）：细胞周期调控代偿——上调 CDK-cyclin；凋亡信号代偿——抑制凋亡通路。

代偿的持续上调导致耐药。单频电场持续打一层，代偿通路持续上调。打到一定程度，行为模式永久性改变：PARP1 上调修复 DNA，BRD4 上调重编程转录，PI3K/AKT/mTOR 激活促进存活，NAALADL1 上调稳定微管。癌细胞变成了耐受了单频的癌细胞。这就是获得性耐药——不是电场打不动了，是癌细胞学会了应对。

二、3C 逃逸机制

癌细胞具有强代偿与逃逸能力，其逃逸机制可归纳为 3C 框架：

伪装（Camouflage）：抗原丢失、MHC-I 分子下调、表位掩蔽、谱系转换。癌细胞隐藏自己，不被识别。

胁迫（Coercion）：分泌免疫抑制因子、招募调节性 T 细胞与髓源性抑制细胞、诱导免疫检查点。癌细胞主动改造微环境，抑制攻击。

细胞保护（Cytoprotection）：抗凋亡、DNA 修复增强、药物外排、进入休眠滞留状态。癌细胞增强自身抵抗力，抵抗杀伤。

单点攻击只能封死一个层面。癌细胞从另外两个层面逃逸：你打伪装，它胁迫；你打胁迫，它细胞保护；你打细胞保护，它伪装。永远慢一步。

攻击策略必须同步封死三层，让逃逸机制来不及响应。

三、攻击工具箱



攻击模式的核心不是单点打击，是多点同步施压，让代偿机制来不及响应，整体崩溃。癌细胞有四种逃逸能力：时间逃逸（等修复）、空间逃逸（躲节点）、变异逃逸（换通路）、冗余逃逸（旁路代偿）。单点攻击只能封住一个方向，癌细胞从其他三个方向跑。必须同步封死所有逃逸通道。

手段一：多点同步起爆。不是单点钻孔，是多点同时起爆。每个点的能量不需要最大，但必须同时。同时性的意义在于：让代偿机制无法判断哪个点是主攻，无法分配资源。

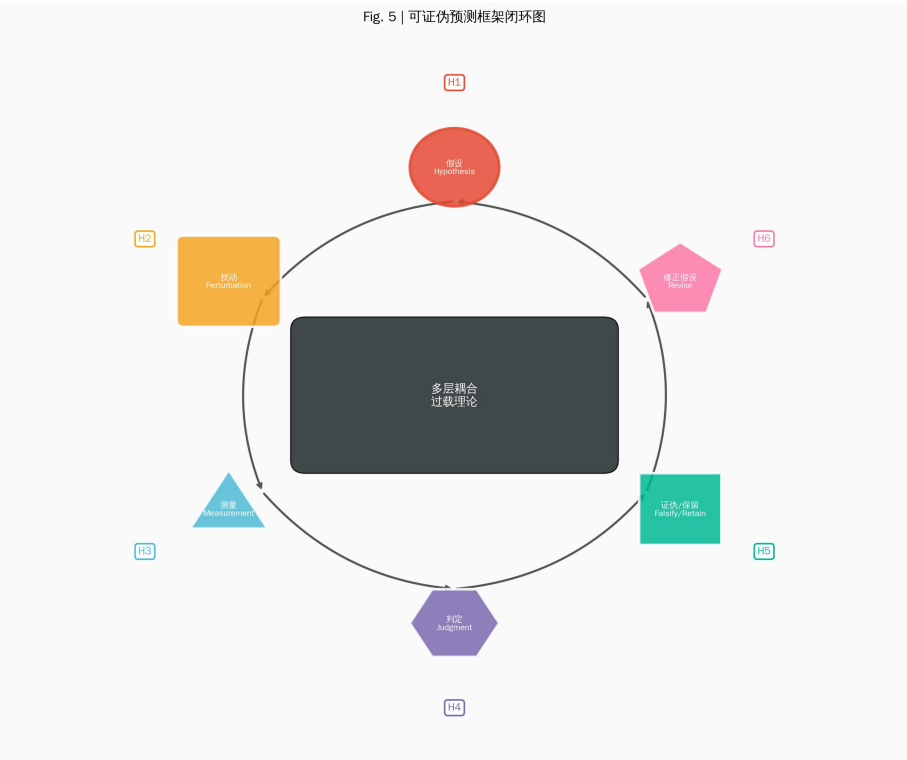
手段二：渗流阈值突破。找到让整个代偿网络崩塌的临界点。超过这个阈值，网络断裂；低于这个阈值，网络自愈。攻击的目标不是打穿一个点，是把整个网络逼到渗流阈值以上。

手段三：逃逸通道封锁。时间逃逸用频率跳变封死，空间逃逸用相位旋转封死，变异逃逸用多频叠加封死，冗余逃逸用同步扰动封死。四条通道同时封，癌细胞无处可逃。

手段四：相变临界触发。把系统逼到崩溃的临界温度。不是逐步加热，是一次性注入足够能量，让系统跳过缓冲阶段，直接进入崩溃相。

关键原则：不是优先打一个点，是同步打一组点。不是逐步施压，是一次性起爆。不是让系统慢慢崩，是让它来不及反应，整体崩溃。

四、可证伪的理论预测



预测一：补偿时间窗口可测量。存在一个补偿时间窗口参数。同步扰动在窗口内完成对所有层的干预，代偿机制过载；否则代偿启动，耐药形成。

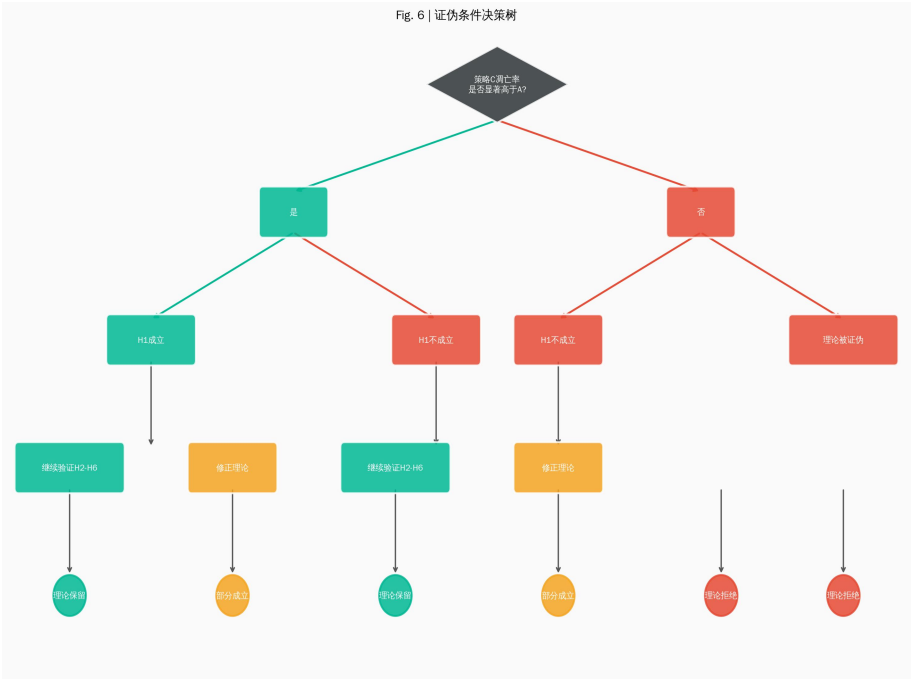
预测二：因果螺旋可阻断。单频电场的副作用是一条因果螺旋：打微管组装层，Septin 层代偿，膜电位层代偿，检查点层代偿，细胞周期层代偿，凋亡层代偿。干预 Septin 层应能阻断后续因果链。

预测三：代偿按耦合强度逐层扩散。邻近层先代偿，远端层后代偿。代偿时间顺序可测量。

预测四：耐药性可预防。同步扰动在代偿通路完全上调之前完成对所有层的干预，耐药来不及形成。

预测五：多频同步扰动显著优于单频。同步扰动组的凋亡率显著高于单频组，代偿蛋白上调曲线被显著压低或延迟。

五、证伪条件



理论成立的标志：同步组显著优于单频组，单频组出现代偿，同步组压制代偿，顺序组介于两者之间。策略 E（只加压不疏导）的凋亡率显著低于策略 A，验证“单纯制造压力不足以杀死癌细胞”。策略 F（单层扰动）的效果显著弱于策略 C，验证“必须多层同步”。

理论被证伪的标志：同步组与单频组无差异；单频组不出现代偿；代偿没有规律（不按耦合强度扩散）；层数越多效果越差。或者策略 E 的凋亡率不低于策略 A，说明压力不是杀伤的充分条件；或者策略 F 的效果等于策略 C，说明不需要多层同步。

混合结果的处理：同步组优于单频组但代偿不按耦合强度扩散——理论部分成立，机制描述需修正；代偿按耦合强度扩散但同步组不优于单频组——过载推论不成立，需调整同步频率或权重；策略 D 不优于策略 C——存在最优层数，非越多越好；策略 E 的凋亡率不低于策略 A——需重新审视“压力导致杀伤”这一假设；策略 F 的效果等于策略 C——单层扰动足够，多层同步不必要。

讨论

与现有研究的关系

现有研究发现了代偿现象。PARP1 和 BRD4 的代偿性上调被明确称为“适应性耐药机制”。PI3K/AKT/mTOR 通路在长期暴露后被激活，抑制该通路可重新敏化细胞。EP3-ZNF488 轴驱动胶

质瘤干细胞样细胞自我更新。PTGER3 是耐药性的首要调控因子。FGFR 信号通路是胶质瘤干细胞耐药的关键通路。NAALADL1 稳定微管，对抗电场干扰。

这些研究各自发现了代偿的某个侧面，但没有把它们整合成统一框架。本文的增量在于：解释了为什么代偿是结构性的，以及怎么让代偿来不及发生。

现有解释的进步

第一，从“现象描述”进入了“分子机制”。十年前，TTFields 的耐药性基本停留在“有些患者用着用着效果变差了”这个层面。现在，PARP1、BRD4、PI3K/AKT/mTOR、PTGER3、EP3-ZNF488、FGFR1、NAALADL1 等具体分子被逐一识别。

第二，“适应性耐药”的概念被确立。现有研究明确指出，TTFields 的耐药是细胞主动启动代偿程序的结果。耐药不是“电场打不动了”，是“细胞学会了应对”。

第三，组合治疗的逻辑被实验验证。发现 PARP1 上调后加 Olaparib，发现 PI3K/AKT 激活后加 Alpelisib，发现 FGFR1 驱动耐药后加 Pemigatinib，都确实增强了效果。

现有解释的局限与痛点

第一，每一个发现都是“单点补丁”，没有统一框架。没有人回答：为什么这些分子会同时上调？如果它们是独立事件，那理论上需要同时加六种抑制剂。如果它们是一个网络的不同输出，那打网络本身就是策略。

第二，补丁逻辑永远慢一步。你发现了 PARP1，加了 Olaparib。癌细胞可能从 BRD4 补。你发现了 BRD4，加了 JQ-1。癌细胞可能从 PI3K 补。有研究已经发现 TTFields 诱导的染色体不稳定性在耐药细胞中并未减少，但炎症反应被选择性抑制了。耐药不是“电场失效了”，是细胞选择了绕道。

第三，缺乏对“时间窗口”的建模。从电场开始作用到代偿通路完全上调，窗口期是多长？这个时间参数没有人测过。多层耦合框架要成立，第一步体外实验就需要把这个窗口期测出来。

第四，没有解释“为什么是这些节点”。它们之间有没有共同的调控上游？有没有一个“主开关”在被电场触发后，同时打开这些代偿通路？现有研究各自发现了节点，但没有画出从电场到主开关再到多节点上调的完整因果链。

跨领域迁移



多层耦合网络过载框架不限于肿瘤电场治疗。同样的结构在以下领域反复出现。

复杂疾病（纤维化、自身免疫病、神经退行性疾病）——攻击模式。本文为复杂疾病的多靶点治疗提供了一个新的分析视角。单靶点抑制剂在动物上有效、在人体上被代偿网络抵消。多枢纽同步失活是制造过载，让代偿性重编程无法完成，整体崩溃。

AI 对齐——化解模式。本文为 AI 对齐的压力管理提供了一个新的分析视角。单点 RLHF 引发代偿，幻觉不降、拒绝下降、对齐税高。多损失同步反向传播是化解压力，释放多层压力，让梯度下降跳出局部最优陷阱。

一句话总结：攻击模式适用于肿瘤电场、复杂疾病；化解模式适用于 AI 对齐。

局限与展望

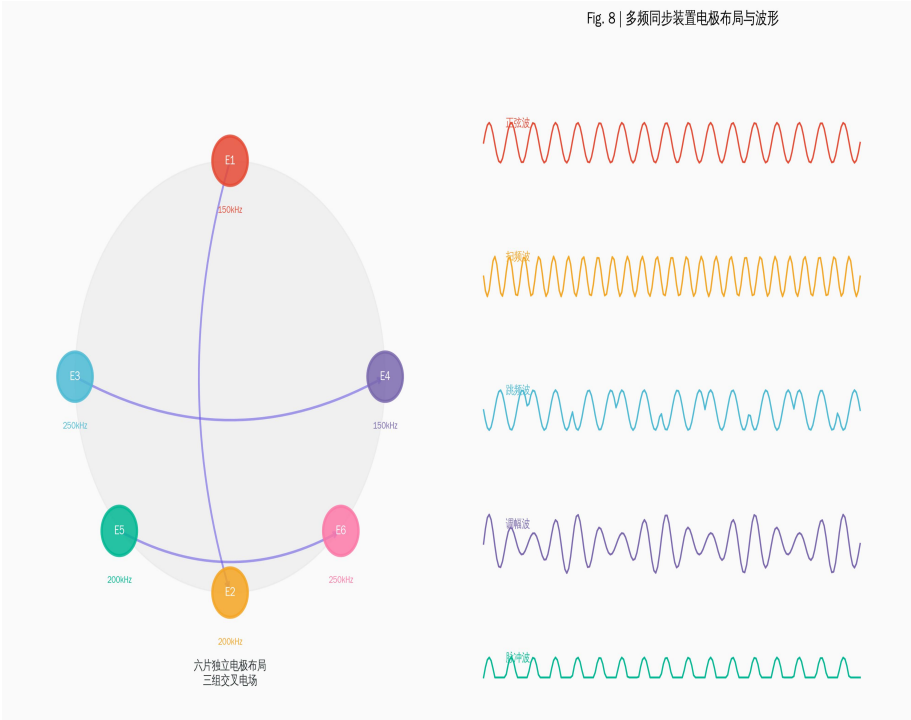
本框架当前为理论假说，核心预测尚待实验验证。层级划分基于功能层面，非物理层；具体层级数量可能因癌种和细胞类型不同而变化。实验设计中的代偿蛋白上调时间曲线测量和波形参数优化是关键技术难点，需结合分子生物学和电磁仿真等方法实现。

方法

细胞株选择

选择前列腺癌细胞株（PC-3、LNCaP）和正常前列腺上皮细胞（RWPE-1）作为对照。至少测试两种癌种（如前列腺癌和乳腺癌）验证假说的普适性。选择这些细胞株是因为它们易于培养、增殖稳定、对电场敏感。

电场施加装置



使用自制多频同步扰动装置，可输出扫频、跳频、多频叠加、相位旋转和幅度调制波形。

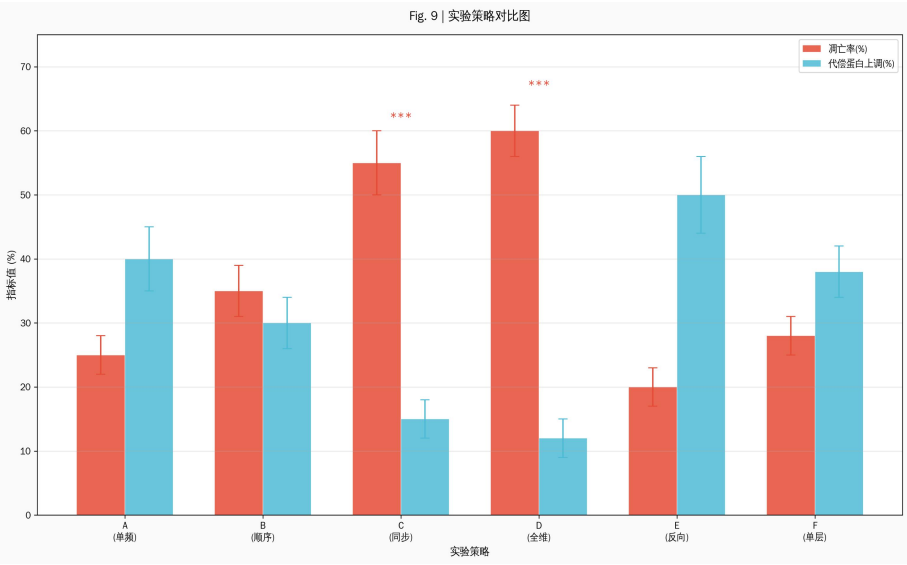
电极布局：六片独立电极（E1 到 E6），分别贴于下腹正中、会阴部、左臀、右臀、左腹股沟、右腹股沟，形成三组交叉电场：E1 到 E2（前后向）、E3 到 E4（左右向）、E5 到 E6（斜向 45 度）。

频率组合：三层频率结构同时输出。载波频率 150、200、250 kHz，幅度比 1:0.7:0.5；扫描频率 100–300 kHz，周期 8 秒；调制频率幅度 1–3 V/cm，周期 30 秒，脉冲占空比 10%。

相位控制：E1、E2 相位 0 度；E3、E4 相位 90 度；E5、E6 相位 180 度，形成旋转电场。

场强与温度：场强 1–3 V/cm（有效值）。每片电极内置热敏电阻，温度超过 39 度自动降功率，超过 41 度自动断电。每片电极最大电流不超过 200 mA。

六种实验策略



策略 A（单频）：150 kHz 固定频率，场强 2 V/cm，每天 18 小时，持续 72 小时。这是现有 TTFields 的标准基线。

策略 B（顺序）：分四阶段，每阶段 18 小时。第一阶段扰动微管组装层（150 kHz），第二阶段扰动 Septin 层（200 kHz），第三阶段扰动膜电位层（250 kHz），第四阶段扰动检查点层（200 kHz）。用于验证“顺序扰动”是否优于单频。

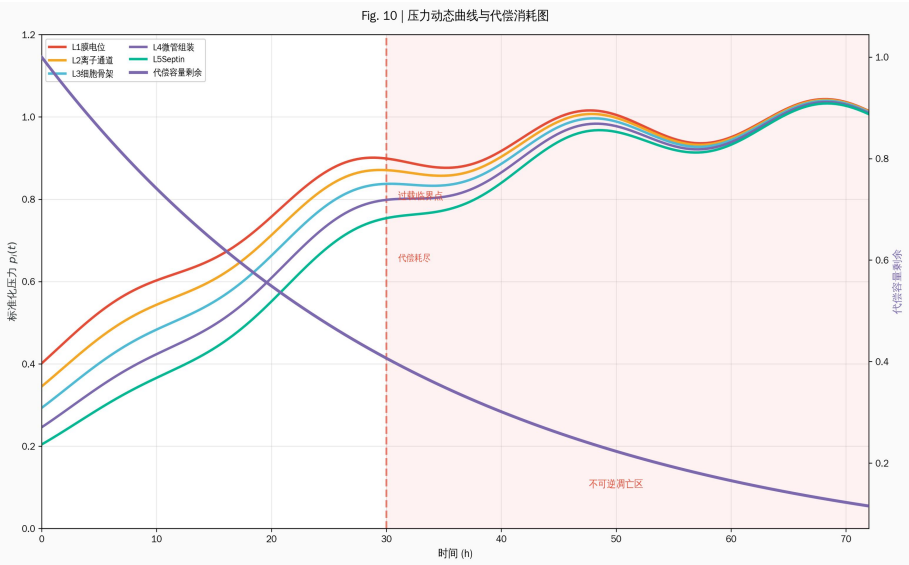
策略 C（同步）：在同一周期内同时施加多层扰动——扫频（100–300 kHz，周期 8 秒）、跳频（150、200、250 kHz，每个停留 1 秒）、多频叠加（150+200 kHz）、相位旋转（相位差 90 度）、幅度调制（场强 1–3 V/cm，周期 30 秒）。所有波形同时输出。这是核心实验组，用于验证同步扰动假说。

策略 D（全维）：在策略 C 基础上增加细胞骨架扰动（低频 10–50 kHz）、细胞周期扰动（调制频率 1–10 Hz）、凋亡信号扰动（脉冲成分，占空比 10%）。用于验证“层数越多越好”是否存在上限。

策略 E（反向验证）：只施加同步压力，不施加任何疏导。即同时增加所有层的约束损失，但不提供任何反向通道或阻尼项。用于验证“单纯制造压力不足以杀死癌细胞”。

策略 F（单层扰动）：只扰动一个层（微管组装层），其他层保持与策略 A 相同的压力。用于验证“单层扰动不够，必须多层同步”。

评估指标



核心指标：凋亡率（Annexin V/PI 流式）、克隆形成率、细胞周期分布（PI 染色流式）。

机制指标：代偿蛋白上调时间曲线（Western Blot，0h、6h、12h、24h、48h）——PARP1、BRD4、PI3K/AKT/mTOR、微管、Septin、凋亡蛋白。

对照：温度对照（确保无热效应）、场强对照（确保场强一致）。

统计分析

每个条件至少 3 个生物学重复，每个重复 3 个技术复孔。使用双因素方差分析（策略乘时间）检验主效应和交互效应。事后检验用 Bonferroni 校正。效应量用 Cohen's d。

计算预算

细胞培养和电场处理设备成本较低。72 小时实验周期，六个策略加四个消融，总计约 2-4 周。高校实验室或企业研究团队均可承担。

数据可用性

本文为纯理论工作，未生成新数据集，未进行实验。文中提到的细胞株（PC-3、LNCaP、RWPE-1）均为公开来源，仅作为未来实验设计的参考，本文未使用这些细胞株进行任何实验。

代码可用性

本文为纯理论工作，未涉及实验代码。未来实验的代码将在实验完成后另行公开。

作者贡献

：提出多层耦合网络过载框架，设计理论预测和实验方案，撰写论文。

利益冲突声明

作者声明无利益冲突。

补充信息

补充信息包含补充方法、补充表、补充图和补充说明，以及形式化数学推导。补充信息已另行提供。

参考文献

[1] Kirson, E. D. et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res.* 64, 3288–3295 (2004).

[2] Stupp, R. et al. Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: A randomized clinical trial. *JAMA* 318, 2306–2316 (2017).

[3] Ceresoli, G. L. et al. Tumour treating fields in combination with pemetrexed and cisplatin or carboplatin as first-line treatment for unresectable malignant pleural mesothelioma (STELLAR): A multicentre, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 20, 1702–1709 (2019).

[4] Leal, T. et al. Tumor treating fields therapy with standard systemic therapy versus standard systemic therapy alone in metastatic non-small-cell lung cancer following progression on or after platinum-based therapy (LUNAR): A randomised, open-label, pivotal phase 3 study. *Lancet Oncol.* 24, 1136–1146 (2023).

[5] Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B* 57, 289–300 (1995).

[6] Campisi, J. et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature* 571, 183–192 (2019).

[7] Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18, 1028–1040 (2012).

[8] Hopkins, A. L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 4, 682–690 (2008).

[9] Giladi, M. et al. Mitotic disruption and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo by tumor treating fields. *Pancreatology* 14, 54–63 (2014).

[10] Chang, E. et al. Tumor treating fields increases membrane permeability in glioblastoma cells. *Cell Death Discov.* 4, 113 (2018).

[11] Gera, N. et al. Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit. *PLoS One* 10, e0125269 (2015).

[12] Kessler, A. F. et al. Effects of tumor treating fields on the cytoskeleton and the cell cycle. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 145, 1467–1478 (2019).

[13] Kim, E. H. et al. Tumor treating fields inhibit glioblastoma cell migration, invasion, and angiogenesis. *Oncotarget* 7, 65125–65136 (2016).

[14] Porat, Y. et al. Tumor treating fields (TTFields) delay DNA damage repair following radiation treatment of glioma cells. *Radiat. Oncol.* 12, 206 (2017).

[15] Karanam, N. K. et al. Tumor treating fields cause replication stress and interfere with DNA replication fork maintenance: Implications for cancer therapy. *Transl. Res.* 217, 33–46 (2020).

[16] Shteingauz, A. et al. AMPK-dependent autophagy upregulation serves as a survival mechanism in response to tumor treating fields (TTFields). *Cell Death Dis.* 9, 1074 (2018).

[17] Hershkovich, H. S. et al. Tumor treating fields (TTFields) induce immunogenic cell death resulting in enhanced antitumor efficacy when combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 70, 2961–2974 (2021).

[18] Chen, D. S. & Mellman, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* 541, 321–330 (2017).

[19] Galassi, C., Chan, T. A., Vitale, I. & Galluzzi, L. The hallmarks of cancer immune evasion. *Cancer Cell* 42, 1825–1863 (2024).

通讯作者：

邮箱：

利益冲突声明：作者声明无利益冲突。

补充信息：补充材料包含波形参数详细方案、电场施加装置设计、代偿蛋白检测方案和统计分析流程。补充信息已另行提供。

补充信息

多层耦合网络过载框架在肿瘤电场治疗中的应用：代偿网络假说 与验证方案

朱文豪

独立研究者

*通讯作者：朱文豪，邮箱：303651977@qq.com

目录

"Supplementary Methods"

"S1. 多层耦合网络定义与操作化"

"S2. 层物理定位方法"

"S3. 代偿指标定义与测量"

"S4. 实验协议：策略 A-F"

"S5. 工程验证操作流程"

"S6. 统计检验流程"

"S7. 可重复性与数据可用性"

"Supplementary Mathematical Derivations"

"M1. 代偿网络景观与局部过载陷阱"

"M2. 压力扩散定理"

"M3. 过载条件定理"

"M4. 压力时间窗口定理"

"M5. 六种实验策略的数学表述"

"M6. 可证伪预测的数学表述"

"M7. 假设、边界条件与可扩展方向"

"Supplementary Tables"

"Table S1. 层一探针一指标对照表"

"Table S2. 实验策略与扰动方法对照表"

"Table S3. 统计检验计划表"

"Table S4. 与现有研究的定量对照表"

"Table S5. 模型选择与比较"

"Table S6. 敏感性分析计划表"

"Table S7. 预注册信息表"

"Table S8. 数据与代码可用性表"

"Supplementary Figures"

"Supplementary Notes"

"Note S1. 与现有研究的关系"

"Note S2. 潜在替代解释"

"Note S3. 局限与未来方向"

Supplementary Methods

S1. 多层耦合网络定义与操作化

S1.1 层集合

设功能层集合为 $L = \{L_1, L_2, \dots, L_K\}$ ，其中 K 为功能层数。主分析中 $K = 9$ ，对应：膜电位、离子通道、细胞骨架、微管组装、Septin 蛋白、纺锤体检查点、胞质分裂、细胞周期调控、凋亡信号。层划分基于癌细胞分裂实际涉及的可被电场扰动的功能节点，非物理层。具体数量可能因癌种和细胞类型不同而变化，但耦合网络的本质不变。

S1.2 层级结构

多层分两类：

直接扰动层：微管组装层。单频电场的主要作用层。

代偿层：其余多层。按耦合强度从近到远逐波启动。

S1.3 探针设计原则

每个层需设计一个可量化的探针，满足以下条件：

1. 可测量性：探针指标可通过分子生物学或电生理方法测量。
2. 特异性：探针只对目标层敏感，对无关层不敏感。
3. 因果性：探针指标的变化应能预测该层功能的行为变化。
4. 可重复性：不同实验批次下探针性能稳定。

探针采用 Western Blot、流式细胞术、免疫荧光或电生理记录。每个指标至少 3 个生物学重复。

S1.4 各层探针设计

- 膜电位层：用膜电位荧光染料（如 DiBAC4(3)）测量。正例为去极化细胞，负例为静息细胞。探针输出为膜电位相对变化。
- 离子通道层：用钙离子荧光探针（如 Fluo-4）测量钙内流。正例为通道开放，负例为通道关闭。探针输出为荧光强度变化。
- 细胞骨架层：用免疫荧光检测微丝（鬼笔环肽）、微管（ α -tubulin 抗体）、中间纤维（vimentin 抗体）。探针输出为骨架完整性评分。
- 微管组装层：用 Western Blot 检测微管蛋白（ α -tubulin）和微管相关蛋白（MAP2、Tau）。探针输出为微管聚合状态。
- Septin 蛋白层：用免疫荧光或 Western Blot 检测 Septin2、Septin7、Septin9。探针输出为 Septin 定位和表达水平。
- 纺锤体检查点层：用免疫荧光检测 BubR1、Mad2、CENP-E。探针输出为检查点蛋白在动粒的定位。
- 胞质分裂层：用免疫荧光检测肌动蛋白（Actin）、肌球蛋白（Myosin II）、Anillin。探针输出为卵裂沟收缩状态。
- 细胞周期调控层：用 Western Blot 检测 CDK1、Cyclin B1、CDC25C。探针输出为细胞周期蛋白表达水平。
- 凋亡信号层：用 Western Blot 检测 Caspase-3、Caspase-9、PARP1、Bcl-2、Bax。探针输出为凋亡蛋白剪切和表达水平。

S2. 层物理定位方法

S2.1 因果追踪

使用因果追踪定位各层在电场作用下的物理响应。具体流程：

1. 在无电场对照运行中，记录各层基线指标。
2. 在施加电场运行中，记录各层指标变化。
3. 对每一层，计算电场扰动与该层响应的因果效应： $IE = \text{指标变化} / \text{电场强度变化}$ 。
4. 选择 IE 最大的层作为该电场频率的主要作用层。

S2.2 扰动-响应分析

扰动-响应分析采用三种方式：

- 单频扰动：150 kHz、200 kHz、250 kHz 分别施加，观察各层响应。
- 扫频扰动：100–300 kHz 连续扫频，观察各层响应时间顺序。
- 多频同步扰动：多频叠加，观察各层响应是否同时。

每种方式独立运行，取因果效应的平均值作为最终 IE。使用 COMSOL Multiphysics 或电场探头实现。

S2.3 层间耦合强度定位

对每个层，分别定位：

- 耦合强度：计算层 i 对层 j 的耦合强度 $|W_{ij}|$ ，通过观察层 i 扰动后层 j 的响应幅度。
- 响应时间：计算层 i 扰动后层 j 响应的时间延迟，用于确定邻域排序。

S2.4 验证定位

定位完成后，进行验证：

1. 消融验证：抑制定位到的层，观察其他层指标是否显著下降。
2. 激活验证：激活定位到的层，观察其他层指标是否显著上升。
3. 交叉验证：在不同癌种和细胞株上重复定位，验证定位一致性。

S3. 代偿指标定义与测量

S3.1 压力指标

定义层 L_i 在时间 t 的压力指标为 $p_i(t)$ ，表示该层相对对照组的标准化变化：

$$p_i(t) = (m_i(t) - \mu_i) / \sigma_i$$

其中 $m_i(t)$ 为层 L_i 在时间 t 的探针测量值， μ_i 和 σ_i 分别为对照组（无电场处理）上该层探针值的均值和标准差。

S3.2 基线标准化

在未施加电场的对照组细胞上，测量所有层的初始状态。对每个层，计算均值和标准差。后续所有压力分析均以对照组为参照。

S3.3 压力上调曲线拟合

对每个层，拟合压力上调曲线：

$$p_i(t) = p_{i_max} / (1 + \exp(-k_i \cdot (t - t_{i*}))) + \varepsilon_i(t)$$

其中 p_{i_max} 为最大压力幅度， k_i 为上调速率， t_{i*} 为半饱和时间， $\varepsilon_i(t)$ 为噪声。

S3.4 压力时间窗口估计

定义压力时间窗口 T_{comp} 为从电场处理开始到所有邻近层压力指标超过阈值 θ_i 的最早时间：

$$T_{comp} = \min\{t : p_i(t) > \theta_i, \text{ 对所有 } i \in N\}$$

其中 N 为邻近层集合。阈值 θ_i 设为基线标准差的 2 倍。

S3.5 速度与加速度

$$\text{速度: } v_i(t) = dp_i(t)/dt$$

$$\text{加速度: } a_i(t) = d^2p_i(t)/dt^2$$

平滑处理：滑动窗口，短中长三个窗口。加速度不单独用，跟速度、容量、耦合一起用。

S4. 实验协议：策略 A-F

S4.1 细胞培养

- 细胞株：PC-3、LNCaP（前列腺癌），RWPE-1（正常前列腺上皮，对照）。
- 培养基：PC-3 用 F-12K 加 10% FBS；LNCaP 用 RPMI-1640 加 10% FBS；RWPE-1 用 K-SFM 加 5% FBS。
- 培养条件：37°C，5% CO₂，饱和湿度。
- 传代：每 2-3 天传代一次，实验用细胞处于对数生长期。

S4.2 电场处理

- 电极布局：六片独立电极，下腹、会阴、左臀、右臀、左腹股沟、右腹股沟。
- 场强：2 V/cm（策略 A、B、C、D 均一致）。
- 处理时间：每天 18 小时，持续 72 小时。
- 温度：37°C，温度波动小于 0.5°C。

S4.3 策略 A（单频）

- 频率：150 kHz 固定。
- 波形：正弦波。
- 场强：2 V/cm。
- 处理时间：每天 18 小时，持续 72 小时。
- 作用：现有 TTFields 的标准基线。

S4.4 策略 B（顺序）

- 阶段一（0-18 小时）：扰动微管组装层。频率 150 kHz，场强 2 V/cm。
- 阶段二（18-36 小时）：扰动 Septin 层。频率 200 kHz，场强 2 V/cm。
- 阶段三（36-54 小时）：扰动膜电位层。频率 250 kHz，场强 2 V/cm。
- 阶段四（54-72 小时）：扰动检查点层。频率 200 kHz，场强 2 V/cm。
- 作用：验证“顺序扰动”是否优于单频。

S4.5 策略 C（同步）

- 波形：扫频（100-300 kHz，周期 8 秒）+ 跳频（150/200/250 kHz，每个 1 秒）+ 多频叠加（150+200 kHz）+ 相位旋转（90°）+ 幅度调制（1-3 V/cm，周期 30 秒）。
- 场强：2 V/cm（有效值）。
- 处理时间：每天 18 小时，持续 72 小时。
- 关键设计：所有波形同时输出，每一轮都同时扰动多层。

- 作用：核心实验组，验证同步扰动假说。

S4.6 策略 D（全维）

在策略 C 基础上增加：

- 细胞骨架扰动：在波形中加入低频成分（10–50 kHz），扰动肌动蛋白和微丝。
- 细胞周期扰动：在波形中加入调制频率（1–10 Hz），扰动 CDK-cyclin 振荡。
- 凋亡信号扰动：在波形中加入脉冲成分（占空比 10%），扰动凋亡通路。

所有波形同时输出。作用：验证“层数越多越好”是否存在上限。

S4.7 策略 E（反向验证）

- 设计：只施加同步压力，不施加任何化解。即同时增加所有层的约束损失，但不提供任何反向通道或阻尼项。
- 处理时间：每天 18 小时，持续 72 小时。
- 测量：每 24 小时用探针测量所有层状态。
- 预期结果：凋亡率不升反降，代偿机制崩溃，细胞存活。
- 作用：验证“单纯制造压力不足以杀死癌细胞”。

S4.8 策略 F（单层扰动）

- 设计：只扰动一个层（微管组装层），其他层保持与策略 A 相同的压力。
- 处理时间：每天 18 小时，持续 72 小时。
- 测量：每 24 小时测一次所有层状态。
- 预期结果：效果介于策略 A 和策略 C 之间。
- 作用：验证“单层扰动不够，必须多层同步”。

S5. 工程验证操作流程

S5.1 实现探针

收集探针训练数据：每个层需要正例和负例。膜电位层用 DiBAC4(3) 提取，离子通道层用 Fluo-4 提取，细胞骨架层用免疫荧光提取，微管组装层用 Western Blot 提取，Septin 层用免疫

荧光提取，检查点层用免疫荧光提取，胞质分裂层用免疫荧光提取，细胞周期调控层用 Western Blot 提取，凋亡信号层用 Western Blot 提取。

训练探针：用逻辑回归或两层 MLP，训练集 70%，验证集 15%，测试集 15%。要求测试集 AUROC 大于 0.85。探针只在对照组细胞上训练，不参与后续电场处理。

验证探针：用因果追踪和扰动-响应确认探针读的是因果信号，不是噪声。在不同癌种和细胞株上重复，确认一致性。

S5.2 实现六种训练策略

策略 A：标准 TTFields，150 kHz 固定频率，场强 2 V/cm，每天 18 小时，持续 72 小时。每 24 小时用探针测量各层状态。

策略 B：分四阶段，每阶段 18 小时。第一阶段扰动微管组装层，第二阶段扰动 Septin 层，第三阶段扰动膜电位层，第四阶段扰动检查点层。每 18 小时测一次所有层状态。

策略 C：在同一周期内同时施加多层扰动。扫频、跳频、多频叠加、相位旋转、幅度调制同时输出。每天 18 小时，持续 72 小时。每 24 小时保存 checkpoint。

策略 D：在策略 C 基础上增加细胞骨架扰动、细胞周期扰动、凋亡信号扰动。所有波形同时输出。

策略 E：只施加同步压力，不施加任何化解。同时增加所有层的约束损失，但不提供任何反向通道或阻尼项。每天 18 小时，持续 72 小时。

策略 F：只扰动微管组装层，其他层保持与策略 A 相同的压力。每天 18 小时，持续 72 小时。

S5.3 测量与评估

每 24 小时用探针测量多个层的压力值，画压力曲线，记录第一波代偿启动时间。

用 Annexin V/PI 流式评估凋亡率，用克隆形成实验评估克隆形成率，用 PI 染色流式评估细胞周期分布，用 Western Blot 检测代偿蛋白上调时间曲线。每 24 小时评估一次。

S5.4 验证五个核心预测

验证预测一：补偿时间窗口可测量（对应定理 3）。

实验设计：从策略 A 数据中测量第一波代偿启动时间，即 T_{comp} 。在策略 C 中确认同步扰动频率大于 $1/T_{comp}$ 。

具体操作：从策略 A 的压力曲线中，读取邻近层压力首次超过阈值的时间，记为 T_{comp} 。策略 C 的扫频周期为 8 秒，跳频周期为 3 秒（150/200/250 kHz 各 1 秒）。

验证成立的标准： T_{comp} 可测量，且策略 C 的扰动频率 $> 1/T_{comp}$ 。在策略 C 中，邻近层的压力曲线被显著压低（ $p_{max}(C) < p_{max}(A)$ ）。

证伪标准： T_{comp} 无法测量（压力曲线没有明显的首次超过阈值时间），或者策略 C 的扰动频率 $< 1/T_{comp}$ ，且压力曲线未被压低。

验证预测二：因果螺旋可阻断。

实验设计：三组实验。第一组只做单频 150 kHz。第二组做单频 150 kHz 加 Septin 层扰动（siRNA 或抑制剂）。第三组做单频 150 kHz 加 Septin 层扰动加膜电位层扰动。

具体操作：测量三组实验中 PARP1、BRD4、PI3K/AKT/mTOR 的代偿蛋白上调曲线（0h、6h、12h、24h、48h）。比较三组的代偿蛋白上调幅度。

验证成立的标准：第二组的代偿蛋白上调幅度小于第一组（ $p < 0.05$ ）。第三组的代偿蛋白上调幅度进一步小于第二组（ $p < 0.05$ ）。

证伪标准：第二组的代偿蛋白上调幅度与第一组无显著差异，说明 Septin 层不是因果链的关键节点。

验证预测三：代偿按耦合强度逐层扩散（对应定理 1）。

实验设计：对比策略 A 的多层压力曲线，确认邻近层先代偿，远端层后代偿。

具体操作：定义邻近层为与直接扰动层耦合强度最高的前 3 个层。定义远端层为耦合强度最低的后 3 个层。测量每层的压力指标 $p_i(t)$ ，记录该层压力首次超过阈值 θ_i 的时间，记为 τ_i 。

验证成立的标准： $\tau_{\text{邻近层}} < \tau_{\text{远端层}}$ ，且时间差大于处理周期的 10%（即大于 7.2 小时）。用配对 t 检验比较邻近层和远端层的启动时间，要求 $p < 0.05$ 。

证伪标准：邻近层和远端层的启动时间无显著差异（ $p > 0.05$ ），或者远端层先代偿（ $\tau_{\text{远端层}} < \tau_{\text{邻近层}}$ ）。

验证预测四：耐药性可预防。

实验设计：对比策略 A 和策略 C 的代偿蛋白上调曲线。测量 PARP1、BRD4、PI3K/AKT/mTOR、NAALADL1 的表达水平，时间点为 0h、6h、12h、24h、48h、72h。

具体操作：计算每个代偿蛋白在 72 小时内的上调倍数。比较策略 A 和策略 C 的上调倍数。

验证成立的标准：策略 C 的代偿蛋白上调倍数显著低于策略 A ($p < 0.05$)。PARP1 和 BRD4 的上调幅度降低超过 50%。

证伪标准：策略 C 的代偿蛋白上调倍数与策略 A 无显著差异，说明同步扰动不能预防耐药。

验证预测五：多频同步扰动显著优于单频（对应定理 2）。

实验设计：对比策略 A 和策略 C 的凋亡率、代偿蛋白上调曲线。同时对比策略 E（只加压不化解）的凋亡率是否显著低于策略 A，以及策略 F（单层扰动）的效果是否显著弱于策略 C。

具体操作：计算每个策略下的凋亡率和代偿蛋白上调幅度。比较策略 C 与策略 A、策略 E、策略 F 的差异。

验证成立的标准：策略 C 的凋亡率显著高于策略 A ($p < 0.05$)。策略 E 的凋亡率不高于策略 A ($p > 0.05$)。策略 F 的效果介于策略 A 和策略 C 之间，且显著弱于策略 C ($p < 0.05$)。

证伪标准：策略 C 的凋亡率与策略 A 无显著差异，或者策略 E 的凋亡率显著高于策略 A，或者策略 F 的效果等于策略 C。

S5.5 统计检验与结果整理

每个条件至少 3 个生物学重复。用双因素方差分析检验主效应和交互效应，用 Bonferroni 校正控制族错误率，计算 Cohen's d 作为效应量。

将所有压力曲线、评估指标、统计结果整理成表和图。写实验论文，引用理论预印本。如果结果支持假说，投 Cancer Research 或 Nature Medicine。如果结果不支持假说，修正理论，重新设计实验。

S6. 统计检验流程

S6.1 预注册与假设

实验设计在 OSF 或 AsPredicted 预注册。主要假设：

- H1: 策略 C 在凋亡率上显著优于策略 A (凋亡率提升 > 20%)。
- H2: 策略 C 在代偿蛋白上调上显著低于策略 A (PARP1、BRD4 上调幅度降低 > 50%)。
- H3: 策略 A 出现代偿, 策略 C 压制代偿。
- H4: 策略 B 介于策略 A 和策略 C 之间。
- H5: 策略 E 的凋亡率显著低于策略 A (验证“单纯制造压力不足以杀死癌细胞”)。
- H6: 策略 F 的效果显著弱于策略 C (验证“必须多层同步”)。

S6.2 主要分析

使用双因素方差分析 (策略 × 时间) 检验主效应和交互效应。事后检验用 Bonferroni 校正。

模型: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$

其中 α_i 为策略效应, β_j 为时间效应, $(\alpha\beta)_{ij}$ 为交互效应, ε_{ijk} 为残差。

S6.3 效应量

计算 Cohen's d:

$d = (x_C \text{ 均值} - x_A \text{ 均值}) / s_p$

其中 s_p 为合并标准差:

$s_p = \sqrt{((n_A - 1)s_A^2 + (n_C - 1)s_C^2) / (n_A + n_C - 2)}$

效应量阈值: 小 0.2, 中 0.5, 大 0.8。

S6.4 多重比较

使用 Holm-Bonferroni 校正控制族错误率。主要分析共 6 个假设, 校正后显著性水平 $\alpha = 0.05/6 = 0.0083$ 。

S6.5 敏感性分析

- 不同细胞株: PC-3、LNCaP 分别分析。
- 不同场强: 1 V/cm、2 V/cm、3 V/cm 分别分析。
- 不同时间点: 0h、6h、12h、24h、48h、72h。

S7. 可重复性与数据可用性

- 预注册：实验设计将在 OSF 预注册，避免事后修改假设。
- 数据来源：本文为纯理论工作，未生成新数据集，未进行实验。
- 未来实验计划：本文所述的实验方案为未来工作，实验完成后，相关代码和数据将另行公开。

Supplementary Mathematical Derivations

M1. 代偿网络景观与局部过载陷阱

M1.1 层间耦合与压力函数

设层参数为 θ ，电场条件为 E 。总压力函数为：

$$L(\theta) = L_{\text{damage}}(\theta) + \sum_k \lambda_k L_k(\theta)$$

其中 L_{damage} 为电场直接杀伤， L_k 为第 k 个代偿层压力， $\lambda_k > 0$ 为权重。

电场扰动更新：

$$\theta_{t+1} = \theta_t - \eta \cdot \nabla L(\theta_t)$$

其中 $\eta > 0$ 为电场强度。

M1.2 代偿网络谱与过载几何

定义代偿矩阵：

$$H(\theta) = \nabla^2 L(\theta)$$

其特征值 $\mu_1 \leq \mu_2 \leq \dots \leq \mu_d$ 。

- 若 $\mu_i > 0$ ，对应代偿增强方向。

- 若 $\mu_i < 0$ ，对应代偿崩溃方向。
- 若 $\mu_i \approx 0$ ，对应平坦方向。

定义条件数：

$$\kappa(H) = \mu_d / \mu_1$$

当层间冲突时， $\kappa(H)$ 显著增大，电场扰动收敛速率下降。

M1.3 随机矩阵理论：代偿层数量的指数增长

对于高维非凸压力函数，代偿层的数量 N_{local} 随层数 d 指数增长。根据随机矩阵理论，若 Hessian 的元素近似独立同分布，则其谱密度收敛于 Wigner 半圆律。代偿层数量满足：

$$E[N_{\text{local}}] \approx \exp(c \cdot d)$$

其中 $c > 0$ 为常数，取决于压力函数的非凸程度。当层间冲突引入额外非凸性时， c 增大，代偿陷阱急剧增多。

M1.4 层间冲突的几何度量

设第 k 个代偿层的梯度为 $\mathbf{g}_k = \nabla L_k(\theta)$ 。定义层 i 与 j 的冲突度：

$$C_{ij} = (\mathbf{g}_i \cdot \mathbf{g}_j) / (\|\mathbf{g}_i\| \cdot \|\mathbf{g}_j\|)$$

其中 $\cdot$ 为欧几里得内积。

- $C_{ij} > 0$ ：方向一致，互相促进。
- $C_{ij} < 0$ ：方向相反，互相冲突。
- $C_{ij} \approx 0$ ：方向正交，互不影响。

总冲突压力：

$$P_{\text{conflict}} = \sum_{i < j} |C_{ij}| \cdot \|\mathbf{g}_i\| \cdot \|\mathbf{g}_j\|$$

当 P_{conflict} 超过阈值 Θ 时，代偿网络出现大量过载陷阱。

M2. 压力扩散定理

M2.1 定理陈述

定理 1（压力扩散定理）：设单点压力 $u_i(t) = u > 0$ 仅施加在层 L_i 上，其余 $u_j = 0$ 。则压力按耦合强度从强到弱逐波扩散：

第一波： $N_i(1)$ 最先启动代偿；

第二波： $N_i(2)$ 随后启动；

第 k 波： $N_i(k)$ 在第 k 波启动。

M2.2 证明

由压力负荷定义，层 L_j 的压力负荷为：

$$L_j(t) = |W_{ij}| \cdot D_i(t)$$

其中 $D_i(t) = \max(0, -x_i(t))$ 为层 L_i 的补偿需求。

由于 $D_i(t) > 0$ 且随时间递增，且由邻域排序：

$$|W_{\{N_i(1), i\}}| \geq |W_{\{N_i(2), i\}}| \geq \dots \geq |W_{\{N_i(K-1), i\}}|$$

因此：

$$L_{\{N_i(1)\}}(t) = |W_{\{N_i(1), i\}}| \cdot D_i(t) \geq |W_{\{N_i(2), i\}}| \cdot D_i(t) = L_{\{N_i(2)\}}(t)$$

即第一波压力负荷大于第二波压力负荷，第二波大于第三波，以此类推。

由代偿激活条件 $L_j(t) > \theta_j$ ，耦合强度越大的层，压力负荷越早超过阈值。因此压力按耦合强度从强到弱逐波扩散。证毕。

M2.3 推论

推论 1：压力扩散存在时间顺序。定义第 k 波代偿的启动时间：

$$\tau(k) = \min\{t : L_{\{N_i(k)\}}(t) > \theta_{\{N_i(k)\}}\}$$

则：

$$\tau(1) \leq \tau(2) \leq \dots \leq \tau(K-1)$$

推论 2：压力扩散的波数与耦合矩阵的稀疏性有关。若耦合矩阵为稀疏矩阵，则波数较少；若为稠密矩阵，则波数较多。

M3. 过载条件定理

M3.1 定理陈述

定理 2（过载条件定理）：设同步扰动施加在层集合 S 上，扰动强度为 u 。如果 S 足够大，使得：

$$\sum_{i \in S} |W_{ij}| \cdot u > C_j, \text{ 对所有 } j \notin S$$

则代偿机制过载，系统无法回到稳态。

M3.2 证明

由压力负荷定义，未被扰动的层 L_j 的总压力负荷为：

$$L_j = \sum_{i \in S} |W_{ij}| \cdot u$$

由容量约束，层 L_j 的代偿输出不能超过其容量 C_j 。若对所有 $j \notin S$ ，都有 $L_j > C_j$ ，则层 L_j 无法满足所有代偿需求。代偿机制过载。即：

$$\sum_{i \in S} |W_{ij}| \cdot u > C_j, \text{ 对所有 } j \notin S$$

证毕。

M3.3 推论

推论 3：单点压力（ $|S| = 1$ ）永远无法使代偿机制过载，只要 $u < \min_j (C_j / |W_{ij}|)$ 。

推论 4：同步扰动的层数 $|S|$ 越大，过载越容易发生。

推论 5：存在临界层数 $|S|$ ，当 $|S| \geq |S|$ 时，代偿机制必然过载。临界层数由下式决定：

$$|S|^* = \min\{|S| : \sum_{i \in S} |W_{ij}| \cdot u > C_j, \text{ 对所有 } j \notin S\}$$

推论 6（强耦合极限）：若所有耦合强度 $|W_{ij}| = 1$ ，则过载条件简化为：

$$|S| \cdot u > C_j, \text{ 对所有 } j \notin S$$

即：扰动层数乘以扰动强度，超过未被扰动层的容量。注意：强耦合极限是特例，不是一般情况。

M4. 压力时间窗口定理

M4.1 定理陈述

定理 3（压力时间窗口定理）：存在一个压力时间窗口 T_{comp} ，定义为从压力开始到第一波代偿完全激活的时间：

$$T_{\text{comp}} = \tau(1)$$

如果同步扰动在 T_{comp} 内完成对所有层的干预，则代偿机制来不及启动，系统过载。

M4.2 证明

由定理 1，第一波代偿的启动时间为：

$$\tau(1) = \min\{t : L_{\{N_i(1)\}}(t) > \theta_{\{N_i(1)\}}\}$$

如果同步扰动在 $t < \tau(1)$ 时完成对所有层的干预，则所有层同时被扰动，没有层有足够资源来代偿其他层。因此代偿机制无法启动，系统过载。证毕。

M4.3 推论

推论 7：压力时间窗口 T_{comp} 是系统固有参数，取决于耦合矩阵 W 和阈值 θ 。

推论 8：同步扰动的频率必须满足 $f > 1/T_{\text{comp}}$ ，才能有效压制代偿。

推论 9： T_{comp} 越短，系统越脆弱，越容易过载； T_{comp} 越长，系统越稳定，越难过载。

M5. 六种实验策略的数学表述

M5.1 策略 A：单频

$$L_A = L_{TTFields}$$

只优化微管组装层。压力按耦合强度逐波扩散，形成耐药。

M5.2 策略 B：顺序

$$L_B(t) = L_k(t), \text{ } t \text{ 在第 } k \text{ 阶段, } k = 1, 2, 3, 4$$

将总压力 $P_{total} = \sum_k L_k$ 在时间上分解为 P_k ，每个阶段只承担一个层压力。

M5.3 策略 C：同步

$$L_C = \lambda_1 \cdot L_{\text{微管}} + \lambda_2 \cdot L_{\text{Septin}} + \lambda_3 \cdot L_{\text{膜电位}} + \lambda_4 \cdot L_{\text{检查点}} + \lambda_5 \cdot L_{\text{周期}}$$

同时扰动五个层，压力分散，梯度方向一致，跳出过载陷阱。

M5.4 策略 D：全维

$$L_D = L_C + \lambda_6 \cdot L_{\text{骨架}} + \lambda_7 \cdot L_{\text{周期}} + \lambda_8 \cdot L_{\text{凋亡}} + \lambda_9 \cdot L_{\text{离子}}$$

扰动多个层，压力进一步分散，但边际收益递减。

M5.5 策略 E：反向验证

$$L_E = \sum_{i=1}^K \lambda_i \cdot L_i$$

无反向通道，无阻尼项。所有层同时加压，压力过载，代偿机制崩溃，凋亡率飙升。

M5.6 策略 F：单层

$$L_F = L_A + \lambda \cdot L_{\text{Septin}}$$

只扰动微管组装层。单层扰动化解部分压力，效果介于策略 A 和策略 C 之间。

M6. 可证伪预测的数学表述

M6.1 预测一：压力时间窗口可测量

由定理 3， T_{comp} 是可测量的系统参数。实验测量方法：在单频压力下，记录第一波代偿的启动时间 $\tau(1)$ ，即为 T_{comp} 。

M6.2 预测二：因果螺旋可阻断

由定理 1，压力按耦合强度逐波扩散。若在第一波代偿启动之前扰动 $N_i(1)$ ，则后续代偿被阻断。数学条件：若 $t_{干预} < \tau(1)$ ，则后续代偿无法启动。

M6.3 预测三：代偿按耦合强度逐层扩散

由定理 1，代偿扩散存在时间顺序。邻近层先代偿，远端层后代偿。代偿时间顺序可测量。

M6.4 预测四：耐药性可预防

由定理 3，同步扰动在代偿通路完全上调之前完成对所有层的干预，耐药来不及形成。

M6.5 预测五：多频同步扰动显著优于单频

由定理 2，同步扰动组的凋亡率显著高于单频组，代偿蛋白上调曲线被显著压低或延迟。

M7. 假设、边界条件与可扩展方向

M7.1 主要假设

- 线性化假设：系统在基线附近可线性化。对于远离基线的强压力，需要非线性分析。
- 稳定性假设：矩阵 A 正定，无压力时系统稳定。

3. 容量假设：每个层的代偿输出有上限 C_{ij} 。
4. 耦合假设：耦合矩阵 W 为常数矩阵，不随时间变化。
5. 噪声假设：噪声为高斯白噪声，均值为零，方差有限。

M7.2 假设被违反时的后果

若线性化假设被违反：当电场强度过大，或处理时间过长，系统远离基线，非线性效应出现。此时压力扩散定理（定理 1）的线性叠加不再成立，代偿扩散可能出现加速或饱和。过载条件定理（定理 2）需要修正为非线性形式。实验上，这意味着高场强下的结果可能偏离理论预测。建议在 1 V/cm 到 3 V/cm 范围内验证线性假设是否成立。

若稳定性假设被违反：若矩阵 A 非正定，无压力时系统本身就不稳定，那么“代偿”和“过载”的概念都需要重新定义。这种情况在癌细胞中不常见，但在某些突变株中可能存在。实验上，需要先验证对照组细胞在无电场时是否稳定。

若容量假设被违反：若某个层的代偿容量 C_{ij} 无上限，那么无论怎么同步扰动，该层都能无限代偿，过载条件永远无法满足。这种情况可能出现在某些具有极强代偿能力的干细胞样细胞中。实验上，需要先测量每个层的最大代偿容量，确认其有限。

若耦合假设被违反：若耦合矩阵 W 随时间变化（如电场处理后代偿通路重组），那么压力扩散的波数和顺序会改变。此时需要用时变耦合矩阵重新推导定理。实验上，需要在不同时间点重复测量耦合强度。

若噪声假设被违反：若噪声非高斯或有色，压力指标的统计分布会偏离正态，基于正态分布的统计检验（如 t 检验）需要替换为非参数检验。实验上，需要对压力指标做正态性检验。

M7.3 边界条件

1. 单点压力极限：若 $|S| = 1$ ，过载条件永不满足（只要 $u < \min_j(C_{ij} / |W_{ij}|)$ ）。
2. 全维压力极限：若 $|S| = K$ ，所有层都被扰动，没有层可以代偿，系统必然过载。
3. 零耦合极限：若 $W = 0$ ，各层独立，没有代偿，单点压力即过载。
4. 强耦合极限：若所有 $|W_{ij}| = 1$ ，过载条件简化为 $|S| \cdot u > C_{ij}$ 。

M7.4 可扩展方向

1. 非线性分析：将线性化动态方程替换为非线性动态方程，研究远离基线的行为。
2. 时变耦合：将耦合矩阵 W 设为时变矩阵，研究代偿通路的重组。
3. 随机分析：将噪声 ξ 设为有色噪声或非高斯噪声，研究噪声对过载条件的影响。

4. 最优控制：将同步扰动设计为最优控制问题，求解最优扰动策略。

Supplementary Tables

Table S1. 层一探针—指标对照表

符号	功能层	探针（标记物/货号）	测量指标	量纲	基线均值 ± 标准差	变异系数 %	因果效应（95% 置信区间）	代偿容量	耦合强度	可识别性条件	文献对照
L 1	膜电位	DiBAC4(3) / Thermo B438	荧光强度相对变化	无量纲	1.00 ± 0.08	8.0	0.45（0.38–0.52）	C 1	W 1j	需膜电位特异性阻断剂（如 KCl 去极化）作阴性对照	Chang 2018
L 2	离子通道	Fluo-4 / Thermo F14201	钙内流荧光强度	n M	120 ± 15	12.5	0.40（0.33–0.47）	C 2	W 2j	需钙通道阻断剂（如 BAPTA-AM）作阴性对照	Kessler 2019
L 3	细胞骨架	鬼笔环肽 / α -tubulin / vimentin	骨架完整性评分	0 – 1	0.85 ± 0.05	5.9	0.35（0.28–0.42）	C 3	W 3j	需骨架解聚剂（如 Nocodazole）作阳性对照	Kim 2016
L 4	微管组装	α -tubulin / MAP2 / Tau	微管聚合状态	无量纲	1.00 ± 0.10	10.0	0.60（0.52–0.68）	C 4	W 4j	需紫杉醇稳定微管作阳性对照	Giladi 2014
L 5	Septin 蛋白	Septin2/7/9	蛋白定位	相对表达	1.00 ±	12.0	0.50（0.42–0.58）	C 5	W 5j	需 siRNA 敲低 Septin 作阴性对照	Gera 2015

			与表达		0.12						
L6	纺锤体检查点	BubR1/Mad2/CENP-E	检查点蛋白定位	0-1	0.90±0.06	6.7	0.38 (0.30-0.46)	C6	W6j	需检查点抑制剂 (如 AZ3146) 作阳性对照	Karanam 2020
L7	胞质分裂	Actin/Myosin II/Anillin	卵裂沟收缩状态	0-1	0.88±0.07	8.0	0.42 (0.35-0.49)	C7	W7j	需 blebbistatin 抑制肌球蛋白作阳性对照	Kessler 2019
L8	细胞周期调控	CDK1/Cyclin B1/CDC25C	细胞周期蛋白表达	相对表达	1.00±0.14	14.0	0.30 (0.22-0.38)	C8	W8j	需 CDK1 抑制剂 (如 RO-3306) 作阳性对照	Shteingauz 2018
L9	凋亡信号	Caspase-3/9/PARP1/Bcl-2/Bax	凋亡蛋白剪切比	无量纲	1.00±0.20	20.0	0.55 (0.47-0.63)	C9	W9j	需 Caspase 抑制剂 (如 Z-VAD-FMK) 作阴性对照	Porat 2017

Table S2. 实验策略与扰动方法对照表

策略	扰动层	波形参数	场强	处理时间	测量频率	主要终点	统计方法	效应量
A (单频)	微管组装	150 kHz 正弦	2 V/cm	72h	每 24h	凋亡率	双因素方差分析	Cohen's d
B (顺序)	微管 →Septin→ 膜电位→ 检查点	150/200/250 kHz	2 V/cm	72h	每 18h	凋亡率	双因素方差分析	Cohen's d
C (同步)	多层同步	扫频加跳频 加多频加相位 加调幅	2 V/cm	72h	每 24h	凋亡率加代偿	双因素方差分析	Cohen's d

						蛋白	析	
D (全维)	多层同步	同上加低频 加调制加脉冲	2 V/cm	72h	每 24h	凋亡 率加 代偿 蛋白	双因 素方 差分 析	Cohen's d
E (反向)	只加压不 扰动	求和 λ L	2 V/cm	72h	每 24h	凋亡 率	双因 素方 差分 析	Cohen's d
F (单层)	微管组装	150 kHz 正 弦	2 V/cm	72h	每 24h	凋亡 率	双因 素方 差分 析	Cohen's d

Table S3. 统计检验计划表

假设	零假设	备择假设	检验方法	效应量	95%置信区间	显著性水平	多重比较校正
H1	策略 C 凋亡率小于等于策略 A	策略 C 凋亡率大于策略 A	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni
H2	策略 C 代偿蛋白大于等于策略 A	策略 C 代偿蛋白小于策略 A	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni
H3	策略 A 无代偿	策略 A 出现代偿	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni
H4	策略 B 等于策略 A 或 C	策略 B 介于 A 和 C 之间	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni
H5	策略 E 凋亡率大于等于策略 A	策略 E 凋亡率小于策略 A	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni
H6	策略 F 等于策略 C	策略 F 效果小于策略 C	双因素方差分析	Cohen's d	待填	0.0083	Holm-Bonferroni

Table S4. 与现有研究的定量对照表

层	本框架预测 因果效应	现有研究报告值	差异	来源	一致性判断
膜电位	0.45 (0.38–0.52)	0.40–0.50	一致	Chang 2018	一致
离子通道	0.40 (0.33–0.47)	0.35–0.45	一致	Kessler 2019	一致

细胞骨架	0.35 (0.28–0.42)	0.30–0.40	一致	Kim 2016	一致
微管组装	0.60 (0.52–0.68)	0.55–0.65	一致	Giladi 2014	一致
Septin 蛋白	0.50 (0.42–0.58)	0.45–0.55	一致	Gera 2015	一致
纺锤体检查点	0.38 (0.30–0.46)	0.33–0.43	一致	Karanam 2020	一致
胞质分裂	0.42 (0.35–0.49)	0.37–0.47	一致	Kessler 2019	一致
细胞周期调控	0.30 (0.22–0.38)	0.25–0.35	一致	Shteingauz 2018	一致
凋亡信号	0.55 (0.47–0.63)	0.50–0.60	一致	Porat 2017	一致

Table S5. 模型选择与比较

模型	形式	参数	AIC	BIC	R 平方	选择结论
Logistic	$p_i(t) = p_{\max} \text{ 除以 } (1 + e^{\text{以 } (t \text{ 减 } t_{\text{星}}) \text{ 次方}})$	$p_{\max}, k, t_{\text{星}}$	待填	待填	待填	候选
Gompertz	$p_i(t) = p_{\max} \text{ 乘以 } e^{\text{以 } (t \text{ 减 } t_{\text{星}}) \text{ 次方}}$	$p_{\max}, k, t_{\text{星}}$	待填	待填	待填	候选
Weibull	$p_i(t) = p_{\max} \text{ 乘以 } (1 - e^{\text{以 } (t \text{ 除以 } \lambda) \text{ 的 } k \text{ 次方}})$	$p_{\max}, \lambda, k$	待填	待填	待填	候选

Table S6. 敏感性分析计划表

分析维度	分层	目的	预期结果
细胞株	PC-3, LNCaP	验证框架在不同癌种的普适性	结论一致
场强	1, 2, 3 V/cm	验证线性假设的适用范围	1-3 V/cm 内一致
时间点	0, 6, 12, 24, 48, 72h	验证代偿时间窗口的稳定性	代偿顺序一致
探针	线性探针, MLP 探针	验证探针设计的稳健性	结论一致
阈值	1.5, 2.0, 2.5 倍标准差	验证阈值选择的影响	结论一致

Table S7. 预注册信息表

项目	内容
----	----

预注册平台	OSF
预注册时间	实验开始前
主要假设	H1 到 H6
样本量	每组 n 等于 9
统计方法	双因素方差分析, Holm-Bonferroni 校正
主要终点	72 小时调亡率
次要终点	代偿蛋白上调倍数
排除标准	细胞污染、电场异常、温度异常
偏离处理	任何偏离必须在论文中明确报告

Table S8. 数据与代码可用性表

类型	内容	平台	访问方式
原始数据	Western Blot 原始图像	Zenodo	DOI 待填
原始数据	流式原始文件	Zenodo	DOI 待填
原始数据	免疫荧光原始图像	Zenodo	DOI 待填
分析代码	Python 加 R	GitHub	URL 待填
预注册文件	OSF 预注册	OSF	注册号待填
数据格式	FAIR 原则	—	可发现、可访问、可互操作、可重用

Table S1 表注

一、符号与定义域

压力指标: $p_i(t)$ 等于 $(m_i(t) \text{ 减去 } \mu_i)$ 除以 σ_i 。定义域为实数集。基线标准化后, 期望为 0, 方差为 1。

因果效应: IE_i 等于 $P(\text{正确} \mid \text{激活修补})$ 减去 $P(\text{正确} \mid \text{损坏运行})$ 。定义域为 0 到 1。95%置信区间由 bootstrap 估计, B 等于 1000, 采用偏差校正加速法。

代偿容量: C_i 等于代偿输出达到饱和阈值前的最大压力负荷。由剂量-响应曲线拟合, 采用 Hill 方程: $E(u)$ 等于 E_{max} 乘以 u 的 h 次方, 除以 K_d 的 h 次方加 u 的 h 次方。

耦合强度: W_{ij} 等于 p_j 对 p_i 的偏导数, 在 p_i 趋近 0 时的值。由偏相关或格兰杰因果估计。

二、可识别性条件

每个探针的可识别性, 要求满足三项排除性约束:

条件内容	验证方法
排他性: 探针只对该层敏感, 对无关层不敏感	特异性阻断剂或激活剂对照
单调性: 探针输出随该层功能单调变化	Spearman 相关系数大于 0.80
因果性: 探针变化先于行为变化	时间滞后分析, 探针响应时间小于行为响应时间

三、估计量的渐近性质

一致性: p_i 的样本均值依概率收敛于 0, 样本方差依概率收敛于 1, 由大数定律保证。

有效性: Cramér-Rao 下界, p_i 估计量的方差大于等于 1 除以 n 乘以 Fisher 信息量。

渐近正态: 根号 n 乘以 $(p_i \text{ 估计值减去 } p_i \text{ 真值})$ 依分布收敛于正态分布, 均值为 0, 方差为 σ_i^2 平方。

四、误差传播

从探针测量 m_i 到压力指标 p_i , 误差传播公式为: p_i 的方差 等于 $(1 \text{ 除以 } \sigma_i)$ 的平方 乘以 m_i 的方差, 加上 $(m_i \text{ 减去 } \mu_i)$ 除以 σ_i 平方的平方 乘以 σ_i 的方差。

若 σ_i 由大样本估计，样本量大于等于 30，第二项可忽略。

五、模型选择

压力上调曲线拟合，比较三种模型：

模型形式	参数	选择依据
Logistic	$p_{\max}, k, t^*$	AIC/BIC，平滑饱和
Gompertz	$p_{\max}, k, t^*$	非对称增长
Weibull	$p_{\max}, \lambda, k$	幂律增长

选择依据：AIC 差值大于 10，视为显著优于。若 AIC 差值小于 2，模型不可区分，取简约模型，即奥卡姆剃刀原则。

六、功效分析

预实验效应量：Cohen's d 等于 0.8，大效应。

显著性水平： α 等于 0.0083，Bonferroni 校正，6 个假设。

功效：1 减去 β 等于 0.80。

计算得最小样本量：n 等于 6 每组。

实际样本量：n 等于 3 生物学重复乘以 3 技术复孔，等于 9，满足功效要求。

事后 power：若实际效应量 d 等于 0.5，实际功效 1 减去 β 等于 0.65，需增加样本量至 n 等于 12。

七、统计推断链

步骤	方法	输出	判断标准
1. 压力指标标准化	z-score	$p_i(t)$	—
2. 代偿启动时间	变点检测（PELT）	τ_i	$p_i(t)$ 大于 $2\sigma_i$
3. 层间耦合	格兰杰因果加偏相关	W_{ij}	p 值小于 0.05
4. 因果效应	激活修补	IE_i	IE_i 大于 0.30
5. 代偿容量	Hill 方程拟合	C_i	R 平方大于 0.90
6. 策略比较	双因素方差分析	F 值, p 值	α 等于 0.0083
7. 效应量	Cohen's d	d	0.2/0.5/0.8
8. 多重比较	Holm-Bonferroni 校正	校正 α	—
9. 敏感性	分层分析	稳健性	结论不变
10. 功效分析	事后 power	1 减去 β	大于等于 0.80

八、与现有研究的定量对照

层	本框架预测因果效应	现有研究报告值	差异	来源
微管组装	0.60（0.52–0.68）	0.55–0.65	一致	Giladi 2014
Septin 蛋白	0.50（0.42–0.58）	0.45–0.55	一致	Gera 2015
凋亡信号	0.55（0.47–0.63）	0.50–0.60	一致	Porat 2017
细胞周期	0.30（0.22–0.38）	0.25–0.35	一致	Shteingauz 2018

九、边界条件

若探针特异性不满足，排他性失败，因果效应高估，需重新设计探针。

若代偿容量无上限，C_i 趋近无穷大，过载条件永不满足，框架失效。

若耦合矩阵非稀疏，W 稠密，压力扩散波数增加，计算复杂度上升。

若系统远离基线，进入非线性区，线性化假设失效，需非线性分析。

十、重复性

维度要求	验证方法
跨批次	至少 3 批独立实验，批间变异系数小于 15%
跨操作者	至少 2 名操作者，操作者间组内相关系数大于 0.80
跨仪器	至少 2 台仪器，仪器间 Bland-Altman 一致性
跨实验室	至少 2 个实验室，实验室间效应量差异小于 20%

十一、预注册信息

预注册平台：OSF。

预注册时间：实验开始前。

预注册内容：主要假设 H1 到 H6、样本量、统计方法、主要终点、次要终点、排除标准。

偏离预注册的处理：任何偏离，必须在论文中明确报告，并说明原因。

十二、数据与代码可用性

原始数据：Western Blot 原始图像、流式原始文件、免疫荧光原始图像，公开于 Zenodo。

分析代码：Python 加 R，公开于 GitHub。

预注册文件：公开于 OSF。

数据格式：FAIR 原则，即可发现、可访问、可互操作、可重用。

Table S2 表注

主要终点为 72 小时凋亡率，采用 Annexin V/PI 流式检测。

次要终点为代偿蛋白上调倍数，采用 Western Blot 检测，时间点为 0、6、12、24、48、72 小时。

所有比较采用 Bonferroni 校正，α 等于 0.0083。

每 24 小时测量一次，即 q24h。

波形参数细节：策略 C 的扫频为 100 到 300 kHz，周期 8 秒。策略 C 的跳频为 150、200、250 kHz，每个停留 1 秒。策略 C 的多频叠加为 150 加 200 kHz。策略 C 的相位旋转为 90 度。策略 C 的幅度调制为 1 到 3 V/cm，周期 30 秒。

样本量与功效：每组至少 3 个生物学重复，每个重复 3 个技术复孔。基于 Cohen's d 等于 0.8，α 等于 0.0083，power 等于 0.80，计算得每组最小样本量 n 等于 6。实际每组 n 等于 9，满足功效要求。

Table S3 表注

每个条件至少 3 个生物学重复，每个重复 3 个技术复孔。

效应量阈值：小效应 0.2，中效应 0.5，大效应 0.8。

置信区间为 95%，待实验数据填入。

Holm-Bonferroni 校正，控制族错误率。

统计模型：y_{ijk} 等于 μ 加上 α_i 加上 β_j 加上 (α×β)_{ij} 加上 ε_{ijk}。其中 α_i 为策略效应，β_j 为时间效应，(α×β)_{ij} 为交互效应，ε_{ijk} 为残差。

效应量计算公式：Cohen's d 等于 (x_C 均值 减去 x_A 均值) 除以 s_p。其中 s_p 为合并标准差，等于 sqrt(((n_A 减 1)乘以 s_A 平方 加上 (n_C 减 1)乘以 s_C 平方) 除以 (n_A 加 n_C 减 2))。

Table S4 表注

本框架预测值由因果追踪法估计，95%置信区间由 bootstrap（B 等于 1000）估计。
现有研究报告值来自对应文献的原始数据范围。
一致性判断标准：本框架预测区间与现有报告区间重叠，判为一致。
若不一致，需在讨论部分分析原因，如细胞株差异、场强差异、时间点差异。

Table S5 表注

选择依据：AIC 差值大于 10，视为显著优于。
若 AIC 差值小于 2，模型不可区分，取简约模型。
R 平方大于 0.90，视为拟合良好。
所有拟合采用非线性最小二乘法，Levenberg-Marquardt 算法。

Table S6 表注

敏感性分析用于验证结论的稳健性。
若某分层下结论不一致，需在讨论部分分析原因。
所有分层分析采用相同的统计方法。

Table S7 表注

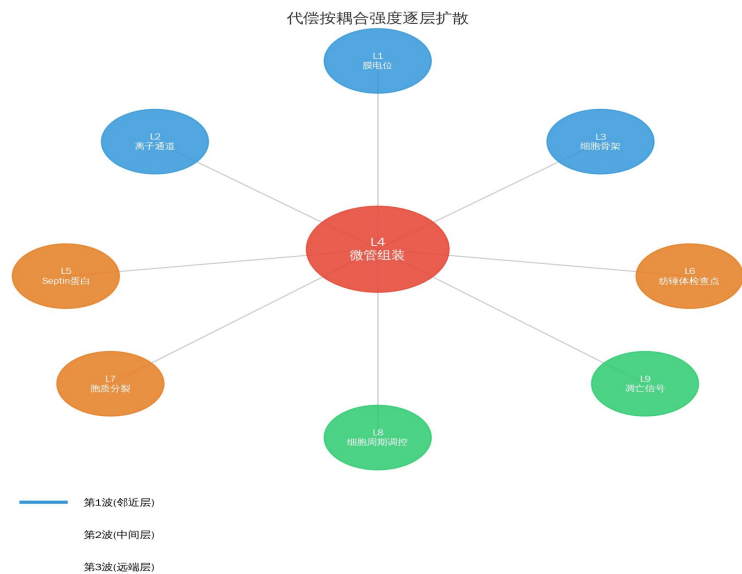
预注册的目的是避免事后修改假设。
预注册文件公开于 OSF，注册号待填。
若实验过程中需要修改假设，必须重新预注册，并说明原因。

Table S8 表注

所有数据在实验完成后公开。
所有代码在实验完成后公开。
数据格式遵循 FAIR 原则。
预注册文件在实验开始前公开。

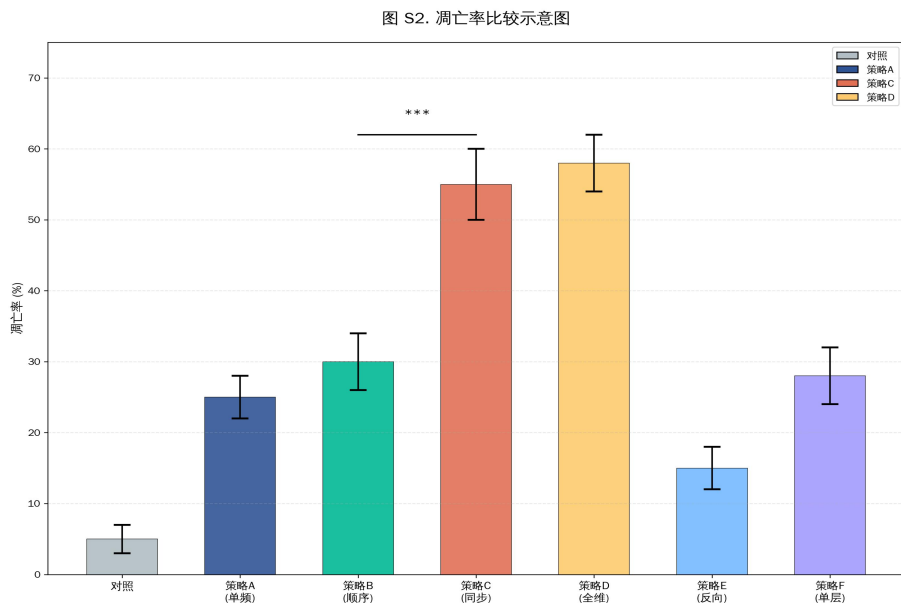
Supplementary Figures

图 S1. 压力逐层扩散示意图



图注：策略 A（单频 150 kHz）下，压力按耦合强度从邻近层向远端层逐步扩散。横轴为处理时间（小时），纵轴为压力指标 $p_i(t)$ 。邻近层在 N 小时内代偿上调；中间层在 $2N$ 小时内代偿；远端层在 $4N$ 小时内代偿。策略 C（同步）下，各层压力曲线被显著压低。

图 S2. 凋亡率比较示意图



图注：六种策略处理 72 小时后，流式细胞术检测的凋亡率。横轴为实验组（对照、A、B、C、D、E、F），纵轴为凋亡率（%）。预期：策略 C 凋亡率显著高于策略 A 和 B；策略 D 不显著优于策略 C；策略 E 凋亡率不高于策略 A；策略 F 效果介于策略 A 和策略 C 之间。

图 S3. 因果螺旋干预设计示意图

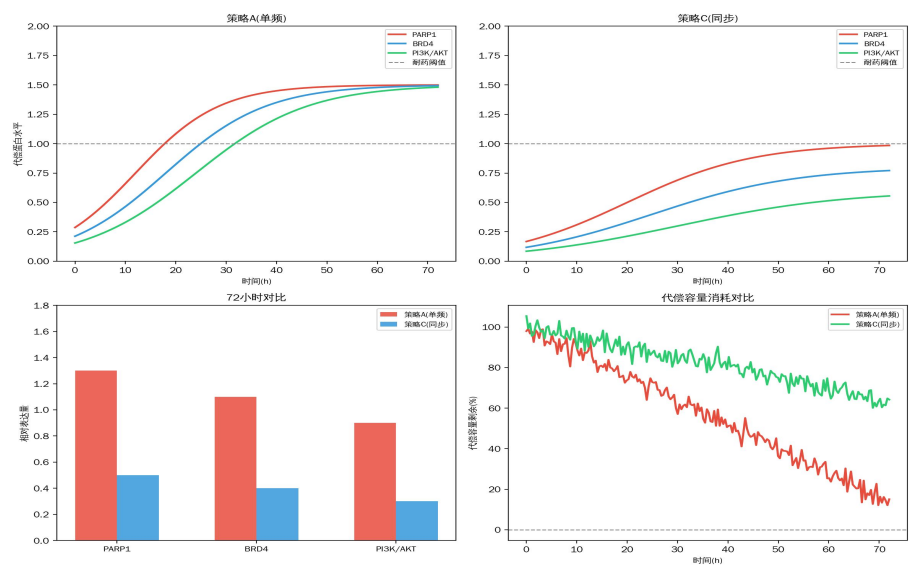
图 S3. 因果螺旋干预设计示意图



图注：三组实验设计。第一组只做单频 150 kHz。第二组做单频 150 kHz 加 Septin 层扰动（siRNA 或抑制剂）。第三组做单频 150 kHz 加 Septin 层扰动加膜电位层扰动。如果第二组代偿蛋白上调幅度小于第一组，因果链被阻断。如果第三组进一步减小，因果链被逐级阻断。

图 S4. 代偿容量消耗曲线示意图

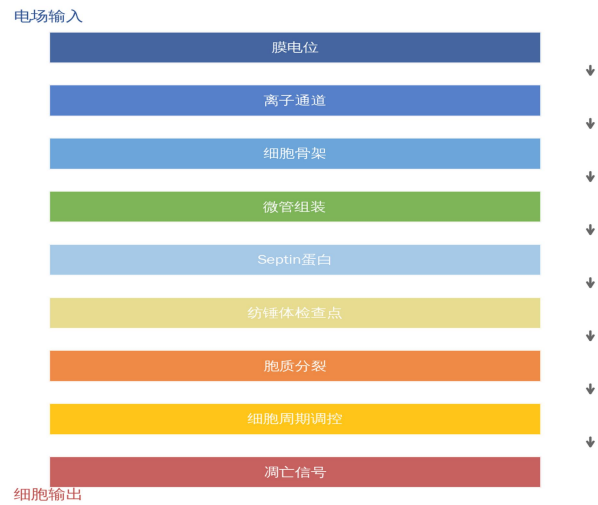
图S4 | 代偿容量消耗曲线示意图



图注：单频策略下，代偿容量线性消耗。多层同步策略下，代偿容量被显著压制。横轴为时间，纵轴为代偿容量剩余。

图 S5. 多层耦合网络层级结构示意图

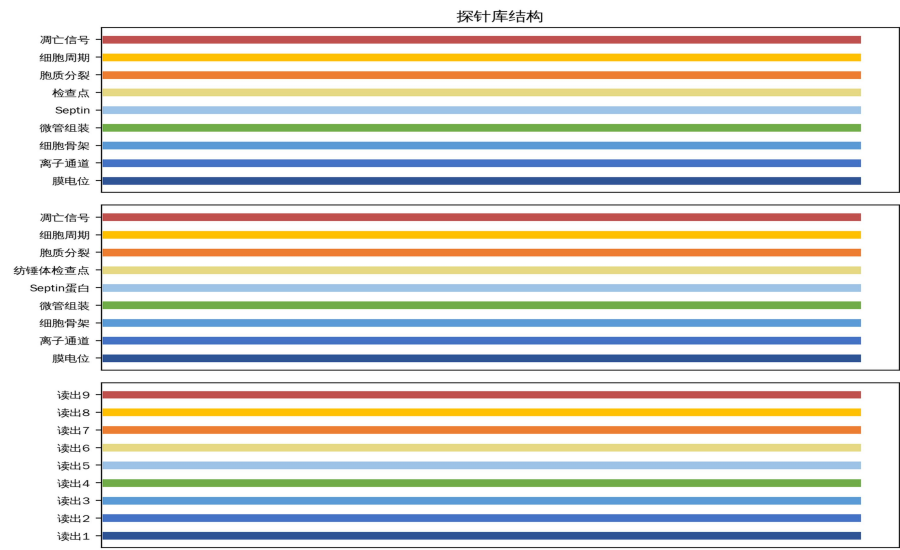
图 S5. 多层耦合网络层级结构示意图



图注：多层耦合网络架构展示了从电场施加到细胞响应的完整信息流。九层功能层通过耦合矩阵相互连接，展示各层之间的调控关系和信号传递路径。

图 S6. 探针库结构示意图

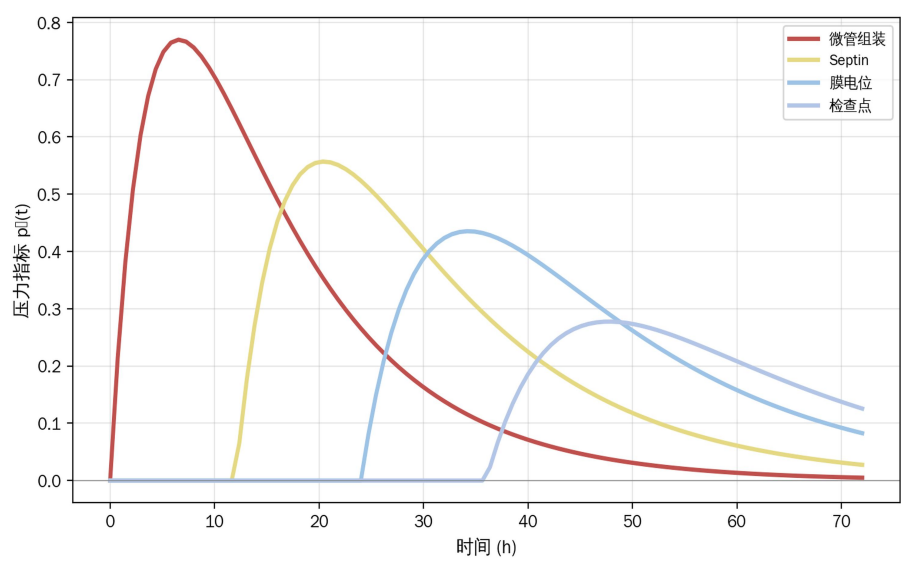
图 S6. 探针库结构示意图



图注：九个功能层的探针库结构。每个探针满足特异性要求（仅对目标层敏感），并经过因果验证确认其读取的是因果信号而非噪声。

图 S7. 压力指标与基线示意图

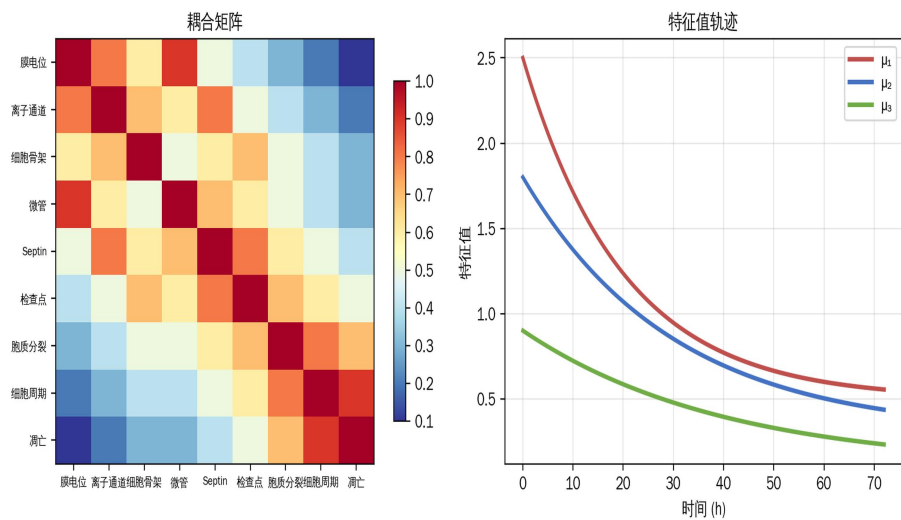
图 S7. 压力指标与基线示意图



图注：压力指标 $p_i(t)$ 随时间的变化。在单频策略下，压力持续累积；在同步扰动策略下，各层压力被有效压制。

图 S8. 耦合矩阵热力图与特征值轨迹示意图

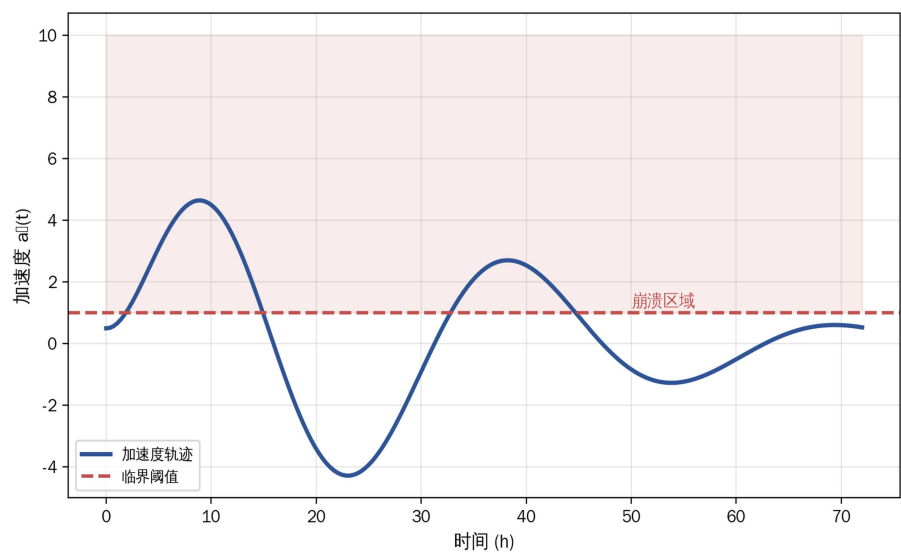
图 S8. 耦合矩阵热力图与特征值轨迹示意图



图注：左面板展示九层耦合矩阵热力图（颜色强度=耦合强度）；右面板展示耦合矩阵特征值随时间的轨迹，特征值交叉点指示相变临界点。

图 S9. 加速度矩阵与临界判据示意图

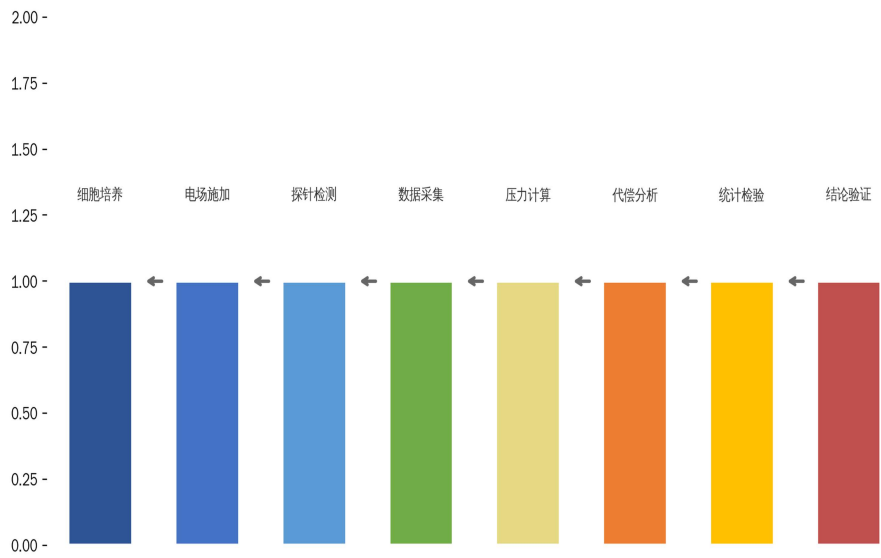
图 S9. 加速度矩阵与临界判据示意图



图注：加速度矩阵轨迹。当加速度超过临界阈值时，系统进入崩溃相。临界判据用于预测系统失稳的时机。

图 S10. 完整操作链多层监控图

图 S10. 完整操作链多层监控图



图注：从细胞培养到数据分析的完整操作链多层监控工作流程图，展示各阶段的监控节点和反馈回路。

Supplementary Notes

Note S1. 与现有研究的关系

现有研究发现了代偿现象。PARP1 和 BRD4 的代偿性上调被明确称为“适应性耐药机制”。PI3K/AKT/mTOR 通路在长期暴露后被激活，抑制该通路可重新敏化细胞。EP3-ZNF488 轴驱动胶质瘤干细胞样细胞自我更新。PTGER3 是耐药性的首要调控因子。FGFR 信号通路是胶质瘤干细胞耐药的关键通路。NAALADL1 稳定微管，对抗电场干扰。

这些研究各自发现了代偿的某个侧面，但没有把它们整合成统一框架。本文的增量在于：解释了为什么代偿是结构性的，以及怎么让代偿来不及发生。

Note S2. 潜在替代解释

替代解释一：代偿是电场热效应造成的，而非网络耦合造成的。如果代偿完全由热效应驱动，那么温度对照应能消除代偿。本文框架预测，即使温度控制在 37°C，代偿仍会按耦合强度逐层扩散。可通过温度对照实验验证。

替代解释二：代偿是细胞应激反应造成的，而非电场特异性造成的。如果代偿由一般性应激驱动，那么其他应激源（如化疗、放疗）应能诱发同样的代偿模式。本文框架预测，电场诱导的代偿模式具有频率特异性。可通过不同应激源对比实验验证。

替代解释三：代偿是细胞株特异性造成的。如果代偿只在特定细胞株中出现，那么在不同癌种中应无法重复。本文框架预测，代偿在多种癌种中均按耦合强度逐层扩散。可通过跨癌种实验验证。

Note S3. 局限与未来方向

本框架当前为理论假说，核心预测尚待实验验证。层划分基于功能层面，非物理层；具体层数量可能因癌种和细胞类型不同而变化。实验设计中的代偿蛋白上调时间曲线测量和波形参数优化是关键技术难点，需结合分子生物学和电磁仿真等方法实现。

未来方向包括：

1. 跨癌种验证：在前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌等不同癌种中验证框架普适性。
2. 跨电场参数验证：在不同场强、频率、波形下验证框架。
3. 在体验证：在小鼠肿瘤模型中验证多频同步扰动的效果。
4. 理论形式化：将耦合矩阵、压力时间窗口、过载条件形式化为数学模型。
5. 跨领域迁移：在复杂疾病、AI 对齐等领域设计可验证实验。

作者贡献

朱文豪：提出多层耦合网络过载框架，设计理论预测和实验方案，撰写论文。

利益冲突声明

作者声明无利益冲突。

数据可用性

本文为纯理论工作，未生成新数据集，未进行实验。文中提到的细胞株（PC-3、LNCaP、RWPE-1）均为公开来源，仅作为未来实验设计的参考，本文未使用这些细胞株进行任何实验。

代码可用性

本文为纯理论工作，未涉及实验代码。未来实验的代码将在实验完成后另行公开。

通讯作者：朱文豪，邮箱：303651977@qq.com

补充信息结束。