http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

# SIX1 在食管鳞状细胞癌中的机制和干预研究

茶剑媛[1]，杨文荣[2*]

（1.大理大学第一附属医院消化内科，云南大理 671000；2.大理大学第一附属医院胸心外科，云南大理 671000）

（茶剑媛，第一作者，课题主持，研究设计、实验、数据分析、论文撰写。杨文荣，通讯作者，文献收集，资料收集、数据分析；负责研究项目及论文发表联络）

摘要：目的 评价同源盒蛋白 1（sine oculis homeobox 1，SIX1）下调后食管鳞状细胞癌细胞表型的可逆性及蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT）救援的作用范围，以明确 SIX1 与相关细胞表型的功能联系。方法 分析 60 对癌及癌旁组织，以及 KYSE150、KYSE30 各 6 个独立培养批次的阴性对照、两组 SIX1 敲低、SIX1 回补、AKT 救援和 AKT 激活对照数据，评价组织表达、细胞增长、侵袭、凋亡及相关蛋白变化。结果 癌组织 *SIX1* 转录表达为癌旁的 2.63 倍，组织化学评分（histochemical score，H 评分）平均升高 111.83 分。敲低 1 组两细胞系 72 h 增长指数分别降至对照的 0.565 倍和 0.658 倍，侵袭减少，凋亡率增加 9.43 和 10.01 个百分点，同时磷酸化 AKT（phosphorylated AKT，pAKT）与总 AKT 比值及 B 细胞淋巴瘤 2 蛋白（B-cell lymphoma 2，BCL2）表达下降，BCL2 相互作用细胞死亡介导因子（BCL2-interacting mediator of cell death，BIM）表达升高。SIX1 回补和 AKT 救援均提高增长指数并降低凋亡率，但 AKT 救援后凋亡率仍高于对照，侵袭恢复的统计证据不足。结论 SIX1 下调伴随恶性表型减弱，AKT 相关信号参与部分功能恢复；救援程度因终点而异，生长与凋亡的恢复较侵袭更为一致。

关键词：食管鳞状细胞癌；SIX1；AKT；细胞凋亡；功能救援

中图分类号：R735.1

10.12201/bmr.202611.00032V1

# Mechanisms and Interventions of SIX1 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

CHA Jianyuan[1], YANG Wenrong[2*]

1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, Yunnan, China; 2. Department of Thoracic and Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Dali University, Dali 671000, Yunnan, China

**Abstract: Objective** To evaluate the reversibility of esophageal squamous cell carcinoma cell phenotypes following sine oculis homeobox 1 (SIX1)

大理市 2025 年科技计划项目，项目编号 2025KBG024
通讯作者：杨文荣，电子邮箱 820099200@qq.com

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

downregulation and the extent of functional restoration by protein kinase B (AKT) rescue. **Methods** Sixty paired tumor and adjacent tissue samples and six independent culture batches for each of the KYSE150 and KYSE30 cell lines were analyzed. Six groups comprised a negative control, two SIX1 knockdown groups, SIX1 re-expression, AKT rescue, and an AKT activation control. Tissue expression, cell growth, invasion, apoptosis, and associated protein changes were evaluated. Results: Tumor *SIX1* transcript expression was 2.63-fold that of adjacent tissue, with a mean histochemical score (H-score) increase of 111.83 points. Knockdown 1 reduced the 72-hour growth index to 0.565 and 0.658 of control values and increased apoptosis by 9.43 and 10.01 percentage points in KYSE150 and KYSE30, respectively. Invasion, the phosphorylated AKT (pAKT)/total AKT ratio, and B-cell lymphoma 2 (BCL2) expression decreased, whereas BCL2-interacting mediator of cell death (BIM) expression increased. SIX1 re-expression and AKT rescue increased the growth index and reduced apoptosis, but apoptosis after AKT rescue remained above control levels, and statistical evidence for invasion rescue was insufficient. **Conclusion** SIX1 downregulation is associated with attenuated malignant phenotypes, with AKT-associated signaling contributing to partial functional restoration. Rescue varies across endpoints, with more consistent recovery of cell growth and apoptosis than of invasion.

**Key words:** Esophageal squamous cell carcinoma; SIX1; AKT; Apoptosis; Functional rescue

10.12201/bmr.202611.00032V1

食管癌仍是我国主要癌症死因之一[1]，早期症状不典型使及时诊断和治疗面临困难[2]。免疫联合治疗已改善晚期食管鳞状细胞癌的生存[3]，但单细胞研究显示不同治疗反应伴随不同的免疫微环境特征[4]，提示研究肿瘤细胞的功能依赖时，需区分细胞内信号与肿瘤微环境的作用。同源盒蛋白 1（sine oculis homeobox 1，SIX1）是发育相关转录因子，魏巧等[5]已报道其在食管鳞状细胞癌中的高表达与不良预后的关联。He 等[6]在 Eca-109、TE-1 细胞及移植瘤中观察到 SIX1 的促生长作用，并通过药理阻断实验支持蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT）相关信号参与抗凋亡调节；西村（Nishimura）等[7]进一步揭示 SIX1 与转化生长因子 β（transforming growth factor-β，TGF-β）信号及肿瘤基底细胞维持的联系，并在独立患者队列中验证其高表达与不良预后的关联。近期研究进一步将 SIX1 与 BCL2 相关转录因子

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

1（BCL2-associated transcription factor 1，BCLAF1）与 YTH 结构域家族蛋白 2（YTH domain family protein 2，YTHDF2）相关的转录本调节[8]、吻素-10（kisspeptin-10）相关的无翅型/整合位点（Wingless/Int-1，Wnt）信号变化[9]及 T 盒转录因子 18（T-box transcription factor 18，TBX18）反馈环路[10]联系起来，使其作用呈现多层调控特点。上述研究支持 SIX1 的促肿瘤作用，但不同恶性表型对靶标恢复及 AKT 激活的响应是否一致仍需明确。本研究在 60 对组织中分析 SIX1 表达、病理关联及转录与蛋白表达在个体层面的相关性，在 KYSE150 和 KYSE30 中联合敲低、靶标回补及 AKT 救援，评价生长、侵袭和凋亡的恢复幅度；同时设置 AKT 激活对照，检验敲低背景下的救援是否超出一般促生长效应，以界定 AKT 相关功能参与的范围。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究设计与分析单位

本研究经我院伦理委员会审议通过（伦理审批号：2024010），所有纳入患者均签署知情同意书。组织部分纳入 2024 年 1 月至 2026 年 5 月的 60 对癌及癌旁标本，以同一患者的癌组织与癌旁组织构成一对。记录年龄、性别、部位、分化程度、最大径、病理浸润类别及淋巴结状态。细胞部分包括 KYSE150 和 KYSE30，各设阴性对照、SIX1 敲低 1、SIX1 敲低 2、SIX1 回补、AKT 救援及 AKT 激活对照 6 组，每种细胞系包含 6 个独立培养批次，共 72 个实验单位。同一细胞系、同一批次的各组进行配对比较，两种细胞系分别分析；参照独立生物学重复的分析原则[11]，技术复孔和观察视野先汇总至实验单位，不作为额外的生物学重复。

纳入标准：①经病理确诊的原发性食管鳞状细胞癌；②行根治性手术切除，癌组织及配对癌旁组织（距癌缘≥2 cm）标本完整；③术前未接受放疗、化疗、免疫治疗等抗肿瘤治疗。排除标准：①合并其他原发恶性肿瘤；②有食管癌新辅助放化疗或免疫治疗史；③标本核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）质量不合格或组织坏死明显，无法完成检测；④临床病理资料不完整。

### 1.2 表达与功能指标

实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qPCR）以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）为内参，每个样本各靶标的 3 个技术复孔先取循环阈值（cycle threshold，Ct）的均值，再计算靶标与内参的 Ct 差值（ΔCt）。组织以配对癌旁、细胞以同系同批阴性对照为参照，按 2 的负 ΔΔCt 次方计算 *SIX1* 相对表达。该计算假定靶标与内参扩增效率均接近 100%；扩增效率、内参稳定性及动态范围均影响定

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

量结果的解释[12]。组织化学评分（histochemical score，H 评分）为 1 级细胞百分比＋2×2 级百分比＋3×3 级百分比，范围 0～300 分。

qPCR 与免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）检测结果按患者编号对应。癌组织−ΔCt 用于表示个体转录水平，数值越大代表表达越高；−ΔΔCt 与癌组织减癌旁的 H 评分差值分别表示转录及蛋白测量的配对变化。

蛋白积分灰度扣除背景后，以 GAPDH 归一化 SIX1、总 AKT、B 细胞淋巴瘤 2 蛋白（B-cell lymphoma 2，BCL2）及 BCL2 相互作用细胞死亡介导因子（BCL2-interacting mediator of cell death，BIM）；磷酸化 AKT（phosphorylated AKT，pAKT；磷酸化位点为第 473 位丝氨酸）与总 AKT 净灰度之比表征相对磷酸化水平。定量蛋白分析需区分目标蛋白丰度与磷酸化变化，并考虑检测信号的线性范围[13]。细胞计数试剂盒-8（cell counting kit-8，CCK-8）在 0、24、48、72 h 使用平行孔检测，各时间点取 3 个技术复孔的空白校正吸光度均值，以各时间点与 0 h 之比定义增长指数。侵袭取 5 个视野的平均细胞数。凋亡率为早、晚期凋亡事件之和除以四象限总事件数，单纯膜损伤事件不计为凋亡事件。

### **1.3** 比较策略与统计学方法

采用 R 4.5.3 进行统计分析，使用 readxl、dplyr 和 tidyr 包处理数据，使用 stats 包进行统计检验。连续变量以均值±标准差描述；比例指标在 log2 尺度进行配对 *t* 检验，报告几何均值比及 95%置信区间（confidence interval，CI），H 评分和凋亡率报告配对均值差。分析纳入全部可用独立批次。

每种细胞系设置 7 项比较：敲低 1、敲低 2 分别对阴性对照；回补、AKT 救援分别对敲低 1；回补、AKT 救援、AKT 激活对照分别对阴性对照。两细胞系敲低 1 与阴性对照的 72 h 增长指数为主要比较，两项共同进行 Holm 校正；其余 12 项增长比较共同校正，其他 8 个细胞指标各按 14 项比较分别校正。组织表达两项比较另行校正。均为双侧检验，以校正 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义，95%CI 未作多重性调整。

增长救援交互采用“AKT 救援/敲低 1”除以“AKT 激活对照/阴性对照”的比值之比，在 log2 尺度检验，两细胞系共同校正。主要比较检查配对 log2 差值的分位数-分位数图（quantile-quantile plot，Q-Q 图）及 Shapiro–Wilk 正态性检验，另行进行精确 Wilcoxon 符号秩检验，并逐一剔除一个批次评估效应方向。时间曲线仅作描述，不作逐时间点显著性推断。

探索性病理关联分别比较分化程度、T 类别及淋巴结状态对应的癌组织−ΔCt 和 H 评分，三分类采用 Kruskal–Wallis 检验，二分类采用带连续性校正的 Wilcoxon 秩和检验，六项共同进行 Holm 校正。qPCR 与 IHC 的个体关系采用 Spearman 秩相关分析，分别检验癌组织−ΔCt 与 H 评分、−ΔΔCt 与 H 评分配对差值，两项共同校正；以患者为

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

单位重抽样 10000 次，计算百分位自助法（bootstrap）95%CI，区间不作多重性调整。

## 2 结果

### 2.1 组织特征、**SIX1** 表达及临床病理关联

60 例中男性 45 例、女性 15 例，年龄（60.10±8.40）岁，肿瘤最大径（3.32±1.06）cm；上、中、下段分别 13、33、14 例，高、中、低分化分别 10、35、15 例，T1、T2、T3 分别 9、27、24 例，淋巴结转移 31 例。各项检测数据均完整。癌组织 *SIX1* 转录表达为癌旁的 2.627 倍（95%CI：2.356～2.929）；H 评分分别为 187.78±17.60 和 75.95±15.93 分，配对差 111.83 分（95%CI：105.55～118.12），两项校正 *P* 均＜0.001（图 1A、B）。

临床病理关联分析中，T1、T2、T3 癌组织 − ΔCt 中位数分别为 − 6.163、− 5.910、− 5.610，整体比较原始 *P*=0.0293，六项 Holm 校正后 *P*=0.1760。分化程度及淋巴结状态对应的转录表达比较校正 *P* 分别为 1.0000、0.9523；H 评分与三项病理特征的比较校正 *P* 均为 1.0000，均未达到统计学意义。

60 例均具有对应的 qPCR 与 IHC 测量。癌组织−ΔCt 与 H 评分的 Spearman 相关系数 $\rho$=0.005（95%CI：−0.246～0.254），原始及校正 *P* 均为 0.9705；−ΔΔCt 与 H 评分配对差值的 $\rho$=0.313（95%CI：0.064～0.522），原始 *P*=0.0151、校正 *P*=0.0301。癌组织个体转录水平与 H 评分未见明确相关，而癌相对癌旁的变化幅度呈较弱正相关。

### 2.2 敲低后细胞功能变化

各组 CCK-8 增长指数随时间上升（图 1C、D），功能指标见表 1。敲低 1 组两细胞系 72 h 增长指数比为 0.565（95%CI：0.519～0.614，校正 *P*＜0.001）和 0.658（95%CI：0.516～0.839，校正 *P*=0.0069）。侵袭计数比分别为 0.543、0.538，校正 *P* 为 0.0086、0.0216；凋亡率增加 9.43 和 10.01 个百分点，校正 *P* 均＜0.001。敲低 2 组方向相同，但 KYSE30 增长指数及 KYSE150 侵袭计数校正 *P* 分别为 0.1666、0.1095。

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

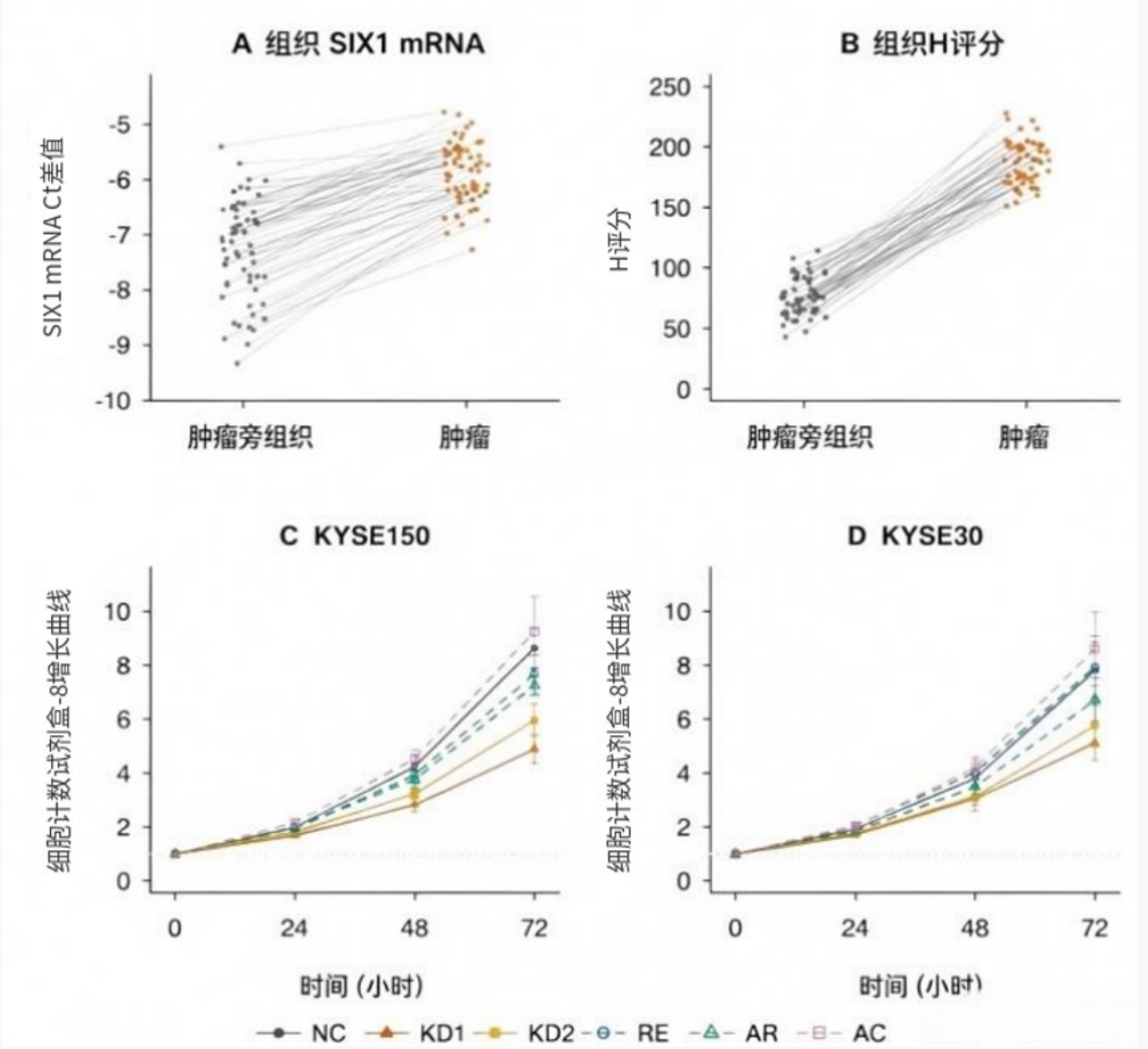



图 **1** 配对组织 **SIX1** 表达及两种细胞系的 **CCK-8** 增长曲线

注：A，qPCR 以−ΔCt 展示 log2 相对表达，值越大表示表达越高；B，组织 H 评分。A、B 每点为一个标本，同一病例以线相连（*n*=60 对）。C、D 为 KYSE150、KYSE30 各组增长指数，点与误差线为 6 个独立批次的均值±标准差，0 h 均归一为 1。图中 mRNA 为信使核糖核酸（messenger RNA）；各组分别为阴性对照（negative control，NC）、敲低 1（knockdown 1，KD1）、敲低 2（knockdown 2，KD2）、SIX1 回补（SIX1 re-expression，RE）、AKT 救援（AKT rescue，AR）和 AKT 激活对照（AKT activation control，AC）。数据来源：本研究。

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

表 **1** 各组细胞功能指标（均值±标准差，每组 ***n*=6**）

| 细胞系 | 组别 | **72 h** 增长指数 | 侵袭（个/视野） | 凋亡率（**%**） |
|---|---|---|---|---|
| KYSE150 | 阴性对照 | 8.64±0.77 | 97.67±9.48 | 8.50±0.87 |
| KYSE150 | SIX1 敲低 1 | 4.88±0.54 | 53.53±9.99 | 17.93±0.70 |
| KYSE150 | SIX1 敲低 2 | 5.97±0.59 | 85.23±12.31 | 14.58±1.78 |
| KYSE150 | SIX1 回补 | 7.67±0.71 | 92.20±10.20 | 9.08±1.00 |
| KYSE150 | AKT 救援 | 7.24±0.36 | 83.60±23.18 | 10.84±0.81 |
| KYSE150 | AKT 激活对照 | 9.24±1.32 | 97.90±14.57 | 6.86±1.15 |
| KYSE30 | 阴性对照 | 7.80±1.06 | 103.13±18.06 | 7.81±1.32 |
| KYSE30 | SIX1 敲低 1 | 5.13±0.67 | 55.70±11.44 | 17.82±0.61 |
| KYSE30 | SIX1 敲低 2 | 5.76±0.77 | 72.87±11.01 | 14.47±0.49 |
| KYSE30 | SIX1 回补 | 7.92±1.17 | 85.73±17.80 | 8.68±1.03 |
| KYSE30 | AKT 救援 | 6.72±0.80 | 73.30±14.99 | 11.20±1.06 |
| KYSE30 | AKT 激活对照 | 8.60±1.35 | 101.33±24.83 | 7.52±1.26 |

注：*n* 为独立培养批次数；增长指数为 72 h/0 h 净吸光度比，侵袭为 5 个视野均值，凋亡率按四象限事件计算。技术复孔和视野不扩大 *n*。组间推断采用批次内配对比较。数据来源：本研究。

### **2.3** 分子变化及功能恢复

敲低 1 组两细胞系 *SIX1* 转录及蛋白表达均下降，pAKT/AKT、BCL2 降低，BIM 升高，总 AKT 差异无统计学意义（表 2）。敲低 2 组 SIX1 转录量分别降至阴性对照的 0.434、0.449 倍，蛋白量降至 0.470、0.435 倍；KYSE30 的 BCL2、BIM 比较校正 *P* 分别为 0.0812、0.1256。

SIX1 回补使两细胞系增长指数分别达到敲低 1 组的 1.572、1.537 倍，凋亡率降低 8.85、9.14 个百分点。SIX1 回补对侵袭的恢复作用仅在 KYSE150 中达到校正后的显著性水平，KYSE30 校正 *P*=0.0831。回补组增长指数与阴性对照差异无统计学意义，但不能据此判定等效。

AKT 救援提高增长指数并降低凋亡率，两细胞系侵袭恢复的组间比较在校正后均未达到统计学意义。救援后 *SIX1* 转录表达未见显著回升，pAKT/AKT 为敲低 1 组的 1.545、1.569 倍，总 AKT 也增加；凋亡率仍比阴性对照高 2.34、3.38 个百分点，显示恢复不完全。

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

表 **2 SIX1** 敲低的分子效应及回补、救援结果（每项 ***n*=6** 对）

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

| 比较与指标 | **KYSE150** 效应（**95%CI**） | 校正 ***P*** | **KYSE30** 效应（**95%CI**） | 校正 ***P*** |
|---|---|---|---|---|
| 敲低 1：*SIX1* 转录 | 0.286（0.240～0.340） | ＜0.001 | 0.343（0.266～0.443） | ＜0.001 |
| 敲低 1：SIX1 蛋白 | 0.305（0.266～0.350） | ＜0.001 | 0.336（0.272～0.414） | ＜0.001 |
| 敲低 1：总 AKT | 0.949（0.912～0.988） | 0.1596 | 1.015（0.946～1.089） | 1.0000 |
| 敲低 1：pAKT/AKT | 0.580（0.528～0.637） | ＜0.001 | 0.545（0.492～0.604） | ＜0.001 |
| 敲低 1：BCL2 | 0.576（0.478～0.693） | 0.0079 | 0.660（0.528～0.823） | 0.0435 |
| 敲低 1：BIM | 1.849（1.549～2.206） | 0.0041 | 1.767（1.416～2.206） | 0.0132 |
| 回补：增长指数 | 1.572（1.403～1.761） | 0.0017 | 1.537（1.285～1.840） | 0.0148 |
| 回补：侵袭 | 1.737（1.525～1.979） | 0.0016 | 1.538（1.175～2.013） | 0.0831 |
| 回补：凋亡率 | -8.85（-10.39～-7.31） | ＜0.001 | -9.14（-10.42～-7.85） | ＜0.001 |
| AKT 救援：增长指数 | 1.489（1.361～1.628） | 0.0011 | 1.311（1.140～1.508） | 0.0334 |

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

| 比较与指标 | **KYSE150** 效应（**95%CI**） | 校正 ***P*** | **KYSE30** 效应（**95%CI**） | 校正 ***P*** |
|---|---|---|---|---|
| AKT 救援：侵袭 | 1.534（1.142～2.062） | 0.1095 | 1.312（0.959～1.795） | 0.4327 |
| AKT 救援：凋亡率 | -7.09（-8.19～-5.99） | ＜0.001 | -6.62（-7.64～-5.61） | ＜0.001 |
| AKT 救援交互 | 1.397（1.195～1.633） | 0.0055 | 1.193（0.906～1.571） | 0.1606 |

注：敲低 1 以阴性对照为参照；回补及 AKT 救援以敲低 1 为参照。凋亡率为均值差（百分点），其余为几何均值比，交互为比值之比。*P* 按方法部分各比较族 Holm 校正；95%CI 未校正，其是否跨无效值可能与校正 *P* 的判定不同。数据来源：本研究。

### **2.4** 救援交互与敏感性分析

KYSE150、KYSE30 的增长救援交互比分别为 1.397、1.193，校正 *P* 分别为 0.0055、0.1606，仅前者在校正后达到统计学意义（表 2）。主要比较中，敲低 1 组 72 h 增长指数分别为阴性对照的 0.565 倍、0.658 倍，配对 *t* 检验校正 *P* 分别为 0.0000228、0.0069。两种细胞系各 6 个批次的配对 log2 差值均为负，Shapiro–Wilk 检验 *P* 为 0.3004、0.9153。逐一剔除一个批次后，增长指数比分别为 0.554～0.575 和 0.619～0.705，方向未变。精确 Wilcoxon 检验原始 *P* 均为 0.03125，校正后均为 0.0625。参数检验与非参数检验均显示下降趋势，但显著性判断依赖推断方法，需结合效应量及其区间解释。

## **3** 讨论

### **3.1** 组织表达与功能响应的联系

本研究观察到配对癌组织 SIX1 表达升高，敲低后两种细胞系增长和侵袭下降、凋亡增加，回补后生长及凋亡反向变化。该结果与魏巧等[5]的组织表达研究及 He 等[6]的 AKT 相关功能研究一致。Nishimura 等[7]还发现 SIX1 与 TGF-β 信号、肿瘤基底细胞维持及不良预后相关。本研究通过并行设置靶标回补、AKT 救援及激活对照，发现生长与凋亡的恢复证据较侵袭更一致，提示不同恶性表型对上述干预的响应存在差异。

癌组织转录水平与 H 评分的相关系数为 0.005，而配对变化为 0.313，提示两种指标在癌组织中均升高，并不意味着其在不同患者中的表达水平一致对应。qPCR 反映组织总体转录水平，H 评分综合染色强度与阳性细胞比例，蛋白周转、细胞构成及评分变

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

异均可影响二者关系。配对变化扣除了各自癌旁背景，其较弱正相关提示两种测量对肿瘤相关变化存在部分共同响应。分化程度、T 类别和淋巴结状态的关联经校正均未达显著，本研究的组织结果主要支持癌与癌旁的表达差异，尚未发现与上述病理特征的明确关联。

### 3.2 靶标回补与 AKT 救援的作用差异

SIX1 回补后增长改善、凋亡减少，支持敲低相关表型具有可逆性，并加强其与 SIX1 表达变化的联系。AKT 救援则在 *SIX1* 转录表达未显著回升时改善上述表型，支持 AKT 相关信号参与功能补偿。敲低 1 伴随 pAKT/AKT、BCL2 降低及 BIM 升高，与 He 等[6]报道的 AKT 相关抗凋亡调节方向一致，也与本研究凋亡率增加的结果相符。两类恢复实验分别从靶标依赖和通路补偿角度支持 SIX1 与细胞生存的功能联系。

增长与凋亡同步改善具有生物学联系：凋亡减少可增加存活细胞数，从而带动增长指数回升。AKT 救援后凋亡率仍高于阴性对照，显示生存相关改变获得部分补偿。AKT 救援对侵袭的恢复作用在校正后未达到统计学意义，SIX1 回补的侵袭恢复作用也仅在 KYSE150 中达到统计学意义，侵袭恢复的证据弱于生长和凋亡。设置激活对照后，KYSE150 仍显示额外的增长救援贡献，支持敲低背景下存在超出一般促生长作用的功能补偿；KYSE30 的交互效应在校正后未达到统计学意义。

### 3.3 敲低幅度与表型恢复的影响因素

两组敲低的差异应结合实际抑制幅度理解。敲低 2 的 *SIX1* 转录残余量为对照的 0.434 和 0.449 倍，高于敲低 1 的 0.286 和 0.343 倍，蛋白残余量也较高。敲低 2 较弱的部分表型效应可能与其较高的 SIX1 残余表达有关，批次变异及不同敲低序列的影响亦需考虑。

本研究中侵袭与生长的恢复程度不同，可能与侵袭还涉及细胞运动及表型变化有关。SIX1 过表达可逆转 kisspeptin-10 相关的 Wnt 信号抑制[9]，TBX18/SIX1 反馈环路则参与干性及上皮—间质转化维持[10]。结合这些研究推测，SIX1 回补可能同时影响多个功能环节，而 AKT 救援更侧重补偿生存相关变化，因而侵袭与生长未必同步恢复。本研究未检测这些通路，尚需结合 Wnt 活性及上皮—间质转化标志物验证这一解释。

增长指数还包含代谢状态的信息。Lin 等[14]在肝癌相关模型中发现 SIX1 磷酸化参与糖代谢调节，水溶性四唑盐-8（water-soluble tetrazolium salt-8，WST-8）的检测读数也受代谢及培养条件影响[15]。本研究 CCK-8 增长指数回升与凋亡减少相伴，但吸光度变化可同时来自存活细胞增加及单细胞代谢活性变化。结合直接计数或脱氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）合成检测，有助于区分细胞数量与代谢变化的贡献；侵袭检测也应考虑存活细胞数，以判断总体细胞状态改善后是否仍存在独立的侵袭功能差异。

10.12201/bmr.202611.00032V1

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

### 3.4 研究局限与后续验证

每种细胞系仅 6 个独立批次、组织亚组规模不均，限制了救援幅度及病理关联的估计精度。主要增长效应的方向一致，但显著性依赖推断方法，应结合效应量和区间判断。转录与 H 评分的相关性不等同于测量一致性，pAKT/AKT 变化也需结合总 AKT 丰度解释。回补与救援实验支持 SIX1 及 AKT 相关信号参与表型变化，二者的直接调控关系仍需进一步验证。后续可通过反向通路阻断进一步检验功能依赖，并针对候选调控节点开展直接作用验证，结合动物研究与临床随访评价干预价值。

本研究支持 SIX1 下调后的生长与凋亡变化具有可逆性，AKT 相关信号参与部分功能恢复。生长与凋亡的恢复较侵袭更为一致，说明评价 SIX1 及 AKT 相关功能时，应区分不同表型终点。

## 4 结论

配对癌组织中 SIX1 表达较高，其下调伴随细胞增长和侵袭减弱、凋亡增加及 AKT 相关蛋白变化。SIX1 回补和 AKT 救援可恢复部分表型，生长与凋亡的恢复证据较侵袭更一致。上述结果支持 AKT 相关信号参与 SIX1 下调后的部分功能恢复，其作用因表型终点而异。

10.12201/bmr.202611.00032V1

## 参考文献

[1] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(3): 221-231.

[2] 中华医学会肿瘤学分会早诊早治学组. 中国食管癌早诊早治专家共识[J]. 中华肿瘤杂志, 2022, 44(10): 1066-1075.

[3] Doki Y, Ajani JA, Kato K, et al. Nivolumab combination therapy in advanced esophageal squamous-cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2022, 386(5): 449-462.

[4] Yang Z, Tian H, Chen X, et al. Single-cell sequencing reveals immune features of treatment response to neoadjuvant immunochemotherapy in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 9097.

[5] 魏巧, 郁玮玮, 赵快乐, 等. Six1 和 Six4 在食管鳞状细胞癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(7): 446-450.

[6] He Z, Li G, Tang L, et al. SIX1 overexpression predicts poor prognosis and induces radioresistance through AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2017,1(10): 1071-1079.

[7] Nishimura T, Tamaoki M, Komatsuzaki R, et al. SIX1 maintains tumor basal cells via transforming growth factor-β pathway and associates with poor prognosis in esophageal cancer[J]. Cancer Sci, 2017, 108(2): 216-225.

http://www.biomedrxiv.org.cn/article/doi/10.12201/bmr.202611.00032
此预印本（未经同行评审）的作者拥有该文稿的版权，biomedRxiv拥有永久保存权。任何人未经允许不得重复使用。

[8] Zhang P, Zhang W, Wang X, et al. BCLAF1 drives esophageal squamous cell carcinoma progression through regulation of YTHDF2-dependent SIX1 mRNA degradation[J]. Cancer Lett, 2024, 2(591): 216874.

[9] Guo C, Wu G, Liu T. Kisspeptin 10 inhibited the proliferation, migration, and stemness of esophageal cancer cells via regulating the SIX1/Wnt/β-catetin signaling[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2025, 39(4): 70244.

[10] Gu L, Yang T, Zhang J, et al. The TBX18/SIX1 transcriptional circuit maintains stemness and EMT states to promote radioresistance in ESCC[J]. Cancers (Basel), 2026, 18(16): 2700.

[11] Lord SJ, Velle KB, Mullins RD, et al. SuperPlots: communicating reproducibility and variability in cell biology[J]. J Cell Biol, 2020, 219(6): 202001064..

[12] 冯理想, 赵容乾, 张奎, 等. 从 $2^{-\Delta\Delta C}$T 法到 $2^{-C}$T 法：一种更严谨的 RT-qPCR 数据分析策略[J]. 四川大学学报(医学版), 2025, 56(5): 1405-1411.

[13] Taylor SC, Rosselli-Murai LK, Crobeddu B, et al. A critical path to producing high quality, reproducible data from quantitative western blot experiments[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 17599..

[14] Lin Y, Li L, Yuan B, et al. Phosphorylation determines the glucose metabolism reprogramming and tumor-promoting activity of sine oculis homeobox 1[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 337.

[15] Martin F, Neubert A, Lutter AH, et al. MTS, WST-8, and ATP viability assays in 2D and 3D cultures: comparison of methodologically different assays in primary human chondrocytes[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2024, 88(1): 3-19..

10.12201/bmr.202611.00032V1