

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Ricevuto: 2 giugno 2017

Accettato: 22 settembre 2017

Published online: 12 October 2017

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Xiaolei Zhao¹, Meina Yang², Yong Wang³, Jingxiang Pang², Eduard Van Wijk^{4,5}, Yanli Liu⁶, Hua Fan², Liewei Zhang⁷ & Jinxiang Han^{1,2}

In questo studio, abbiamo studiato le caratteristiche spettrali dell'emissione fotonica spontanea (SPE) dalla superficie corporea di un modello di topi nudi portatori di cancro al seno umano durante il processo di crescita globale dei tumori al seno. Confrontando e analizzando i dati, abbiamo scoperto che c'era una notevole differenza tra topi tumorali e controlli sani nella distribuzione spettrale della SPE dalla superficie corporea del sito della lesione, anche quando i cambiamenti morfologici nel sito della lesione non erano evidenti. La distribuzione spettrale della SPE dal sito sano dei topi tumorali differiva anche da quella dei controlli sani poiché il cancro al seno si sviluppava fino a un certo stadio. Inoltre, la differenza di spettro era correlata a diversi stati di crescita dei tumori. È interessante notare che c'era una correlazione positiva tra il rapporto spettrale (610–630 / 395–455 nm) e il logaritmo del volume del tumore sia per il sito della lesione ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e il sito normale ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali. I risultati hanno suggerito che lo spettro della SPE era sensibile ai cambiamenti nello stato del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Il cancro al seno è il tumore più frequentemente diagnosticato e la principale causa di morte per cancro tra le donne in tutto il mondo. Da solo rappresenta il 25% di tutti i casi di cancro e il 15% di tutti i decessi per cancro tra le donne [1](#). Nonostante la crescente conoscenza della malattia, la sua incidenza è in costante aumento in molti paesi del Sud America, Africa e Asia. Il cancro al seno è una delle forme più curabili di cancro se viene rilevato e diagnosticato in una fase precoce. La diagnosi precoce è anche il modo migliore per ridurre gli effetti della malattia e migliorare la sopravvivenza [2](#). Come metodo di screening più comunemente usato, la mammografia può spesso rilevare il carcinoma mammario in una fase precoce, ma è imperfetta. Non tutti i tumori al seno saranno rilevati da una mammografia, specialmente quando le caratteristiche morfologiche delle lesioni anomale non sono evidenti. La mammografia provoca occasionalmente risultati falsi positivi o diagnosi eccessiva e trattamento eccessivo di alcuni tumori al seno [1](#). Inoltre, sebbene gli attuali metodi di imaging possano fornire un'alta risoluzione spaziale, ci sono relativamente poche informazioni sul metabolismo e sui cambiamenti a livello molecolare nel tessuto mammario [3-5](#).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Come è ben noto il metabolismo delle cellule tumorali al seno è diverso da quello delle cellule sane⁶. I ricercatori hanno mostrato un crescente interesse per le specie reattive dell'ossigeno (ROS) come i radicali idrossilici ($\text{OH} \cdot$), gli anidridi superossido ($\text{O}_2 \cdot^-$) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) che sono sottoprodotti del metabolismo cellulare e nei loro ruoli in un microambiente tumorale^{7, 8}. In circostanze normali, i livelli di ROS e la capacità di difese ossidative sono ben bilanciati. Tuttavia, molti fattori possono interrompere questo equilibrio e generare ROS eccessivi per causare danni ossidativi alle biomolecole che possono portare a alterazioni cellulari e, in definitiva, alla tumorigenesi e alla trasformazione neoplastica⁸⁻¹¹. Pertanto, si verificano cambiamenti biochimici prima dei cambiamenti morfologici nelle regioni della lesione. In realtà, i ROS sono ora considerati come un segno distintivo del cancro^{8,11,12}. Numerosi studi hanno riportato che i tumori al seno mostrano un aumento della produzione di ROS e un alto livello di stress ossidativo nel tessuto del carcinoma mammario o un aumento significativo dei livelli di marcatori di stress ossidativo nel plasma da pazienti con carcinoma mammario¹²⁻¹⁶. In questo senso, è di grande importanza sviluppare un nuovo approccio sensibile e non invasivo per rilevare i cambiamenti del metabolismo in vivo per migliorare il tasso di indagine e l'accuratezza dello screening preliminare dei tumori al seno, specialmente nelle sue fasi iniziali.

¹Dipartimento di biochimica e biologia molecolare, Università di Shandong, Jinan, 250012, Cina. ²Shandong

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Centro di biotecnologia medicinale, Accademia delle scienze mediche di Shandong, Jinan, 250062, Cina. ³Department of Neurosurgery, Shandong Cancer Hospital, Jinan, 250117, China. ⁴Centro cino-olandese di medicina preventiva e personalizzata / Centro di fotonica dei sistemi viventi, Università di Leida, Leida, Paesi Bassi. ⁵Meluna Research, Geldermalsen, Paesi Bassi. ⁶Dipartimento di medicina di base, Università di medicina tradizionale cinese di Shandong, Jinan, 250355, Cina. ⁷Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355, Cina. La corrispondenza e le richieste di materiali devono essere indirizzate a JH (e-mail:samsjxhyx@163.com)

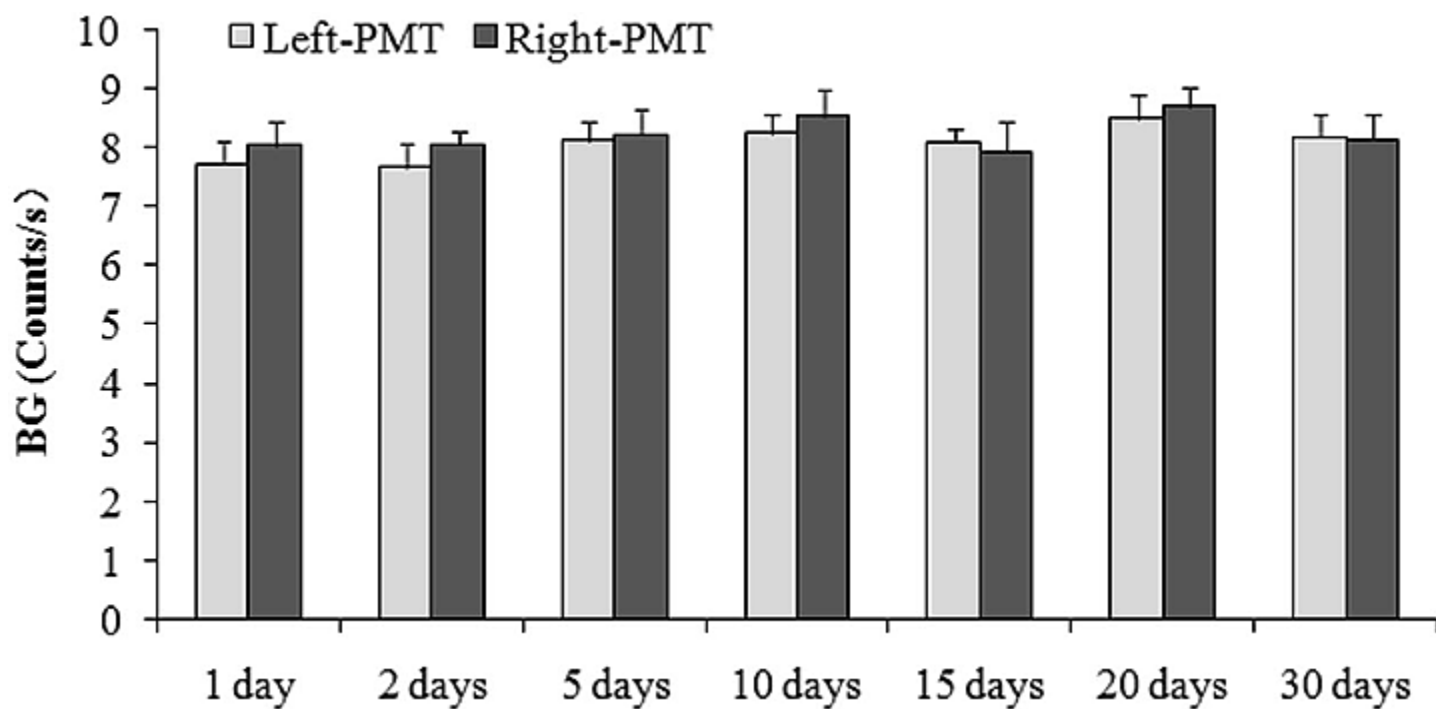


Figura 1. Segnali BG del PMT destro e sinistro senza filtri contemporaneamente (2:00 pm) in giorni diversi.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

L'emissione spontanea di fotoni ultra-deboli (SPE), come attributo intrinseco dei sistemi biologici, è un possibile candidato per l'uso nello sviluppo di un metodo di biopsia ottica per monitorare i livelli di ROS durante i processi metabolici in cellule normali e anormali, tessuti e organismi¹⁷⁻²⁰. La SPE ha origine dal rilassamento di specie eccitate elettronicamente (ad es. $^3R = O^*$, 1O_2 e $^1P^*$) nei sistemi biologici. Le specie eccitate elettronicamente provengono dall'ossidazione di lipidi, proteine e acidi nucleici da parte dei ROS che si formano in processi metabolici ossidativi normali o anormali²¹⁻²⁴. Ogni specie eccitata elettronicamente può emettere la sua energia come un fotone a una lunghezza d'onda specifica. I cambiamenti biofisici che accompagnano la progressione displastica spesso portano ad alterazioni delle caratteristiche ottiche dei tessuti. La tecnologia di rilevazione SPE sensibile a queste alterazioni può essere utilizzata per monitorare gli stati fisiologici e patologici dei sistemi biologici. Come marcatore biofisico non invasivo per il monitoraggio dello stato del sistema biologico, la SPE ha attirato una notevole attenzione ed è stata utilizzata in molti settori, compresa l'agricoltura²⁵, qualità del cibo²⁶ e assistenza sanitaria ^{20,27-29}.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Sono stati condotti studi preliminari per definire il potenziale della SPE di fungere da marcatore biofisico sensibile per rilevare diversi stati fisiologici e patologici dei tumori in base ai loro diversi stati metabolici ossidativi. Ad esempio, Bustamante et al. hanno trovato una differenza nell'intensità di emissione tra la fase di crescita logaritmica e la fase stazionaria usando cellule di melanoma maligno umano, e l'hanno attribuita alla differenza nell'attività della catalasi nelle cellule, che ha portato a cambiamenti metabolici³⁰. Takeda et al. ha riportato i cambiamenti temporali nelle intensità della SPE, insieme alla proliferazione delle cellule tumorali e alla distribuzione spettrale della SPE dalla linea di cellule tumorali TE9, e ha scoperto che questi cambiamenti nella SPE erano strettamente correlati ai ROS prodotti durante i processi metabolici³¹. L'esperimento di Rác et al. ha illustrato che le cellule di mieloma multiplo umano U266 esposte al perossido di idrogeno porterebbero alla formazione di $^3(\text{R} = \text{O})^*$ e $^1\text{O}_2$ che porterebbe a un potenziamento immediato dell'emissione fotonica ultra-debole seguita da un lento decadimento³². Kim et al. misurato SPE da tessuto polmonare canceroso umano e tessuto polmonare normale adiacente e i risultati hanno suggerito che l'emissione SPE potrebbe essere utilizzata per differenziare un tumore da tessuto normale adiacente; hanno anche mostrato una differenza saliente tra carcinoma a cellule quadrate e adenocarcinoma¹⁸. Chen et al. utilizzato con successo campioni di siero per distinguere i pazienti con leucemia linfoblastica acuta da volontari sani³³. Inoltre, Kim et al hanno condotto un confronto tra le intensità della SPE da topi portatori di tumore trapiantati con cellule tumorali ovariche e topi di controllo.³⁴. Pertanto, si prevede che la SPE potrebbe essere un promettente marcatore biofisico per il monitoraggio dello stato patofisiologico dei tumori al seno.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Nel nostro studio precedente³⁵, abbiamo dimostrato che l'intensità della SPE dalla superficie corporea potrebbe distinguere in modo significativo i topi nudi portatori di cancro al seno da controlli sani, indipendentemente dal fatto che i cambiamenti morfologici dei tumori fossero evidenti. Abbiamo anche scoperto che gli SPE sono cambiati con la dimensione del tumore. Nel presente studio, la nostra domanda di ricerca si è concentrata sulle caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea di un modello di topi nudi portatori di cancro al seno umano e controlli sani durante l'intero processo di crescita dei tumori al seno. Speriamo di esplorare più profondamente la relazione tra le componenti spettrali della SPE e gli stadi tumorali. In questo modo, potremmo fornire una prova più precisa dell'uso della SPE come indicatore biofisico non invasivo nella ricerca sul cancro al seno.

risultati

Prestazioni dei due PMT nel sistema di rilevamento. Figura. 1 visualizzati i segnali BG del PMT sinistro e destro senza filtri contemporaneamente (14:00) in giorni diversi. La figura mostra che le prestazioni del sistema di rilevamento erano stabili e non c'erano differenze significative tra il PMT sinistro e destro.

Caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi in ciascun gruppo durante il processo di crescita del carcinoma mammario. Quaranta topi nudi sono stati usati in questo studio: venticinque nel gruppo di esperimenti, dieci nel gruppo di controllo e cinque nel gruppo normale. Dei venticinque topi nel gruppo di esperimenti, ventuno topi hanno sviluppato tumori (etichettati come gruppo di topi tumorali), ma gli altri quattro topi no (etichettati come gruppo di topi privi di tumore). figura2 mostra un esempio delle diverse fasi di crescita di un topo il cui ascellare destro è stato iniettato con cellule tumorali al seno.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per analizzare le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi in ciascun gruppo rispetto ai diversi stadi di crescita del tumore, le misurazioni sono iniziate quando le cellule del cancro al seno erano nel periodo di incubazione e

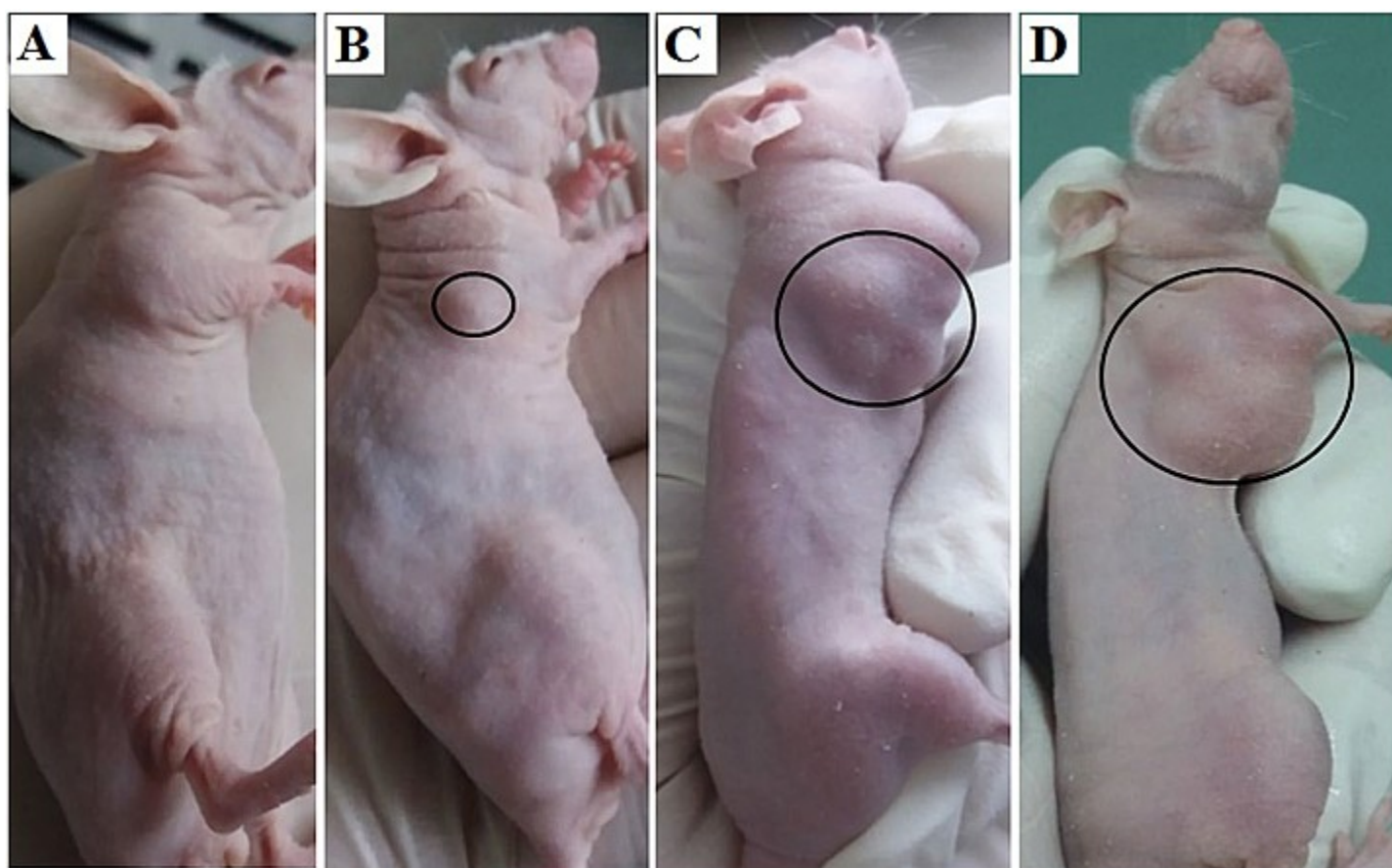


Figura 2. Diverse fasi di crescita di un topo il cui ascellare destro è stato iniettato con cellule tumorali al seno. (A) Periodo di incubazione del carcinoma mammario; (B) diametro del tumore inferiore a 0,5 cm; (C) Diametro del tumore tra 1 e 1,5 cm; (D) Diametro del tumore superiore a 1,5 cm.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

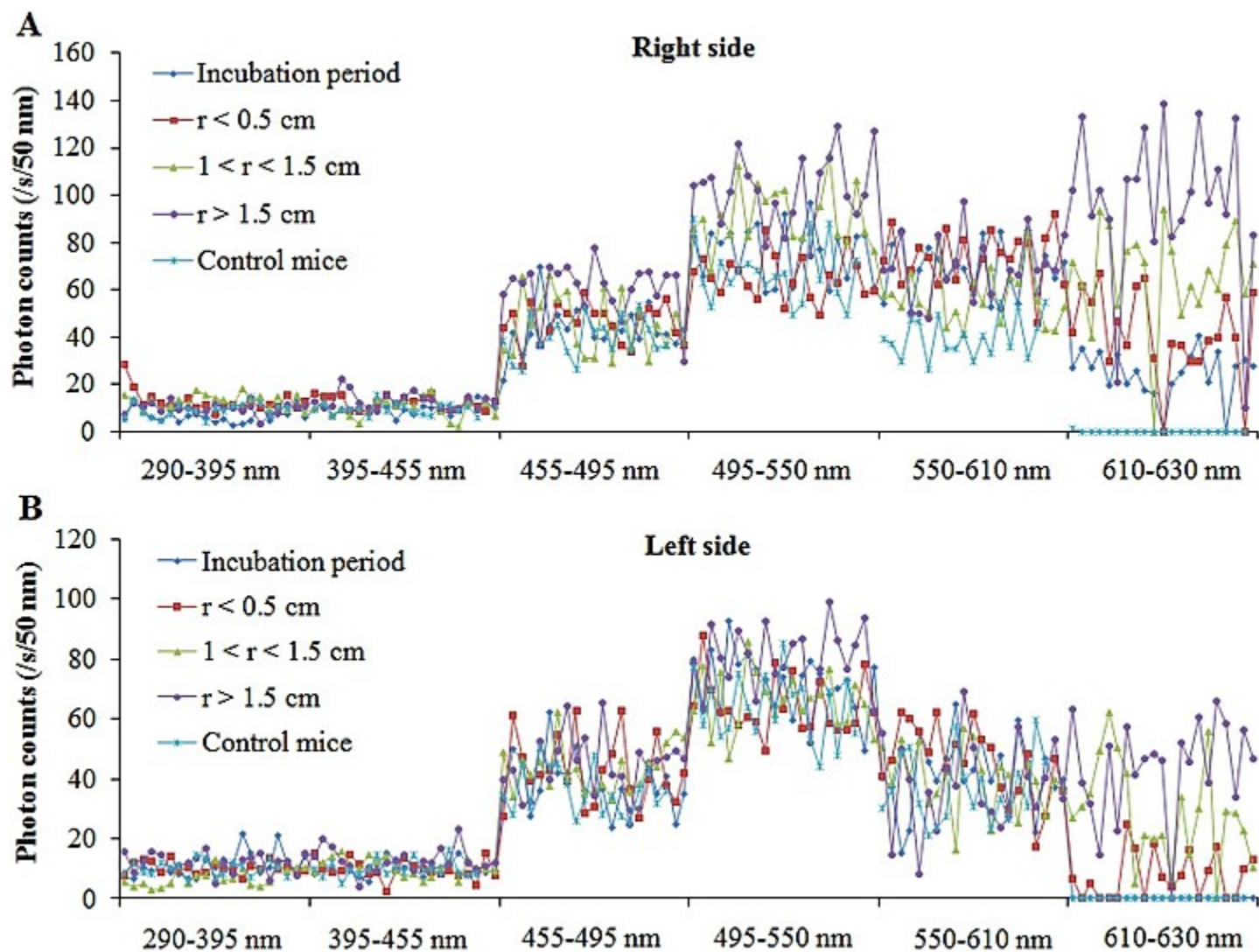


Figura 3 Le distribuzioni spettrali di SPE da entrambi i lati di 21 topi tumorali in diversi stadi di crescita di tumori al seno e diciannove controlli sani. (A) Distribuzioni spettrali nei siti giusti di topi tumorali in diversi stadi di crescita di tumori e controlli sani. (B) Distribuzioni spettrali nei siti di sinistra dei topi tumorali in diversi stadi di crescita dei tumori e controlli sani. r , diametro del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

continuava due volte a settimana fino a quando i tumori erano evidenti. Il protocollo di misurazione dettagliato è descritto nella sezione del metodo di misurazione. I dati dei fotoni (con diversi filtri di cut-off) per entrambi i lati di ciascun topo di ciascun gruppo in diversi stadi di crescita del tumore (come mostrato in Fig.3) sono stati registrati e mediati in media \pm deviazione standard (SD) corretta per i propri segnali BG.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

lunghezza d'onda gamma	incubazione periodo	r < 0,5 cm	1 < r < 1,5 cm	r > 1,5 cm	Controlla i topi
Lato destro dei topi					
290–395 nm	6,84 ± 2,91	7,40 4,41	± 7,91 2,94	± 5,22 ± 2,27	6,33 ± 2,89
395–455 nm	9,76 ± 2,19	7,35 2,67	± 8,70 3,98	± 9,70 ± 3,43	8,54 ± 2,49
455–495 nm	42,07 ± 9,27	43,04 8,22	± 42,32 12,76	± 57,45 11,27 *	± 38,46 8,36
495-550 nm	74,04 ± 11,84	64,47 9,19	± 91,02 12,54 *	± 101,41 14,81 *	± 66,72 11,97
550–610 nm	68,98 ± 11,26 *	71,09 11,23 *	± 57,11 11,95 *	± 68,69 13,76 *	± 38,24 8,85

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

610–630 nm	26,51 10,33 *	± 41,20 18,41 *	± 79,73 21,11 *	± 105,86 32,66 *	± 0.00	
Lato sinistro dei topi						
290–395 nm	7,10 ± 4,17	8,19 ± 1,96	7,02 ± 3,06	6,01 ± 3,24	7,06 ± 2,48	
395–455 nm	9,20 ± 2,39	8,33 ± 3,17	8,45 ± 2,94	8,71 ± 4,02	9,05 ± 2,78	
455–495 nm	38,06 ± 9,35	44,88 11,23	± 43,41 ± 7,85	44,80 ± 9,84	36,01 7,85	±
495–550 nm	72,21 ± 9,68	67,94 ± 9,54	69,85 ± 9,53	79,61 ± 11,57 *	63,95 10,98	±
550–610 nm	41,45 12,10	± 43,09 12,02	± 39,76 10,83	± 37,78 ± 14,83	34,79 11,51	±
610–630 nm	0.00	7,49 ± 7,74 *	28,33 16,75 *	± 43,80 ± 16,40 *	0.00	

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

tavolo 1. L'intensità media del segnale della SPE a diverse lunghezze d'onda varia da ventuno topi tumorali in diversi stadi di crescita del cancro e diciannove controlli sani. r , diametro del tumore. * Statisticamente significativo rispetto ai topi di controllo.

Il successivo metodo di calcolo è stato uguale a quello riportato da Van Wijk³⁶. La differenza di intensità SPE tra due filtri con interruzioni successive della lunghezza d'onda è stata utilizzata per calcolare l'emissione di fotoni di un determinato intervallo di lunghezze d'onda. L'emissione di fotoni del particolare intervallo di lunghezze d'onda è stata corretta matematicamente per la trasparenza dei filtri e l'efficienza quantum del PMT. Le efficienze quantistiche dettagliate del corrispondente intervallo di lunghezze d'onda dei PMT utilizzati sono descritte nella sezione "Metodi". Se la differenza non era significativa ($p > 0,05$), l'emissione di fotoni del topo con quella gamma di lunghezze d'onda era considerata zero. La stima finale della distribuzione spettrale di ciascun lato di un topo è stata espressa in cps per 50 nm. A causa delle caratteristiche simili ($p > 0,05$) dell'emissione spontanea di fotoni tra topi senza tumore, topi normali,³⁵ li abbiamo uniti in un unico gruppo: vale a dire il gruppo di controllo. Le distribuzioni spettrali di SPE dalla superficie corporea di ventuno topi tumorali e diciannove topi di controllo durante il processo di crescita dei tumori al seno sono illustrate in Fig.3.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

I dati in Fig. 3 illustra che esiste un'elevata varianza individuale della distribuzione spettrale tra topi diversi. Tuttavia, la tendenza dei cambiamenti di spettro nei diversi topi negli stessi gruppi era simile. Al fine di esibire chiaramente le caratteristiche spettrali della SPE durante il processo di crescita del tumore, abbiamo mediato i dati spettrali dei topi nudi nello stesso stadio di crescita dei tumori dello stesso gruppo. I risultati sono stati visualizzati nella tabella 1 e figg 4-7. Come rappresentato in Fig.4, la distribuzione spettrale di SPE dai lati destro e sinistro dei topi di controllo era simile: il picco massimo era di 495-550 nm e i segnali di fotoni da entrambi i lati non erano più rilevabili con filtri di cut-off a 610 nm e superiori. La distribuzione spettrale della SPE dal lato sinistro (nessun lato del tumore) dei topi tumorali era coerente con quella dei topi di controllo, mentre le caratteristiche spettrali della SPE dal lato destro (lato della trapianto del tumore) dei topi tumorali erano diverse. Per il lato destro dei topi tumorali, la gamma di lunghezze d'onda del picco massimo era la stessa dei controlli; tuttavia, il segnale a 550–610 nm era 1,9 volte superiore a quello dei controlli. Inoltre, la distribuzione spettrale del lato destro dei topi tumorali ha mostrato un'emissione relativamente elevata a 610–630 nm, contrariamente all'emissione zero del lato destro dei controlli.

(prima di qualsiasi cambiamento morfologico) nei topi tumorali.

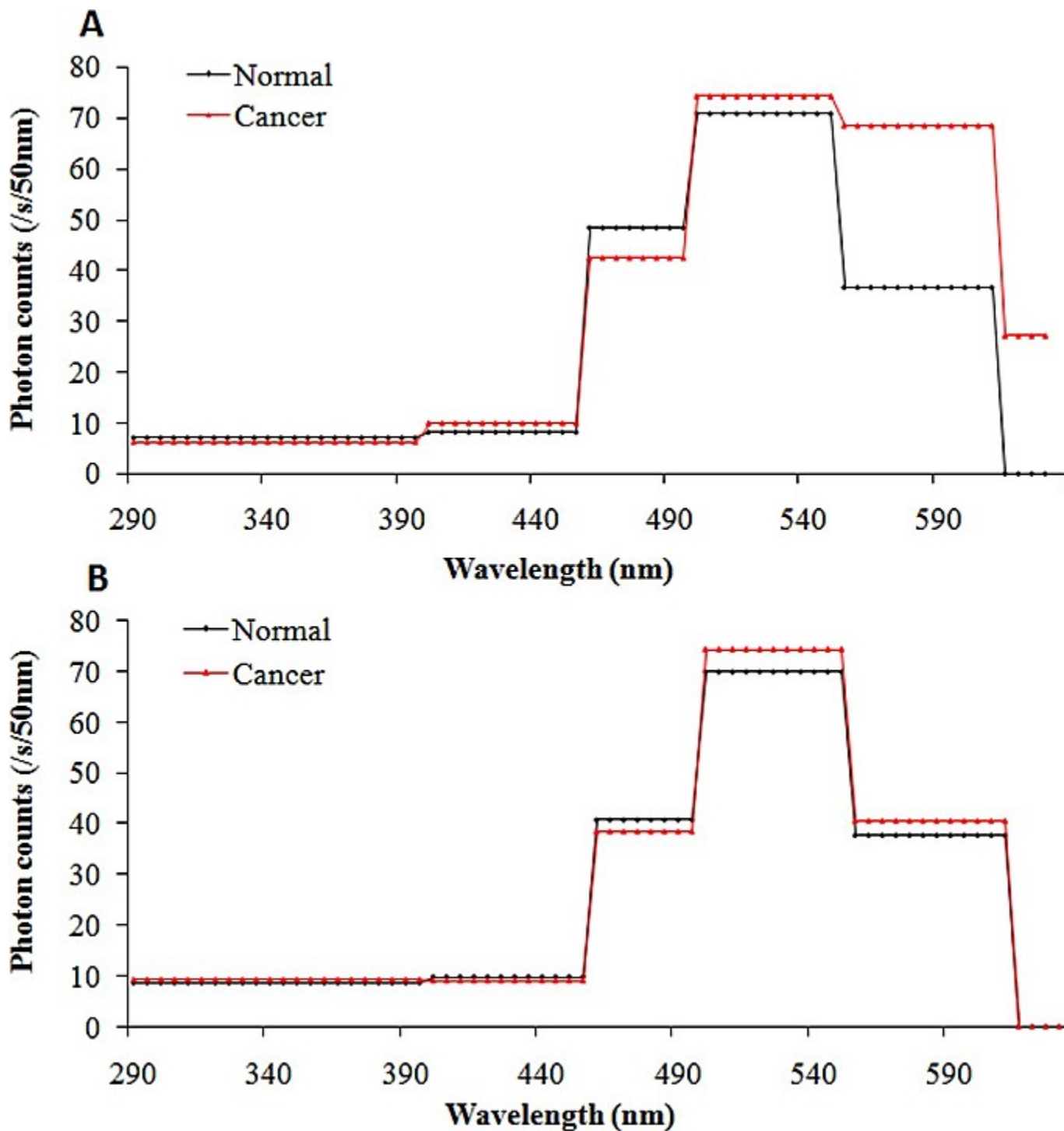
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

figura 5 illustra lo spettro della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlla quando i diametri del tumore erano inferiori a 0,5 cm. Non c'erano differenze significative tra i topi tumorali e i controlli nella caratteristica spettrale della SPE dal lato sinistro (lato normale) in questo stadio del tumore ($r < 0,5$ cm), ad eccezione di alcuni segnali di fotoni a 610–630 nm nei topi tumorali. Tuttavia, dal lato destro (sito di trapianto del tumore) dei topi tumorali, il picco massimo di distribuzione spettrale appariva a 550–610 nm, che era nettamente diverso dai controlli e dai topi tumorali quando il tumore non era evidente. Rispetto ai topi tumorali durante il periodo di incubazione per i tumori al seno, i segnali dei fotoni dai topi tumorali in questo stadio del tumore sono aumentati significativamente (circa 1,7 volte) a 610-630 nm. In altri componenti spettrali di SPE, distinti dai dati sui topi tumorali menzionati sopra, due picchi apparivano nello spettro della SPE dai lati giusti dei topi tumorali quando il diametro del tumore era maggiore di 1 cm e inferiore a 1,5 cm, come mostrato in Fig. 6A: un picco appariva a 455-495 nm, che era uguale a quello dal lato destro dei controlli e un altro picco appariva a 610-630 nm. In particolare, a 610–630 nm nello spettro della SPE (mostrato in Fig.6B), i livelli di emissione dal lato sinistro dei topi tumorali in questo stadio del tumore erano 4 volte superiori rispetto all'emissione dal lato sinistro dei topi tumorali quando i diametri del tumore erano inferiori a 0,5 cm.

In fig. 7A, La SPE dalla parte destra dei topi tumorali in questo stadio del tumore ($r > 1,5$ cm) ha mostrato caratteristiche spettrali simili

si rompe con quello dallo stesso lato dei topi tumorali quando il diametro del tumore era compreso tra 1 cm e 1,5 cm. Tuttavia, rispetto allo spettro mostrato in Fig.6A, le intensità dei fotoni della SPE dai topi tumorali in questo stadio erano significativamente aumentate a 455-495 nm e 610-630 nm.

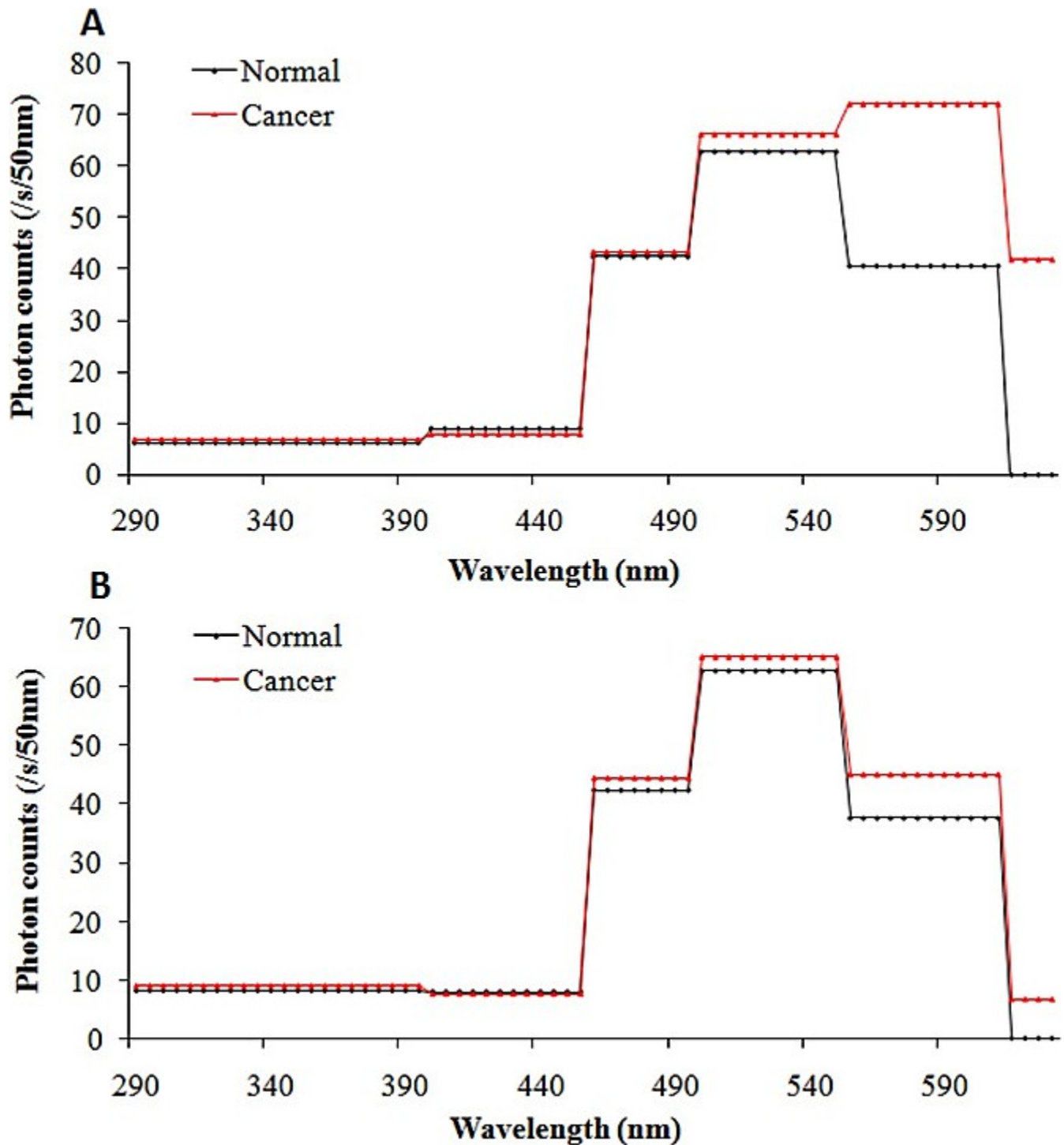
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 4 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli nel periodo di incubazione dei tumori al seno. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra dei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti sui controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro dei topi tumorali (linea rossa) e gli stessi siti per i controlli (linea nera).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

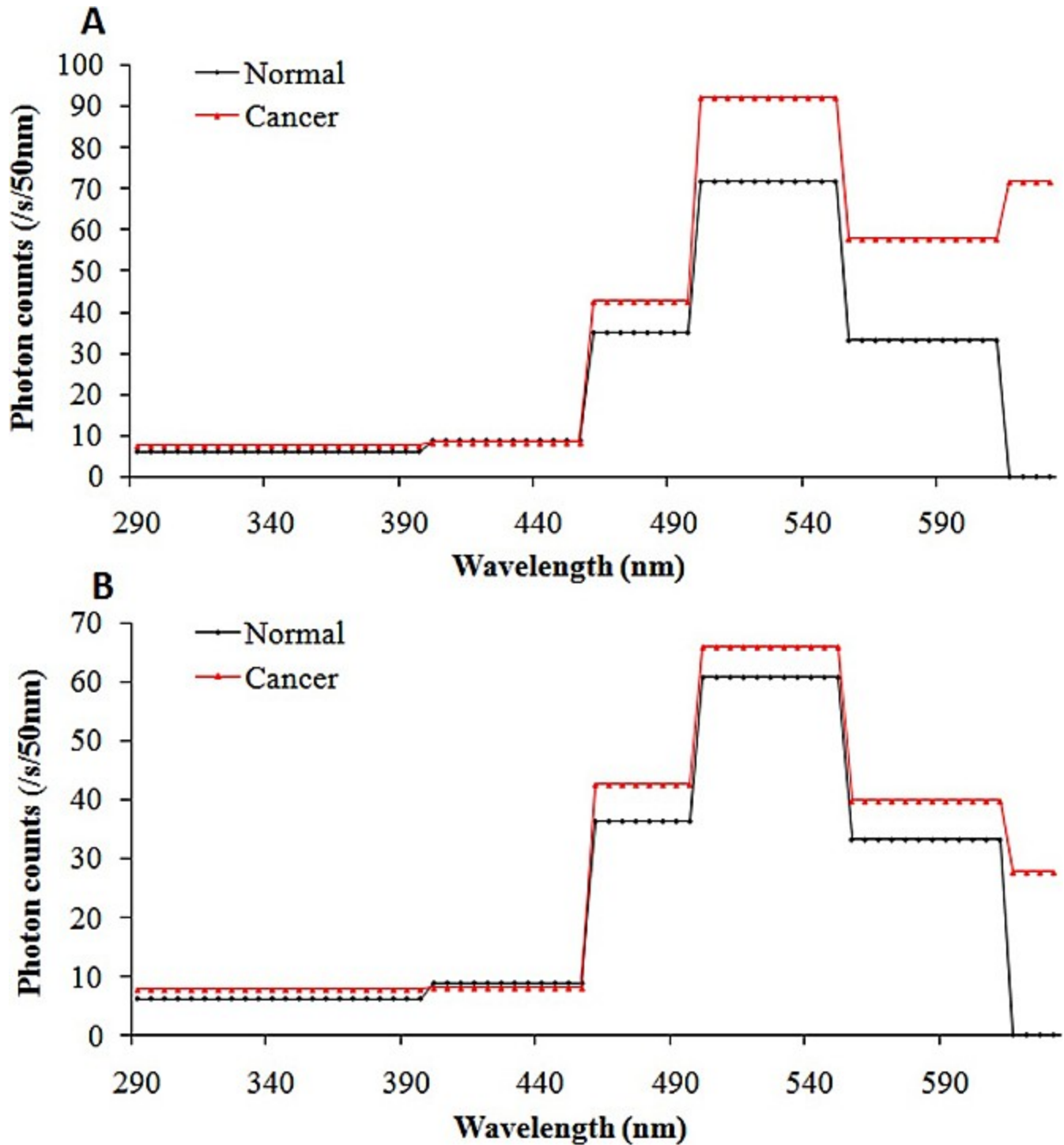


Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 5 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri tumorali erano inferiori a 0,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

È interessante notare che la distribuzione di SPE dal lato sinistro dei topi tumorali in questa fase del tumore, come mostrato in Fig. [7B](#), includeva un piccolo picco apparso a 610–630 nm e i segnali a 495–550 nm tendono ad aumentare rispetto allo spettro di Fig. [6B](#).

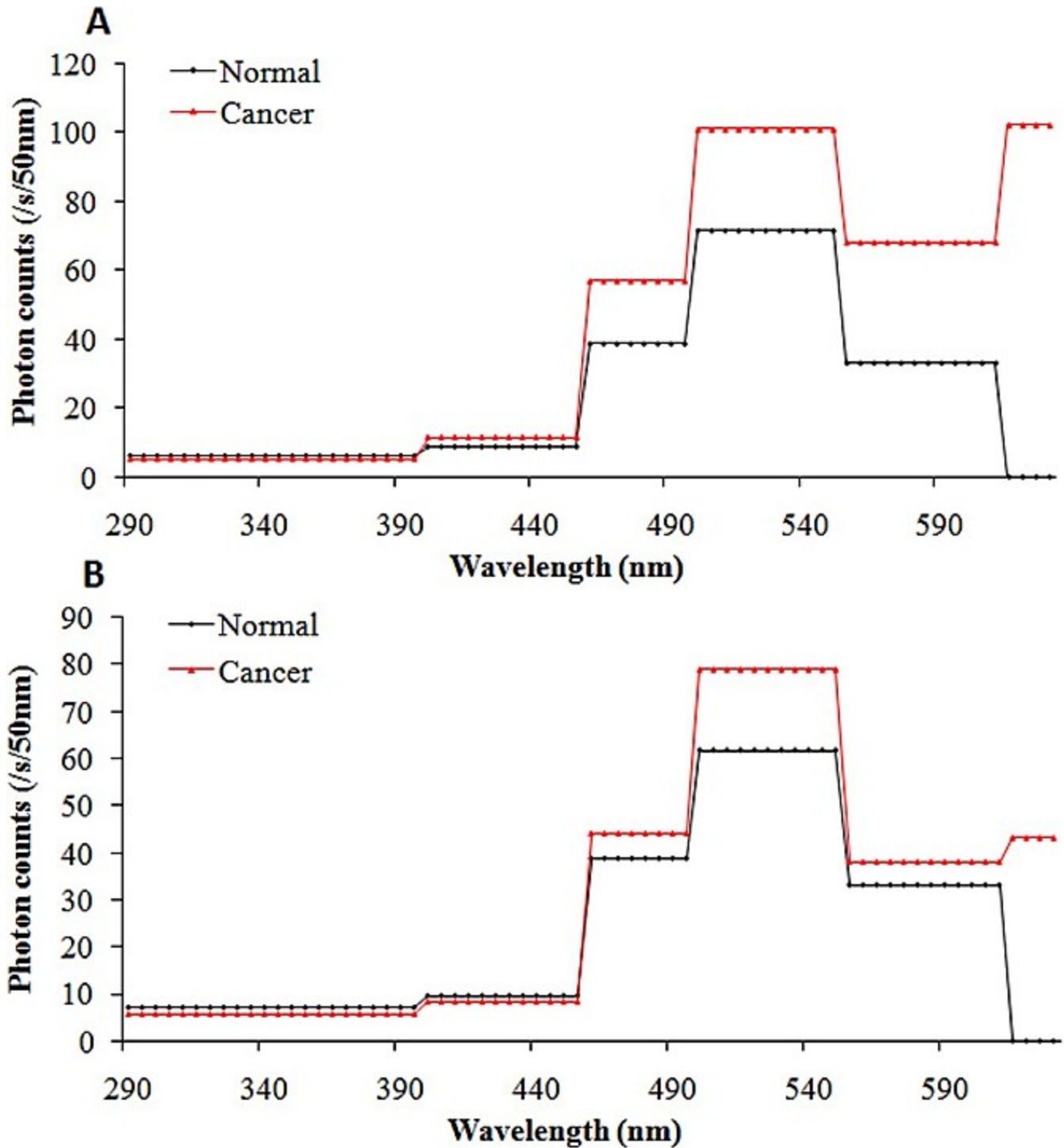
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 6 Distribuzione spettrale della SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri del tumore erano superiori a 1 cm e inferiori a 1,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondono ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

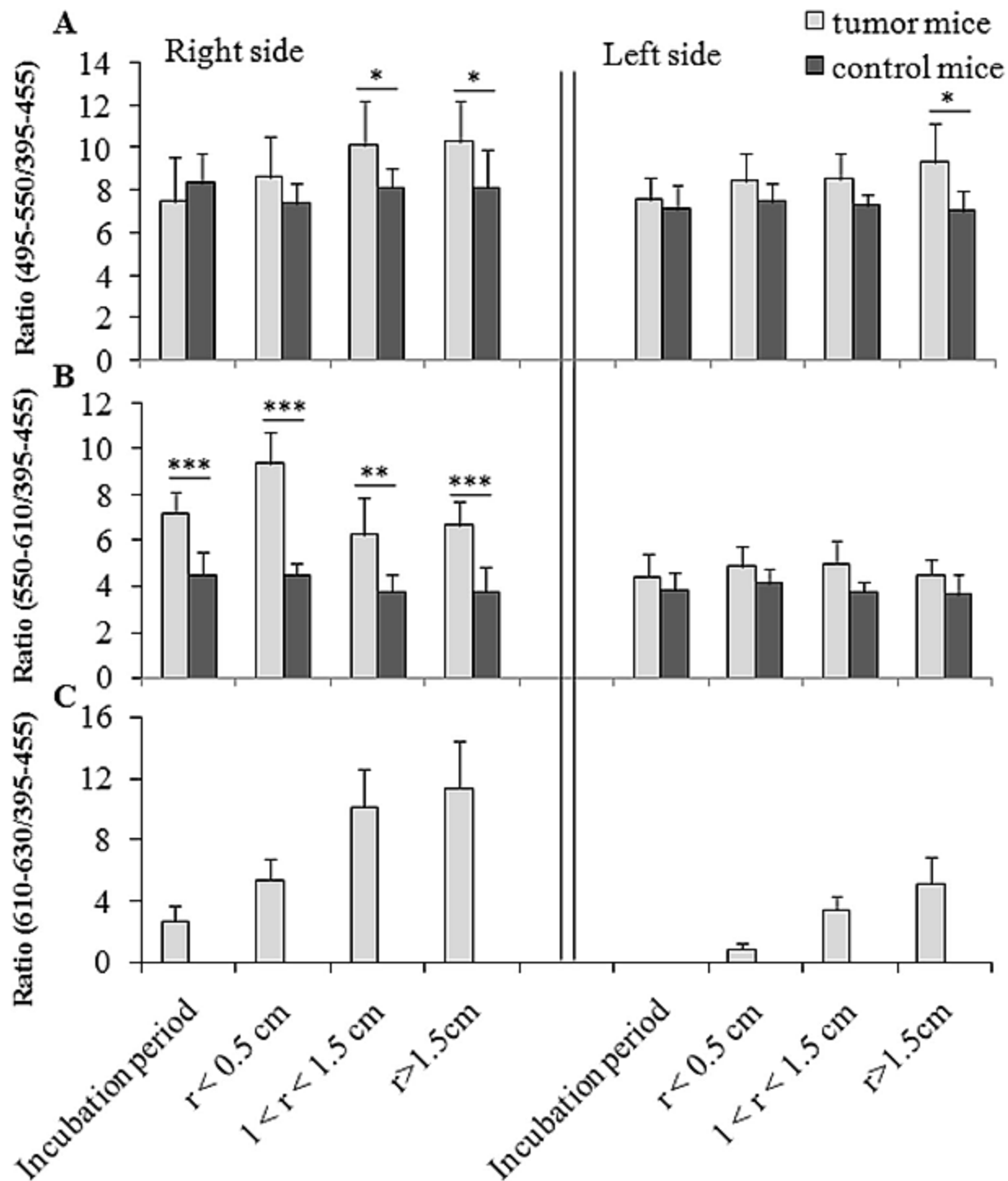
Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 7 Spettro SPE da entrambi i lati dei topi tumorali e controlli quando i diametri tumorali erano maggiori di 1,5 cm. (A) Distribuzione spettrale nei siti di lesione destra nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera). (B) Distribuzione spettrale nei siti di sinistra, che corrispondeva ai siti di lesione dei lati destro nei topi tumorali (linea rossa) e stessi siti nei controlli (linea nera).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figura 8. Rapporto tra vari componenti spettrali e componente a 395–455 nm per topi tumorali e controlli in diversi stadi di crescita dei tumori. r , diametro del tumore. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Per eliminare le differenze individuali e ottenere dati più accurati per l'ulteriore esplorazione delle caratteristiche spettrali della SPE durante il processo di crescita del tumore, abbiamo calcolato il rapporto tra i vari componenti spettrali (495–550 nm, 550–610 nm e 610–630 nm) e il componente a 395–455 nm per topi tumorali e controlli in diversi stadi di crescita del cancro. I dati sono presentati in Fig.8.

A partire dai risultati in Fig. 8, si può concludere che la crescita delle cellule tumorali ha influenzato la distribuzione spettrale della SPE della superficie del corpo del topo durante il cambiamento delle dimensioni del tumore. I componenti spettrali di SPE a una gamma di 550–610 nm e 610–630 nm cambiarono persino prima che fossero visibili eventuali cambiamenti morfologici nel sito del trapianto, come mostrato in Fig.8B-C. I dati mostrati in Fig.8A e C illustrato che, anche i componenti spettrali di SPE a 495–550 nm e 610–630 nm dal sito sano (lato sinistro) dei topi tumorali sono cambiati quando i tumori si sono sviluppati ad un certo stadio, in particolare a 610–630 nm. Il rapporto tra 610–630 nm e 395–455 nm tendeva ad aumentare con l'aumentare delle dimensioni del tumore per entrambi i lati destro e sinistro del topo tumorale, come mostrato in Fig. 8C, ma questa funzione non è stata osservata in altri rapporti. Queste differenze potrebbero essere utilizzate per discriminare i topi tumorali da topi sani, anche se i tumori non erano evidenti e per identificare le fasi di crescita dei tumori in una certa misura.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Analisi di correlazione tra rapporto (610–630 / 395–455 nm) e volume del tumore. Seguendo il risultato in Fig. 8C, abbiamo analizzato la correlazione tra il rapporto dei componenti spettrali (610–630 / 395–455 nm) e il volume del tumore. I risultati sono rappresentati in Fig.9. I risultati visualizzati in Fig. 9 ha suggerito che il rapporto spettrale tra la lunghezza d'onda varia da 610 a 630 nm e 395–455 nm era positivamente correlato al logaritmo del volume del tumore per entrambi il lato destro ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e lato sinistro ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali, sebbene il coefficiente di correlazione per il lato sinistro fosse relativamente basso.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

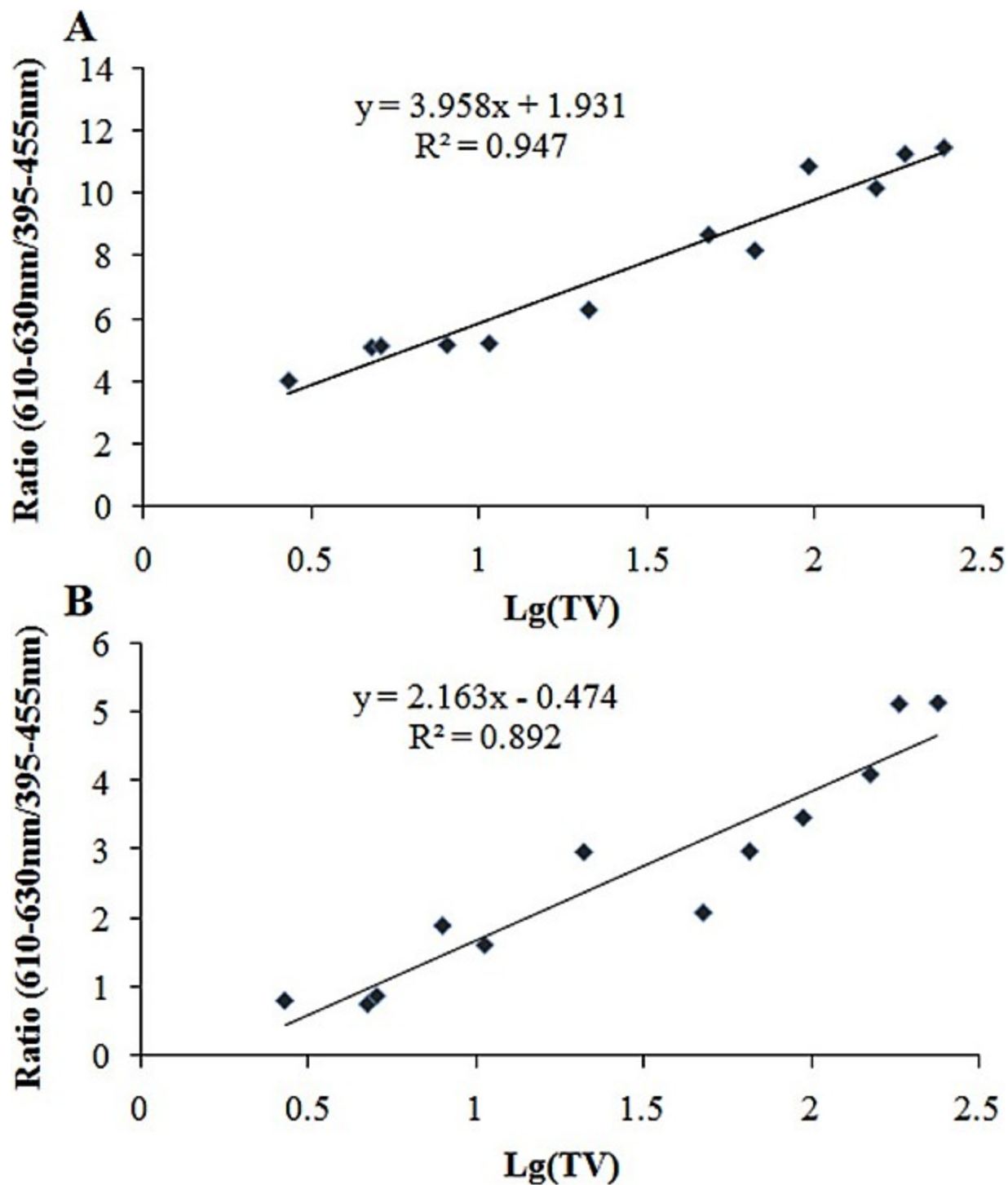


Figura 9 Analisi di correlazione tra rapporto dei componenti spettrali (610–630 / 395–455 nm) di SPE da destra

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

(A) e lato sinistro (B) dei topi tumorali e il loro volume tumorale. Lg (TV), il logaritmo del volume del tumore; l'unità è mm³. P < 0,001 sia per A che per B.

Discussione

È noto che i processi metabolici sono le reazioni biochimiche fondamentali nel sistema biologico e provocano la generazione di ROS, che è noto per svolgere un ruolo importante nella formazione di specie eccitate elettronicamente come carbonili di tripletto (${}^3R = O^*$), pigmenti eccitati (P^*) e ossigeno singoletto (1O_2). La SPE ha origine dal rilassamento di queste specie eccitate elettronicamente e ogni specie eccitata elettronicamente può emettere la sua energia come un fotone ad una particolare lunghezza d'onda. I fotoni dei gruppi carbonilici eccitati hanno lunghezze d'onda nelle regioni UVA vicine e blu-verde (350–550 nm), i pigmenti singoletti (${}^1P^*$) e i tripletti eccitati (${}^3P^*$) appaiono in verde-rosso (550–750 nm) e rosso -a prossimità delle regioni IR (750–1000 nm) e ossigeno singoletto si osserva nelle regioni rosse (634 nm e 703 nm) e vicine IR (1270 nm) [23](#). In cellule animali, la generazione di ROS è correlata a reazioni enzimatiche nei mitocondri, citoplasma e perossisomi e la respirazione cellulare nei mitocondri è una fonte importante [37-39](#). Quando i processi metabolici cambiano durante la progressione displastica, il tipo e il numero di specie eccitate elettronicamente cambiano di conseguenza, portando ad alterazioni delle caratteristiche ottiche di cellule, tessuti e organismi. La tecnologia di rilevazione SPE sensibile a queste alterazioni potrebbe essere utilizzata per riflettere i processi metabolici sottostanti nelle cellule e monitorare gli stati fisiologici e patologici dei sistemi biologici da una prospettiva ottica.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

A differenza delle cellule normali, che utilizzano principalmente la fosforilazione ossidativa come fonte di energia in condizioni aerobiche e glicolisi in anossia, le cellule tumorali usano la glicolisi come principale fonte di energia indipendentemente dal fatto che i livelli di ossigeno siano sufficienti⁴⁰⁻⁴³. Questa differenza nel metabolismo cellulare porta a cambiamenti in diverse reazioni biochimiche correlate, che si traducono in cambiamenti nei livelli di ROS delle cellule tumorali. Di conseguenza, la SPE delle cellule tumorali differisce da quella delle cellule sane, come descritto nell'introduzione. Tuttavia, la maggior parte delle ricerche si è concentrata su cellule o tessuti tumorali e pochi studi hanno studiato le caratteristiche in vivo della SPE di soggetti con cancro.

Nel nostro precedente studio, abbiamo scoperto che l'intensità della SPE dalla superficie corporea potrebbe distinguere significativamente i topi nudi portatori di cancro al seno dai controlli, indipendentemente dal fatto che i cambiamenti morfologici nei tumori fossero evidenti e che la SPE cambiasse con le dimensioni del tumore³⁵. In questo articolo, abbiamo ulteriormente studiato le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei topi portatori di carcinoma mammario umano e controlli sani durante l'intero processo di crescita del carcinoma mammario per esplorare più approfonditamente la relazione tra le componenti spettrali della SPE e gli stadi tumorali. I nostri risultati hanno mostrato una notevole differenza nella distribuzione spettrale della SPE tra i topi tumorali e i controlli. Nei topi di controllo, il picco massimo della distribuzione spettrale di SPE era di 495-550 nm sia per il lato destro che per quello sinistro dei topi. Nei topi tumorali, lo spettro della SPE dalla superficie corporea è cambiato con lo stadio del tumore.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per lo spettro della SPE dal lato del trapianto di tumore nei topi tumorali nel periodo di incubazione del tumore, sebbene il picco massimo spettrale fosse ancora a 495-550 nm, i livelli del segnale a 550-610 nm e 610-630 nm è significativamente aumentato ($p < 0,001$) rispetto ai topi di controllo. Quando il tumore era evidente ma il diametro inferiore a 0,5 cm, il picco massimo spettrale ha mostrato uno spostamento sostanziale verso la parte rossa dello spettro da 450-550 nm a 550-610 nm, e anche i livelli del segnale a 610-630 nm sono aumentati.

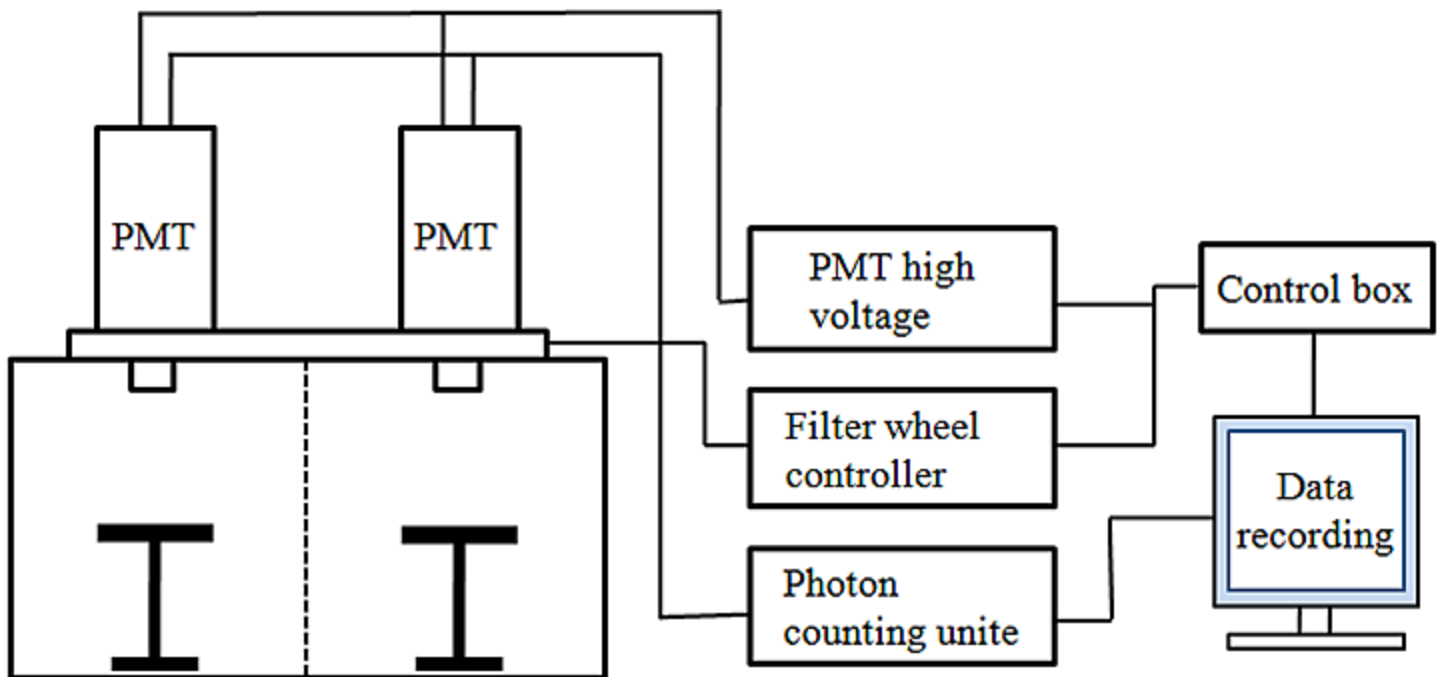


Figura 10 Rappresentazione schematica del sistema di rilevamento SPE a doppio PMT utilizzato in questo studio.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Inoltre, i livelli del segnale a 495-550 nm e 610-630 nm aumentarono ancora di più quando le dimensioni del tumore aumentarono ulteriormente e apparvero due picchi nello spettro della SPE: uno a 495-550 nm, come nei controlli; e un altro a 610-630 nm. Alcuni ricercatori hanno riferito che la melanina cutanea potrebbe avere alcuni effetti sulla SPE^{44,45}. Sulla base di questo, abbiamo eseguito un'analisi della melanina della pelle dei topi nudi usando il metodo di colorazione con argento Masson-Fontana. Abbiamo scoperto che la distribuzione della melanina cutanea nei topi nudi ha mostrato risultati negativi (vedi Fig. Supplementare S1). Questi risultati hanno suggerito che la melanina sulla pelle nei topi nudi era carente e non aveva alcun effetto sulla SPE proveniente dalla superficie corporea dei topi nudi. Rispetto alla lunghezza d'onda specifica emessa dalle specie eccitate elettronicamente, abbiamo ipotizzato che i cambiamenti nel carbossile eccitato di tripletta ($^3R = O^*$), nel pigmento eccitato di singoletto ($^1P^*$) e nell'ossigeno singoletto (1O_2), che sono coinvolti in una serie di reazioni redox complesse, possono essere principalmente responsabili dei cambiamenti nella distribuzione spettrale della SPE proveniente dalla parte destra dei topi tumorali. L'aumento dei vasi sanguigni nel sito della lesione e i cambiamenti dei componenti attivi nel sangue causati da tumori possono anche influenzare la distribuzione spettrale della SPE, in una certa misura. Inoltre, con la crescita dei tumori, l'intensità del segnale a 495-630 nm ha mostrato una tendenza crescente, in particolare a 610-630 nm.

Benchè il meccanismo preciso attraverso il quale il ROS influenza lo spettro della SPE non è chiaro, i nostri risultati indicano che lo spettro di SPE è sensibile ai cambiamenti delle condizioni fisiologiche e patologiche del sito lesionato e potrebbero essere usati come un indicatore biofisico significativo per l'analisi dei tumori nel cancro al seno, anche se il cancro è nel suo stadio primario.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Per SPE dal lato senza tumore dei topi tumorali rispetto ai controlli, le loro caratteristiche spettrali erano simili quando il diametro del tumore era inferiore a 0,5 cm. Con l'ulteriore crescita del tumore, le intensità del segnale a 610–630 nm sono successivamente aumentate; quando il diametro del tumore era maggiore di 1,5 cm, lo spettro SPE mostrava un secondo piccolo picco a 610–630 nm e i livelli del segnale aumentavano significativamente a 495–550 nm ($p = 0,016$). Questi risultati possono essere correlati ai cambiamenti nel tipo e nel numero di specie eccitate elettronicamente nel sangue o a causa della metastasi del tumore. Diversi ricercatori hanno dimostrato che il tasso di produzione di ossigeno singoletto e perossido di idrogeno era misurabilmente più alto nel plasma dei pazienti con carcinoma mammario rispetto ai controlli^{14,46}. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi.

Un'altra scoperta interessante in questo studio è stata che, il rapporto spettrale tra la gamma di lunghezze d'onda 610–630 nm e 395–455 nm era positivamente correlato con il logaritmo del volume del tumore per entrambi il lato destro ($R^2 = 0,947$; $p < 0,001$) e il lato sinistro ($R^2 = 0,892$; $p < 0,001$) dei topi tumorali, come mostrato in Fig. 9. Ciò indica che i componenti spettrali della SPE dai topi tumorali hanno una stretta relazione con lo stato del tumore.

Conclusione

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Noi hanno riportato le caratteristiche spettrali della SPE dalla superficie corporea dei modelli di topi nudi portatori di cancro al seno umano durante tutto il processo di crescita del cancro al seno utilizzando un sistema di rilevamento SPE a doppio PMT ad alta sensibilità e una serie di filtri di cut-off. I nostri dati hanno mostrato che la distribuzione spettrale della SPE dal lato della lesione della superficie corporea dei topi tumorali era significativamente diversa da quella dello stesso lato dei controlli sani, indipendentemente dal fatto che fossero visibili cambiamenti morfologici nel sito della lesione. Con lo sviluppo del tumore al seno ($1 < r < 1,5$ cm in questo documento), anche la distribuzione spettrale della SPE dal lato sano dei topi tumorali differiva dai controlli. Inoltre, la differenza di spettro era correlata a diversi stati di crescita dei tumori. È interessante notare che, c'era una correlazione positiva tra il rapporto spettrale (610–630 / 395–455 nm) e il logaritmo del volume del tumore per entrambi i lati destro e sinistro dei topi tumorali. Sebbene il meccanismo preciso della SPE dalla superficie corporea dei topi nudi non sia stato chiarito completamente, questi risultati indicano che lo spettro della SPE dalla superficie corporea contiene informazioni metaboliche abbondanti ed è strettamente correlato alla crescita del cancro al seno. La relazione tra il ROS nel sito della lesione o siero nelle diverse fasi di crescita dei tumori e le componenti spettrali della SPE dalla superficie corporea dovrebbe essere studiata successivamente. A nostro avviso, questi primi risultati preliminari sono interessanti. Tuttavia, è necessaria un'ulteriore acquisizione dei dati per giungere alla conclusione che gli spettri SPE potrebbero essere un potenziale indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno,

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

metodi

Sistema di rilevamento sperimentale. Una rappresentazione schematica del sistema di rilevamento SPE a doppio PMT è illustrata in Fig. 10. I componenti principali del sistema di rilevamento includono due PMT (ET Enterprises, Gran Bretagna, 9235QA), un alimentatore ad alta tensione (Sens Tech PM20), una ruota filtro e un sistema di otturatori, due unità di conteggio dei fotoni (C9744), una scatola scura costituita da due camere, una centralina e un computer con software di misurazione e conteggio dei fotoni. Il sistema è stato collocato in una sala operatoria speciale per garantire la schermatura magnetica.

Due PMT sensibili nello spettro di 290-630 nm sono stati installati sulla parte superiore delle due camere della scatola oscura. Di fronte al PMT, è stato posizionato un sistema di ruote filtranti. L'analisi spettrale è stata eseguita utilizzando un set di filtri (Schott Glaswerke AG, Main, Germania) con lunghezze d'onda di taglio rispettivamente a 395 nm, 455 nm, 495 nm, 550 nm e 610 nm. Oltre ai filtri di cui sopra, nella ruota del filtro era inclusa un'apertura senza filtro. Le efficienze quantistiche del PMT per le diverse bande spettrali sono state del 27% (290-395 nm), 23% (395-455 nm), 15% (455-495 nm), 6% (495-550 nm), 3% (550-610 nm) e 2% (610-630 nm).

Per posizionare i topi e assicurarsi che la distanza tra il sito di rilevamento e la finestra PMT fosse la stessa (1,0 cm) per tutte le misurazioni, un supporto per campioni con altezza regolabile è stato posizionato in ciascuna camera della scatola scura. Lo speciale design di due camere e due PMT in un'unica scatola scura ci ha permesso di misurare due topi contemporaneamente. La temperatura nella sala operatoria è stata controllata a 25 ± 1 °C.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Linee cellulari. La linea cellulare di cancro al seno umano MDA-MB-231 utilizzata in questo studio è stata acquistata dalla banca cellulare dell'Istituto di biologia cellulare di Shanghai, Accademia cinese delle scienze. Le cellule sono state coltivate in DMEM integrato con 100 U / mL di penicillina, 100 µg / mL di streptomina e 10% di FBS e incubate a 37 ° C in un'atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in aria come coltura monostrato in piastre di coltura plastica (100 mm di diametro). Le cellule venivano regolarmente sottocoltivate quando veniva raggiunta la confluenza dell'80%.

Trapianto di xenotrapianto sottocutaneo. Quaranta topi nudi femminili BALB / C (5 settimane) sono stati ottenuti dalla Beijing Bioscience Company di Pechino e sono stati randomizzati in tre gruppi: gruppo normale, n = 5; gruppo di controllo, n = 10; e gruppo di esperimenti, n = 25. Le cellule MDA-MB-231 con una buona crescita sono state tripsinizzate e sospese in soluzione fisiologica. Nel gruppo sperimentale, un totale di 5×10^6 cellule in 0,15 mL di soluzione fisiologica sono state iniettate per via sottocutanea nell'ascia ascellare destra di ciascun topo nudo dopo una settimana di acclimatazione. Per i topi di controllo, il loro ascellare destro è stato iniettato solo con 0,15 mL di soluzione salina fisiologica. I topi normali sono rimasti liberi da eventuali iniezioni. Dopo l'iniezione, i topi sono stati tenuti in una struttura di isolamento priva di agenti patogeni sotto un ciclo luce / buio di 12 ore a 22-24 ° C e umidità del 50% con cibo e acqua disponibili ad libitum.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Metodo di misurazione. Ogni test è stato condotto tra le 14:00 e le 16:00 per ridurre l'influenza dei ritmi diurni⁴⁷. Per garantire la coerenza dell'esperimento, è stato osservato il seguente protocollo per tutte le misure. a): I topi sono stati ponderati e anestetizzati usando il 7% di sodio pentobarbital (70 mg / kg) per mantenere gli animali esattamente nella stessa posizione durante la misurazione. Dopo l'iniezione, i topi sono stati tenuti in una gabbia per 5 minuti e quindi collocati in una stanza completamente buia con temperatura controllata (25 ± 1 ° C) e umidità (50%) 20 minuti prima dell'inizio della misurazione per eliminare l'influenza di luce esterna. b): i segnali della camera vuota (BG) senza e con filtri in una sequenza da 395 nm a 610 nm in entrambi i PMT sono stati misurati per 3 minuti ad intervalli di 1 s prima di misurare i topi per garantire le prestazioni di rilevamento del sistema sperimentale e per analisi dei dati di follow-up. c): successivamente, due topi pretrattati sono stati posizionati sui due porta-campioni in diverse camere, rispettivamente. In questo modo, abbiamo ottenuto segnali da due topi, in modo sincrono. I segnali dal sito di trapianto del tumore sui lati destro dei due topi e lo stesso sito sui lati sinistro sono stati registrati in sequenza. La durata di ciascun filtro era di 3 minuti, con un tempo di intervallo di 1 s, e il tempo di registrazione per ciascun lato di un mouse con un set completo di filtri impiegava circa 18 minuti; sono stati necessari circa 40 minuti per una misurazione completa. La misurazione successiva è stata eseguita immediatamente dopo. d): Infine, la BG senza e con i filtri è stata nuovamente misurata. Va sottolineato che, nonostante la piccola differenza tra i due PMT,

La misurazione dei siti di trapianto di tumore è iniziata quando le cellule del cancro al seno erano nel periodo di incubazione,

e le misurazioni sono state eseguite due volte alla settimana fino a quando i tumori erano evidenti (come mostrato in Fig. 2).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Analisi dei dati. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita con SPSS 18.0 (SPSS, USA). Le differenze sono state considerate significative in $p < 0,05$. I calcoli e la rappresentazione grafica dei dati sono stati eseguiti utilizzando Origin 9.1. L'analisi di correlazione di Pearson è stata utilizzata per valutare la correlazione tra SPE e il volume del tumore (TV) e la TV è stata calcolata con la seguente formula: $TV = 1 / 2ab^2$, dove "a" rappresenta la lunghezza del tumore e "b" rinvia la larghezza di esso.

Disponibilità dei dati. I set di dati generati durante e / o analizzati durante lo studio attuale sono disponibili dall'autore corrispondente su ragionevole richiesta.

Riferimenti

1. Torre, LA et al. Statistiche globali sul cancro, 2012. *Ca A Cancer Journal for Clinician*. 65, 87–108, <https://doi.org/10.3322/caac.21262> (2015).
1. Kala, S., Pantola, C., Agarwal, A., Pradhan, A. & Thakur, S. Spettroscopia ottica: uno strumento diagnostico promettente per le lesioni al seno. *Giornale di ricerca clinica e diagnostica*. 5, 1574-1577 (2011).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Carney, PA et al. Probabilità di ulteriori allenamenti tra le donne sottoposte a mammografia di screening di routine: l'impatto dell'età, della densità mammaria e dell'uso della terapia ormonale. *Prev Med.* 39, 48–55, <https://doi.org/10.1016/j.yjmed.2004.02.025> (2004).
2. Hata, T. et al. Imaging a risonanza magnetica per la valutazione preoperatoria del carcinoma mammario: uno studio comparativo con la mammografia ed ecografia. *J Am Coll Surg.* 198, 190–197, <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2003.10.008> (2004).
3. Hindle, WH, Davis, L. & Wright, D. Valore clinico della mammografia per donne sintomatiche di età pari o inferiore a 35 anni. *Am J Obstet Gynecol.* **180**, 1484-1490 (1999).
4. Ostrander, JH et al. Il rapporto ottico redox differenzia le linee cellulari di cancro al seno in base allo stato del recettore degli estrogeni. *Cancer Res.* **70**, 4759–4766, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2572> (2010).

OPEN

Received: 2 June 2017

Accepted: 22 September 2017

Published: xx xx xxxx



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Published online: 12 October 2017

Spectrum of spontaneous photon emission as a promising biophysical indicator for breast cancer research

Xiaolei Zhao¹, Meina Yang², Yong Wang³, Jingxiang Pang², Eduard Van Wijk^{4,5}, Yanli Liu⁶, Hua Fan², Liewei Zhang⁷ & Jinxiang Han^{1,2}

In this study, we investigated the spectral characteristics of Spontaneous Photon Emission (SPE) from the body surface of a human breast cancer-bearing nude mice model during the overall growth process of breast cancers. By comparing and analyzing the data, we found that there was a striking difference between tumor mice and healthy controls in the spectral distribution of SPE from the body surface

of lesion site, even when the morphological changes at the lesion site were not obvious. The spectral distribution of SPE from the healthy site of the tumor mice also differed from that of the healthy controls as the breast cancer developed to a certain stage. In addition, the difference in spectrum was related with different growth states of tumors. Interestingly, there was a positive correlation between the spectral ratio (610–630/395–455 nm) and the logarithm of the tumor volume for both the lesion site ($R^2 = 0.947$; $p < 0.001$) and the normal site ($R^2 = 0.892$; $p < 0.001$) of the tumor mice. The results suggested that the spectrum of SPE was sensitive to changes in the tumor status.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death among females worldwide. It alone accounts for 25% of all cancer cases and 15% of all cancer deaths among females¹. Despite increasing knowledge of the disease, its incidence is steadily increasing in many countries in South America, Africa and Asia. Breast cancer is one of the most treatable forms of cancer if it is detected and diagnosed in an early stage. Early diagnosis is also the best way to curtail the effects of the disease and improve survival². As the most commonly used screening method, mammography can often detect breast cancer in an early stage, but it is imperfect. Not all breast cancers will be detected by a mammogram, especially when the morphological characteristics of the abnormal lesions are not obvious. Mammography occasionally results in false-positive results or in overdiagnosis and overtreatment of some breast cancers¹. In addition, although the current imaging methods can provide high spatial resolution, there is relatively little information about the metabolism and molecular-level changes in the breast tissue^{3–5}.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

It is well known that the metabolism of breast cancer cells is different from that of healthy cells⁶. Researchers have shown increased interest in reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radical (OH \cdot), superoxide anions (O $_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H $_2$ O $_2$) which are by-products of cellular metabolism, and in their roles in the tumor microenvironment^{7,8}. Under normal circumstances, the levels of ROS and the capacity for oxidative defenses are well balanced. However, many factors can disrupt this balance and generate excessive ROS to cause oxidative damages to biomolecules which can lead to cellular alterations and, ultimately, tumorigenesis and neoplastic transformation^{8–11}. Therefore, biochemical changes occur before morphological changes in the lesion regions. In fact, ROS are now considered as a hallmark of cancer^{8,11,12}. Many studies have reported that breast cancers show increased production of ROS and a high level of oxidative stress in breast cancer tissue or a significant increase in the levels of oxidative stress markers in the plasma from breast cancer patients^{12–16}. In this sense, it is of great significance to develop a new sensitive and non-invasive approach to detect changes of metabolism *in vivo* to improve the detective rate and accuracy of preliminary screening of breast cancers, especially in its early stages.

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shandong University, Jinan, 250012, China. ²Shandong

Medicinal Biotechnology Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, 250062, China. ³Department of Neurosurgery, Shandong Cancer Hospital, Jinan, 250117, China.

⁴Sino-Dutch Centre for Preventive and Personalized Medicine/Centre for Photonics of Living Systems, Leiden University, Leiden, Netherlands. ⁵Meluna Research, Geldermalsen, Netherlands. ⁶Department of Basic Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355, China. ⁷Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355, China. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.H. (email: samsjxhyx@163.com)

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

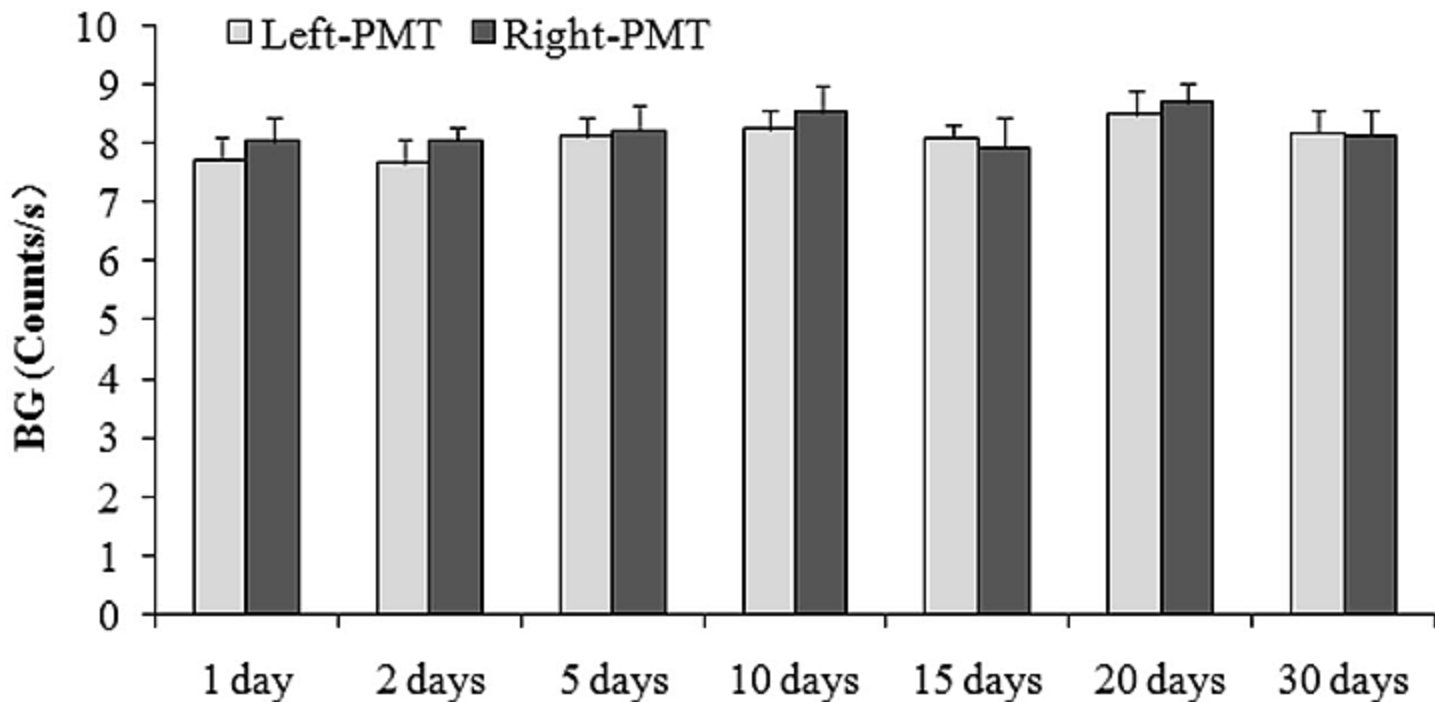


Figure 1. BG signals of the left and right PMT without filters at the same time (2:00 p.m.) on different days.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Spontaneous ultra-weak photon emission (SPE), as an intrinsic attribute of biological systems, is a possible candidate for use in the development of an optical biopsy method to monitor the levels of ROS during metabolic processes in normal and abnormal cells, tissues and organisms^{17–20}. SPE originates from the relaxation of electronically excited species (*e.g.*, $^3R = O^*$, 1O_2 and $^1P^*$) in biological systems. The electronically excited species come from the oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids by ROS that forms in normal or abnormal oxidative metabolic processes^{21–24}. Each electronically excited species can emit its energy as a photon at a specific wavelength. The biophysical changes accompanying dysplastic progression often lead to alterations in the optical characteristics of tissues. The SPE detection technology that is sensitive to these alterations can be used to monitor the physiological and pathological states of the biological systems. As a non-invasive biophysical marker for monitoring the state of the biological system, SPE has attracted considerable attention and has been used in many fields including agriculture²⁵, food quality²⁶ and healthcare^{20,27–29}.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Preliminary studies have been performed to define the potential of SPE to serve as a sensitive biophysical marker to detect different physiological and pathological states of cancers based on their different oxidative metabolic states. For example, Bustamante *et al.* found a difference in the emission intensity between the logarithmic growth phase and the stationary phase using human malignant melanoma cells, and they attributed it to the difference in the activity of catalase in cells, which led to metabolic changes³⁰. Takeda *et al.* reported the temporal changes in SPE intensities, along with cancer cell proliferation and the spectral distribution of SPE from the TE9 cancer cell line, and found that these changes in SPE were closely related to the ROS produced during the metabolic processes³¹. The experiment from Rác *et al.* illustrated that the human multiple myeloma cells U266 exposed to hydrogen peroxide would result in the formation of $3(R = O)^*$ and $1O_2$ which lead to an immediate enhancement of the ultra-weak photon emission followed by a slow decay³². Kim *et al.* measured SPE from human cancerous lung tissue and adjacent normal lung tissue and the results suggested that SPE emission could be used to differentiate a tumor from adjacent normal tissue; they also showed a salient difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma¹⁸. Chen *et al.* successfully used serum samples to distinguish patients with acute lymphoblastic leukemia from healthy volunteers³³. In addition, a comparison between the intensities of SPE from tumor-bearing mice transplanted with ovarian cancer cells and control mice was performed by Kim *et al.*³⁴. Therefore, it is expected that SPE could be a promising biophysical marker for monitoring the pathophysiological status of breast cancers.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

In our previous study³⁵, we demonstrated that SPE intensity from the body surface could significantly distinguish the breast cancer-bearing nude mice from healthy controls, no matter whether the morphological changes of the tumors were obvious. We also found that SPEs changed with the tumor size. In the present study, our research question focused on the spectral characteristics of SPE from the body surface of a human breast cancer-bearing nude mice model and healthy controls during the entire breast cancers growth process. We hope to explore the relationship between the spectral components of SPE and the tumor stages more deeply. In this way, we could provide a more precise evidence for the use of SPE as a non-invasive biophysical indicator in the breast cancer research.

Results

Performance of the two PMT in the detection system. Fig. 1 displayed the BG signals of the left and right PMT without filters at the same time (2:00 p.m.) on different days. The figure shows that the performance of the detection system was stable, and there were no significant differences between the left- and right-PMT.

Spectral features of SPE from the body surface of mice in each group throughout the growth process of breast cancer. Forty nude mice were used in this study: twenty-five in experiment group, ten in the control group and five in the normal group. From the twenty-five mice in the experiment group, twenty-one mice grew tumors (labeled as tumor mice group), but the other four mice did not (labeled as tumor-free mice group). Figure 2 shows an example of the different growth stages of a mouse whose right axillary was injected with breast cancer cells.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

To analyze the spectral features of SPE from the body surface of mice in each group with respect to different growth stages of the tumor, measurements began when the breast cancer cells were in the incubation period and

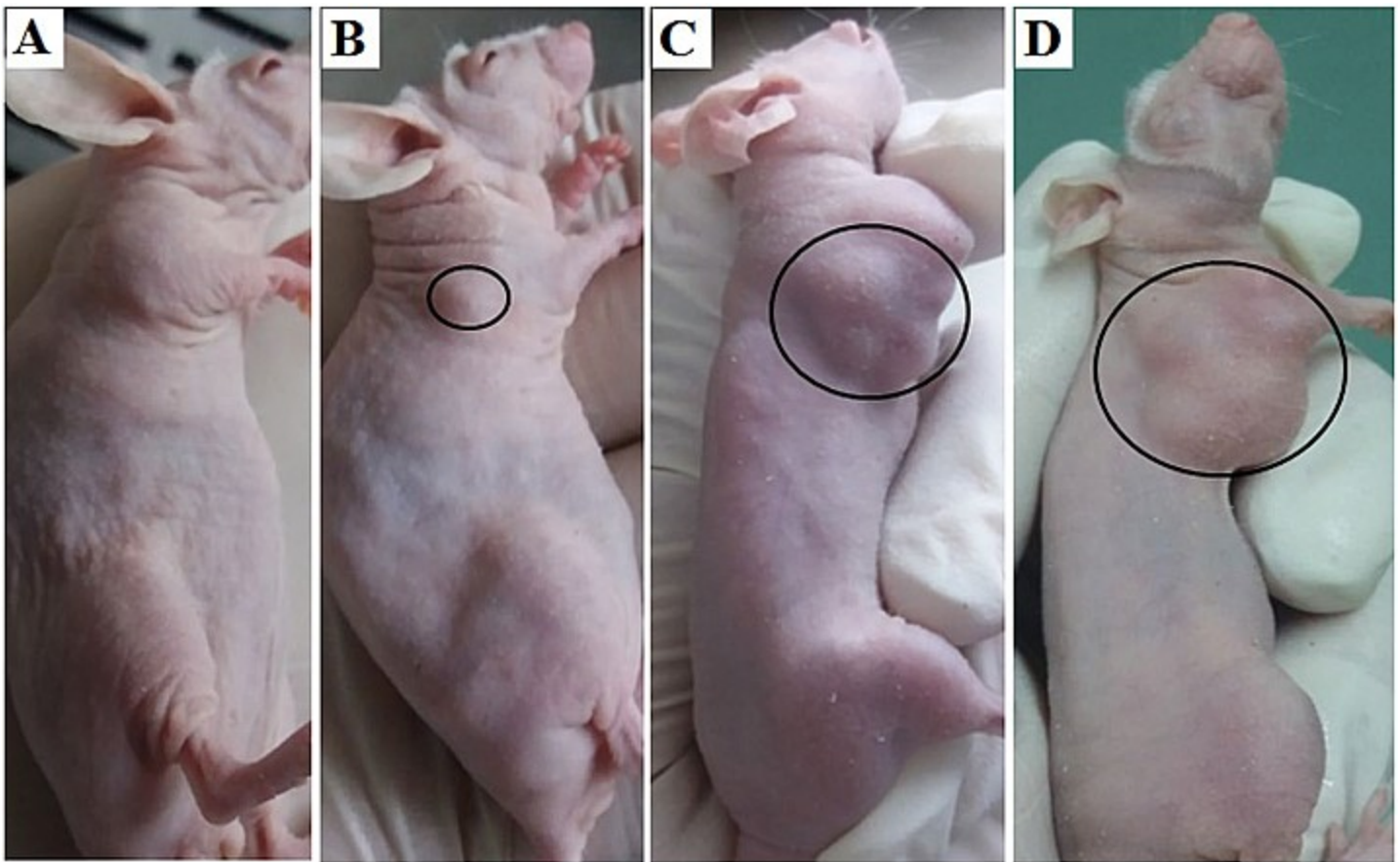


Figure 2. Different growth stages of a mouse whose right axillary was injected with breast cancer cells. **(A)** Incubation period of breast cancer; **(B)** Tumor diameter less than 0.5 cm; **(C)** Tumor diameter between 1 and 1.5 cm; **(D)** Tumor diameter greater than 1.5 cm.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

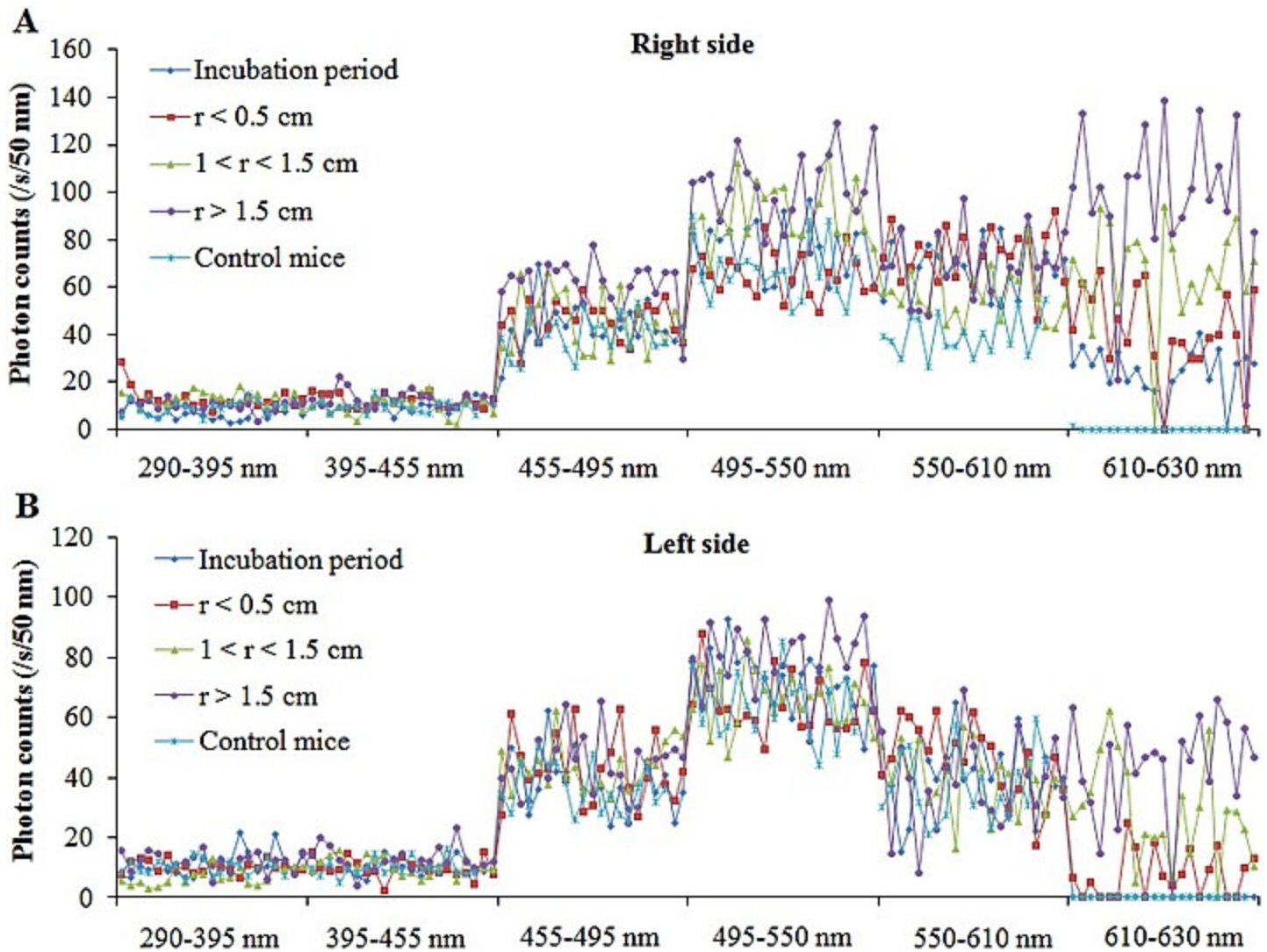


Figure 3. The spectral distributions of SPE from both sides of twenty-one tumor mice in different growth stages of breast cancers and nineteen healthy controls. **(A)** Spectral distributions on right sites of tumor mice in different growth stages of cancers and healthy controls. **(B)** Spectral distributions on left sites of tumor mice in different growth stages of cancers and healthy controls. r , diameter of tumor.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

continued twice a week until the tumors were obvious. The detailed measurement protocol is described in the section of measurement method. The photon data (with different cut-off filters) for both sides of each mouse from each group at different growth stages of tumor (as shown in Fig. 3) were recorded, and were averaged in mean \pm standard deviation (SD) corrected for their own BG signals. The subsequent calculation method was the

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Wavelength range	Incubation period	r < 0.5 cm	1 < r < 1.5 cm	r > 1.5 cm	Control mice
Right side of mice					
290–395 nm	6.84 ± 2.91	7.40 ± 4.41	7.91 ± 2.94	5.22 ± 2.27	6.33 ± 2.89
395–455 nm	9.76 ± 2.19	7.35 ± 2.67	8.70 ± 3.98	9.70 ± 3.43	8.54 ± 2.49
455–495 nm	42.07 ± 9.27	43.04 ± 8.22	42.32 ± 12.76	57.45 ± 11.27*	38.46 ± 8.36
495–550 nm	74.04 ± 11.84	64.47 ± 9.19	91.02 ± 12.54*	101.41 ± 14.81*	66.72 ± 11.97
550–610 nm	68.98 ± 11.26*	71.09 ± 11.23*	57.11 ± 11.95*	68.69 ± 13.76*	38.24 ± 8.85

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

610–630 nm	26.51 10.33*	± 41.20 18.41*	± 79.73 21.11*	± 105.86 32.66*	± 0.00	
Left side of mice						
290–395 nm	7.10 ± 4.17	8.19 ± 1.96	7.02 ± 3.06	6.01 ± 3.24	7.06 ± 2.48	
395–455 nm	9.20 ± 2.39	8.33 ± 3.17	8.45 ± 2.94	8.71 ± 4.02	9.05 ± 2.78	
455–495 nm	38.06 ± 9.35	44.88 11.23	± 43.41 ± 7.85	44.80 ± 9.84	36.01 ± 7.85	
495–550 nm	72.21 ± 9.68	67.94 ± 9.54	69.85 ± 9.53	79.61 11.57*	± 63.95 10.98	±
550–610 nm	41.45 12.10	± 43.09 12.02	± 39.76 10.83	± 37.78 ± 14.83	34.79 11.51	±
610–630 nm	0.00	7.49 ± 7.74*	28.33 16.75*	± 43.80 16.40*	± 0.00	

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Table 1. The average signal intensity of SPE at different wavelength range from twenty-one tumor mice in different cancer growth stages and nineteen healthy controls. r , diameter of tumor. *Statistically significant compared with control mice.

same as that reported by Van Wijk³⁶. The difference in SPE intensity between two filters with successive wave-length cut-offs was used to calculate the photon emission of a particular wavelength range. The photon emission of the particular wavelength range was mathematically corrected for the transparency of the filters and the quantum efficiency of the PMT. The detailed quantum efficiencies of corresponding particular wavelength range of the used PMT's are described in the "Methods" section. If the difference was not significant ($p > 0.05$), the photon emission of the mouse with that wavelength range was considered to be zero. The final estimation of the spectral distribution of each side of a mouse was expressed in cps per 50 nm. Because of the similar features ($p > 0.05$) of spontaneous photon emission among tumor-free mice, normal mice, and controls which were consistent with our previous study³⁵, we merged them into one group: namely, the control group. The spectral distributions of SPE from the body surface of twenty-one tumor mice and nineteen control mice throughout the growth process of the breast cancers are illustrated in Fig. 3.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

The data in Fig. 3 illustrates that there is a high individual variance of spectral distribution between different mice. However, the trend of spectrum changes in different mice in the same groups was similar. In order to clearly exhibit the spectral characteristics of SPE during the tumor growth process, we averaged the spectral data of nude mice at the same growth stage of tumors from the same group. The results were displayed in Table 1 and Figs 4–7. As depicted in Fig. 4, the spectral distribution of SPE from the right and left sides of control mice was similar: the maximal peak was 495–550 nm, and the photon signals from both sides were no longer detectable with cut-off filters at 610 nm and higher. The spectral distribution of SPE from the left side (no tumor side) of tumor mice was consistent with that from control mice, whereas the spectral features of SPE from the right side (tumor transplantation side) of tumor mice was different. For the right side of tumor mice, the wavelength range of the maximal peak was the same as that from the controls; however, the signal at 550–610 nm was 1.9-fold higher than that of controls. In addition, the spectral distribution of the right side of tumor mice showed relatively high emission at 610–630 nm, contrary to the zero emission of the right side of controls. This illustrated that the spectrum of SPE from the tumor transplantation site of mice surface had already changed in the incubation period of breast cancer

(before any morphological changes) in the tumor mice.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

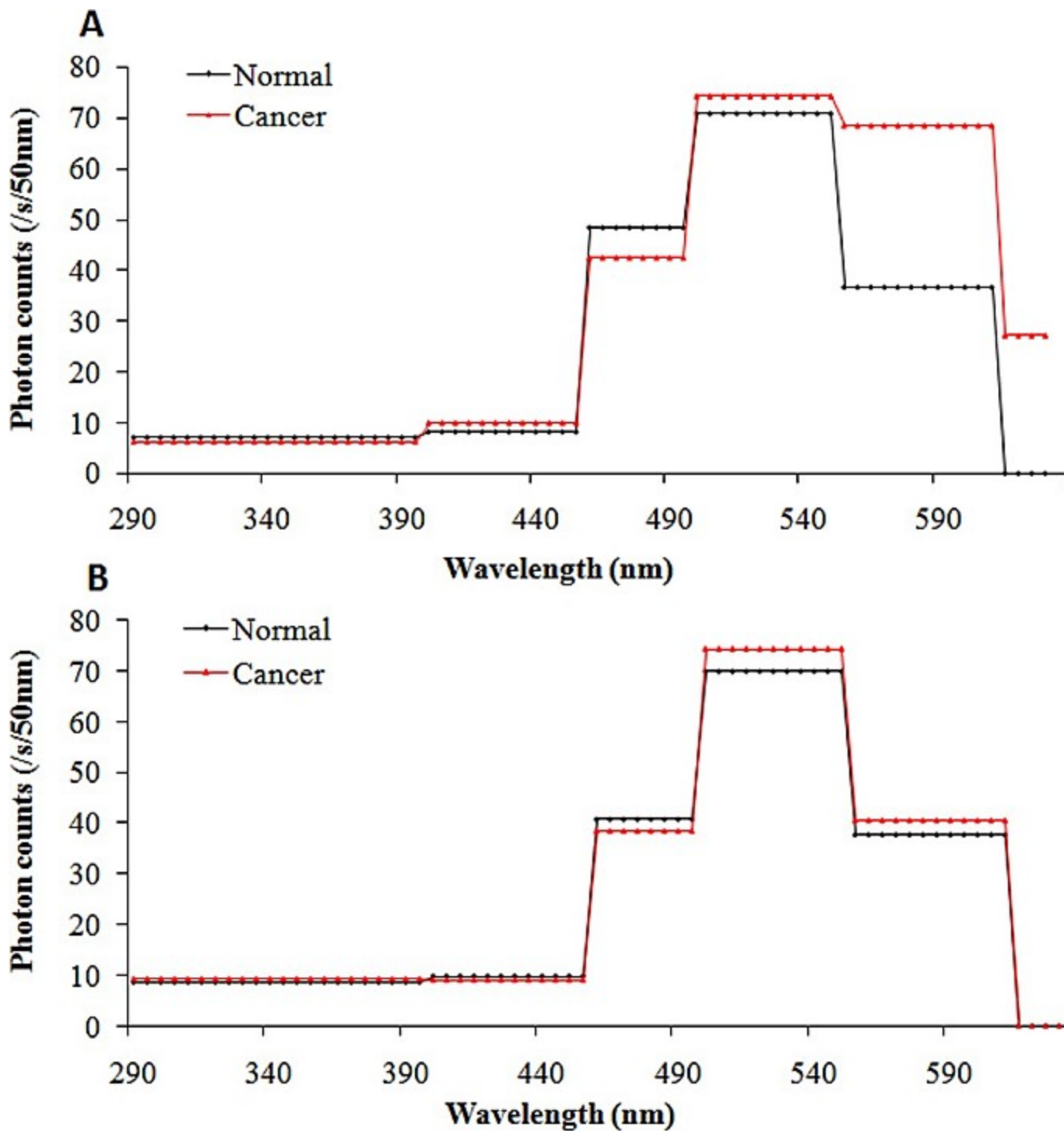
Figure 5 illustrates the spectrum of SPE from both sides of tumor mice and controls when the tumor diameters were less than 0.5 cm. There were no significant differences between the tumor mice and controls in the spectral feature of SPE from the left side (normal side) at this tumor stage ($r < 0.5$ cm), except for some photon signals at 610–630 nm in tumor mice. However, from the right side (tumor transplantation site) of the tumor mice, the maximal peak of spectral distribution appeared at 550–610 nm, which was distinctly different from both the controls and the tumor mice when the tumor was not obvious. Compared with the tumor mice during the incubation period for the breast cancers, the photon signals from the tumor mice at this tumor stage increased significantly (approximately 1.7-fold) at 610–630 nm. In other spectral components of SPE, the difference between the right sides of tumor mice and the controls was small.

Distinct from the tumor mice data mentioned above, two peaks appeared in the spectrum of SPE from the right sides of tumor mice when the tumor diameter was larger than 1 cm and less than 1.5 cm as shown in Fig. 6A: one peak appeared at 455–495 nm, which was the same as that from the right side of the controls, and another peak appeared at 610–630 nm. Notably, at 610–630 nm in the spectrum of SPE (shown in Fig. 6B), the emission levels from the left side of tumor mice at this tumor stage were 4-fold higher than the emission from the left side of tumor mice when tumor diameters were less than 0.5 cm.

In Fig. 7A, SPE from the right side of tumor mice at this tumor stage ($r > 1.5$ cm) showed similar spectral fea-

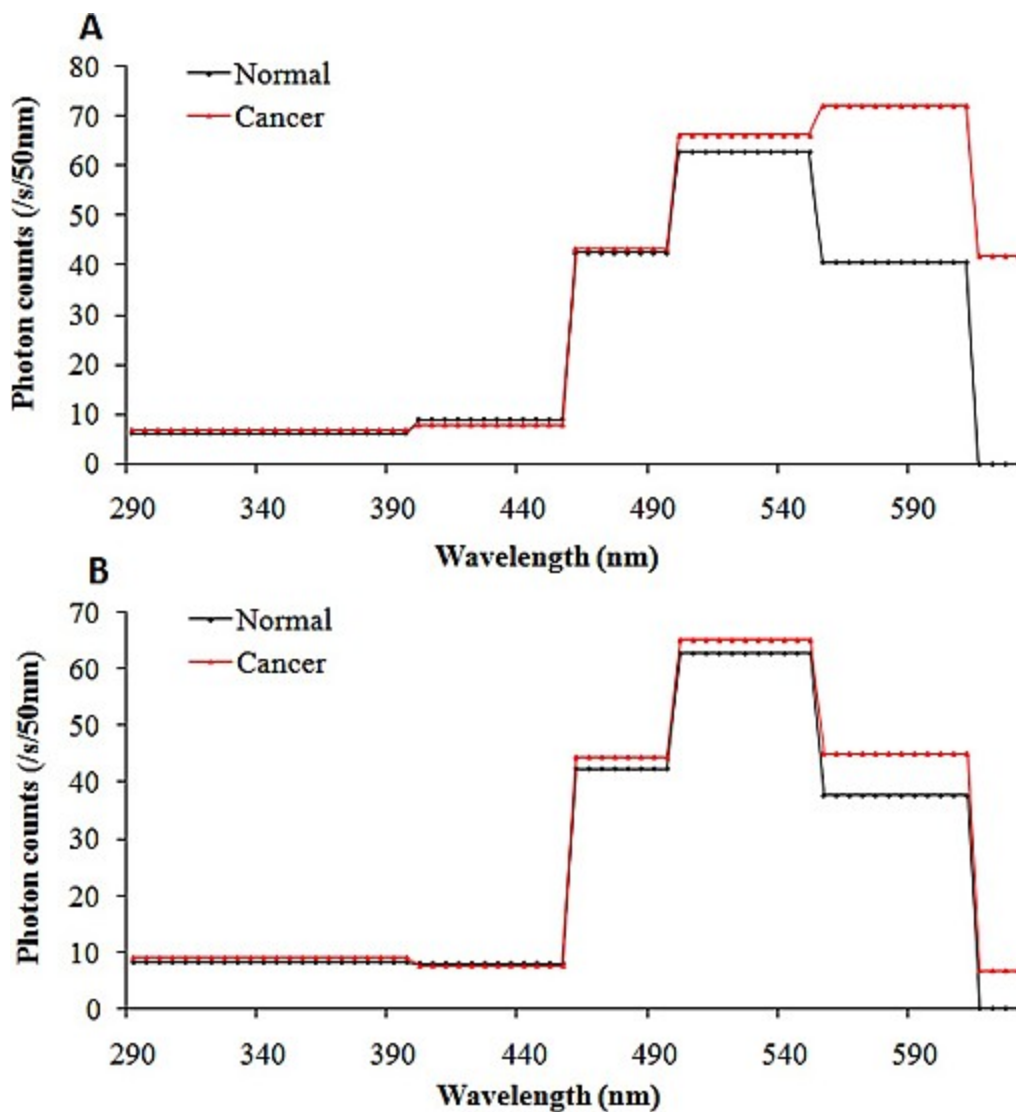
tures with that from the same side of tumor mice when tumor diameter was between 1 cm and 1.5 cm. However, compared with the spectrum displayed in Fig. 6A, the photon intensities of SPE from the tumor mice at this stage were significantly increased at 455–495 nm and 610–630 nm. Interestingly, the distribution of SPE from the left

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

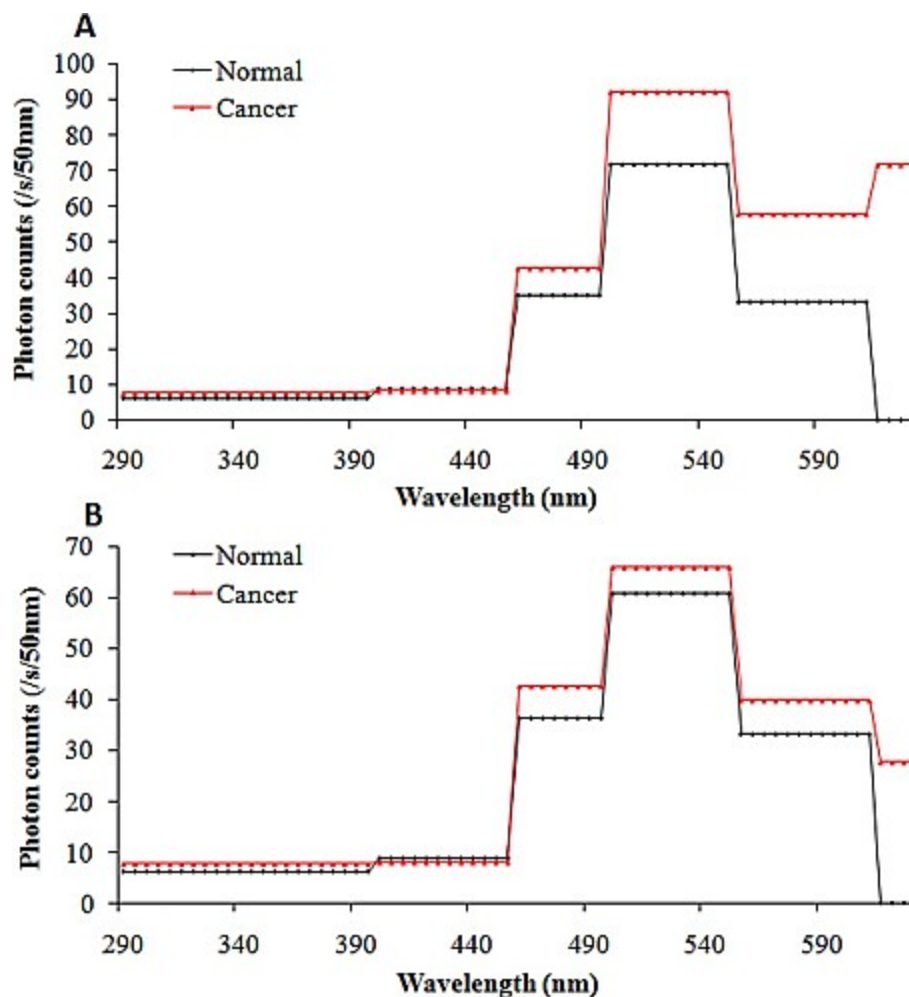
Figure 4. Spectral distribution of SPE from both sides of tumor mice and controls in the incubation period of breast cancers. **(A)** Spectral distribution on right lesion sites of tumor mice (red line) and same sites on controls (black line). **(B)** Spectral distribution on left sites, which corresponded to lesion sites of right sides of tumor mice (red line) and the same sites for controls (black line).



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figure 5. Spectral distribution of SPE from both sides of tumor mice and controls when tumor diameters were less than 0.5 cm. **(A)** Spectral distribution on right lesion sites in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line). **(B)** Spectral distribution on left sites, which corresponded to the lesion sites of right sides in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line).

side of tumor mice at this tumor stage, as shown in Fig. 7B, included a small peak that appeared at 610–630 nm, and the signals at 495–550 nm tend to increase compared to the spectrum in Fig. 6B.



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figure 6. Spectral distribution of SPE from both sides of tumor mice and controls when the tumor diameters were larger than 1 cm and less than 1.5 cm. **(A)** Spectral distribution on right lesion sites in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line). **(B)** Spectral distribution on left sites, which correspond to the lesion sites of right sides in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line).

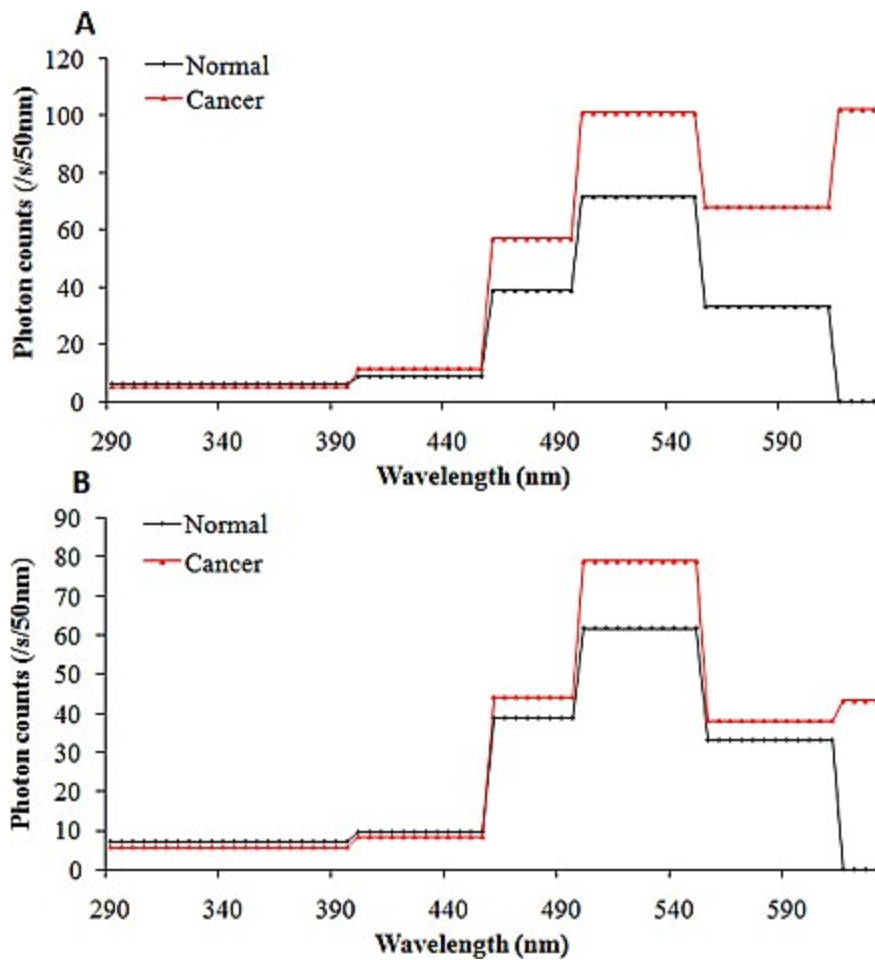
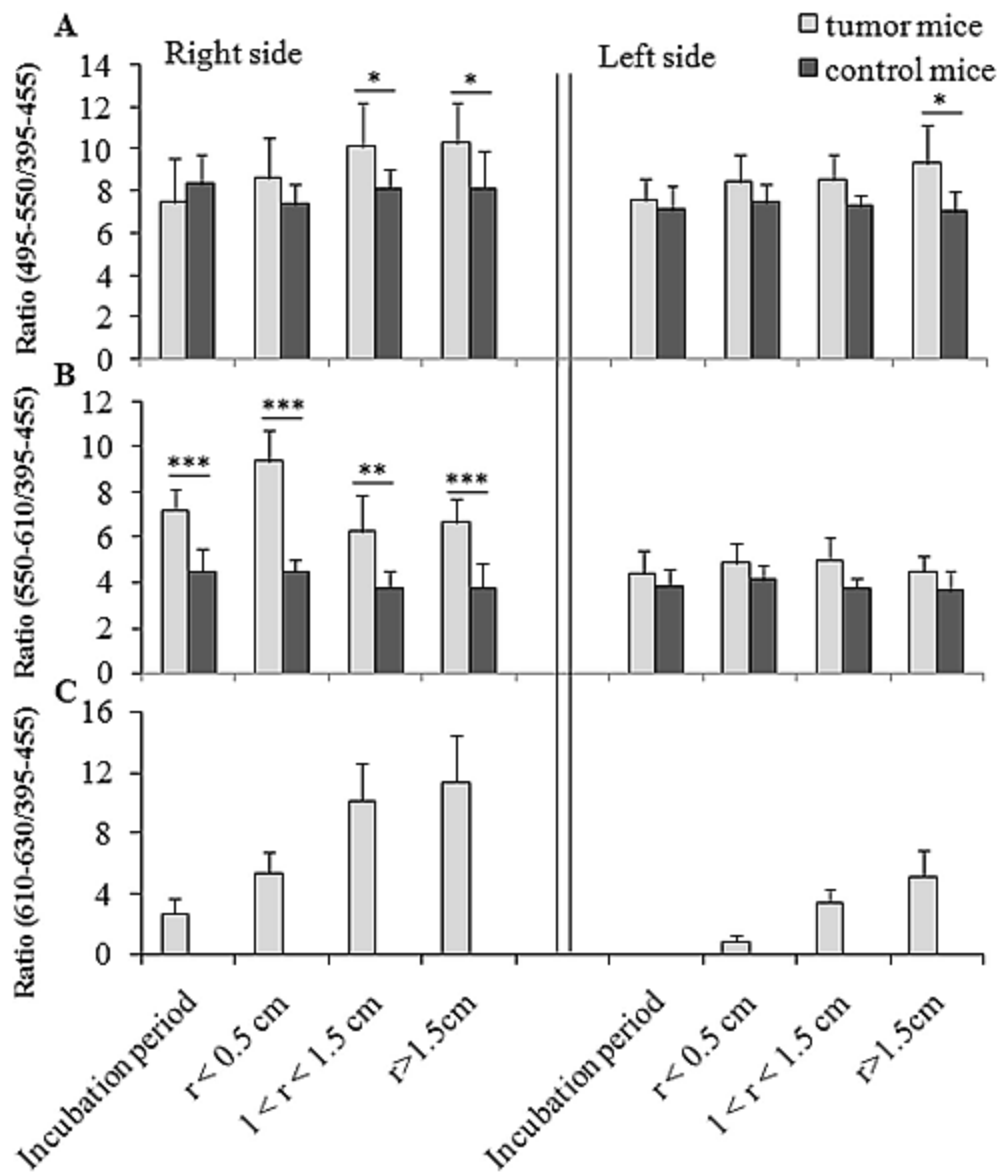


Figure 7. SPE spectrum from both sides of tumor mice and controls when tumor diameters were larger than

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1.5 cm. (A) Spectral distribution on right lesion sites in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line). (B) Spectral distribution on left sites, which corresponded to lesion sites of right sides in tumor mice (red line) and same sites in controls (black line).



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Figure 8. Ratio between various spectral components and component at 395–455 nm for tumor mice and controls at different growth stages of cancers. r , diameter of tumor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

To eliminate individual differences and obtain more accurate data for further exploration of the spectral characteristics of SPE during the tumor growth process, we calculated the ratio between various spectral components (495–550 nm, 550–610 nm, and 610–630 nm) and the component at 395–455 nm for tumor mice and controls in different cancer growth stages. The data are presented in Fig. 8.

From the results in Fig. 8, it can be concluded that the growth of cancer cells influenced the spectral distribution of SPE of the mouse body surface during the change in tumor size. The spectral components of SPE at range 550–610 nm and 610–630 nm even changed before any morphological changes at the transplantation site were visible, as shown in Fig. 8B–C. The data shown in Fig. 8A and C illustrated that, the spectral components of SPE at 495–550 nm and 610–630 nm from the healthy site (left side) of tumor mice also changed when cancers developed to a certain stage, particularly at 610–630 nm. The ratio between 610–630 nm and 395–455 nm tended to increase with increasing tumor size for both the right and left sides of the tumor mouse, as displayed in Fig. 8C, but this feature was not observed in other ratios. These differences could be used to discriminate tumor mice from healthy mice, even if tumors were not obvious and to identify the growth stages of cancers to a certain extent.

Correlation analysis between ratio (610–630/395–455 nm) and tumor volume. Following the result in Fig. 8C, we analyzed the correlation between the ratio of spectral components (610–630/395–455 nm) and tumor volume. The results are depicted in Fig. 9.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

The results displayed in Fig. 9 suggested that, the spectral ratio between the wavelength ranges 610–630 nm and 395–455 nm was positively correlated with the logarithm of tumor volume for both the right side ($R^2 = 0.947$;

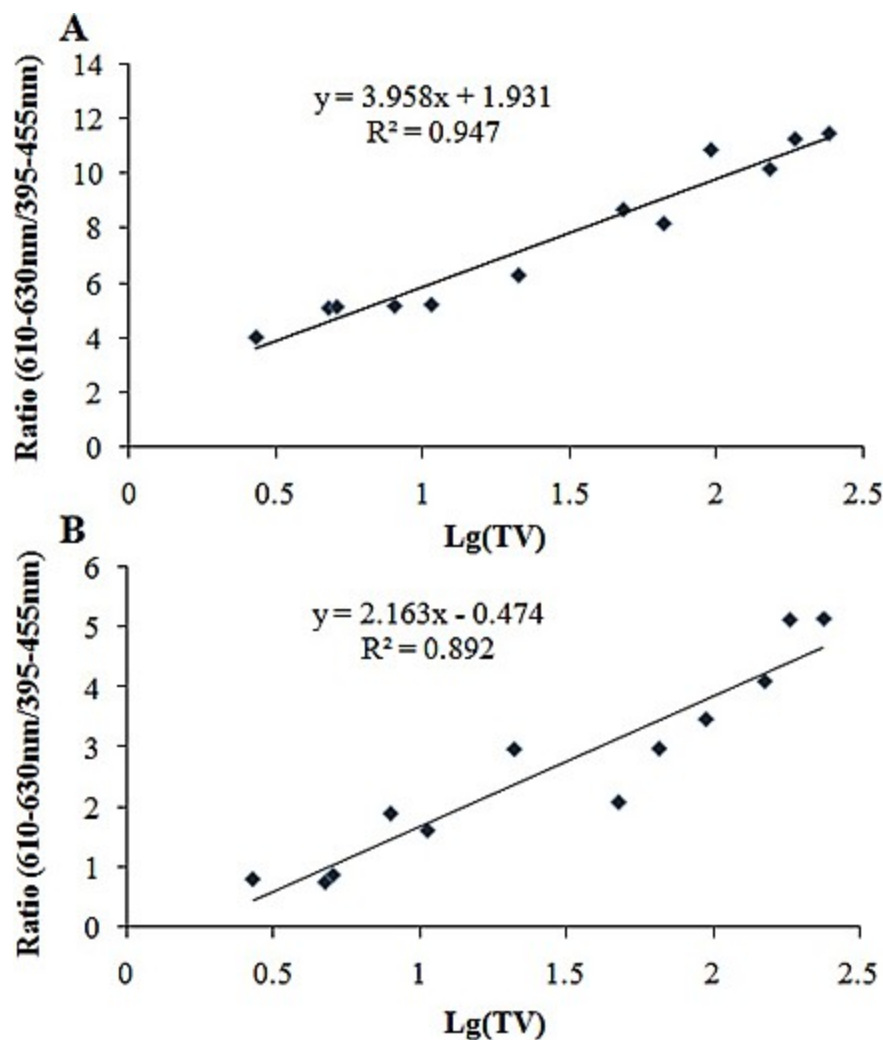


Figure 9. Correlation analysis between ratio of spectral components (610–630/395–455 nm) of SPE from right

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

(A) and left side (B) of tumor mice and their tumor volume. $\text{Lg}(TV)$, the logarithm of tumor volume; the unit is mm^3 . $P < 0.001$ for both A and B.

$p < 0.001$) and left side ($R^2 = 0.892$; $p < 0.001$) of the tumor mice, although the correlation coefficient for the left side was relatively low.

Discussion

It is known that metabolic processes are the fundamental biochemical reactions in biological system and result in the generation of ROS, which is known to play an important role in the formation of electronically excited species such as triplet carbonyls ($^3R = O^*$), excited pigments (P^*) and singlet oxygen (1O_2). SPE originates from the relaxation of these electronically excited species, and each electronically excited species can emit its energy as a photon at a particular wavelength. Photons from excited carbonyl groups have wavelengths in the near UVA and blue-green regions (350–550 nm), singlet ($^1P^*$) and triplet excited pigments ($^3P^*$) appear in the green-red (550–750 nm) and red-near IR (750–1000 nm) regions, and singlet oxygen is observed in the red (634 nm and 703 nm) and near IR (1270 nm) regions²³. In animal cells, the generation of ROS is related to enzymatic reactions in mitochondria, cytoplasm and peroxisomes, and cellular respiration in mitochondria is a major source^{37–39}. When metabolic processes change during dysplastic progression, the type and number of electronically excited species change accordingly, leading to alterations in the optical characteristics of cells, tissues and organisms. SPE detection technology that is sensitive to these alterations could be used to reflect the underlying metabolic processes in cells and monitor the physiological and pathological states of the biological systems from an optical perspective.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Unlike the normal cells, which primarily use oxidative phosphorylation as an energy source under aerobic conditions and glycolysis under anoxia, cancer cells use glycolysis as their major energy source regardless of whether oxygen levels are sufficient^{40–43}. This difference in cellular metabolism leads to changes in several related biochemical reactions, which result in changes in ROS levels of the cancer cells. Accordingly, the SPE from cancer cells differ from those of healthy cells as we described in the introduction. However, most research has focused on tumor cells or tissues, and few studies have investigated the *in vivo* characteristics of SPE from subjects with cancer.

In our previous study, we found that SPE intensity from the body surface could significantly distinguish breast cancer-bearing nude mice from controls, regardless of whether morphological changes in tumors were obvious, and SPE changed with the tumor size³⁵. In this paper, we further researched the spectral characteristics of SPE from the body surface of human breast cancer-bearing mice and healthy controls during the entire process of breast cancer growth to explore the relationship between the spectral components of SPE and the tumor stages more deeply. Our results displayed a remarkable difference in the spectral distribution of SPE between the tumor mice and controls. In the control mice, the maximum peak of the spectral distribution of SPE was 495–550 nm for both the right and left sides of the mice. In the tumor mice, the spectrum of SPE from the body surface changed with tumor stage.

For the spectrum of SPE from the tumor transplantation side of tumor mice in the incubation period of tumor, although the spectral maximum peak was still at 495–550 nm, the signal levels at 550–610 nm and 610–630 nm significantly increased ($p < 0.001$) compared to control mice. When the tumor was obvious but diameter less than

0.5 cm, the spectral maximum peak showed a substantial shift towards the red part of the spectrum from 450–

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

550 nm to 550–610 nm, also the signal levels at 610–630 nm increased. In addition, the signal levels at 495–550 nm

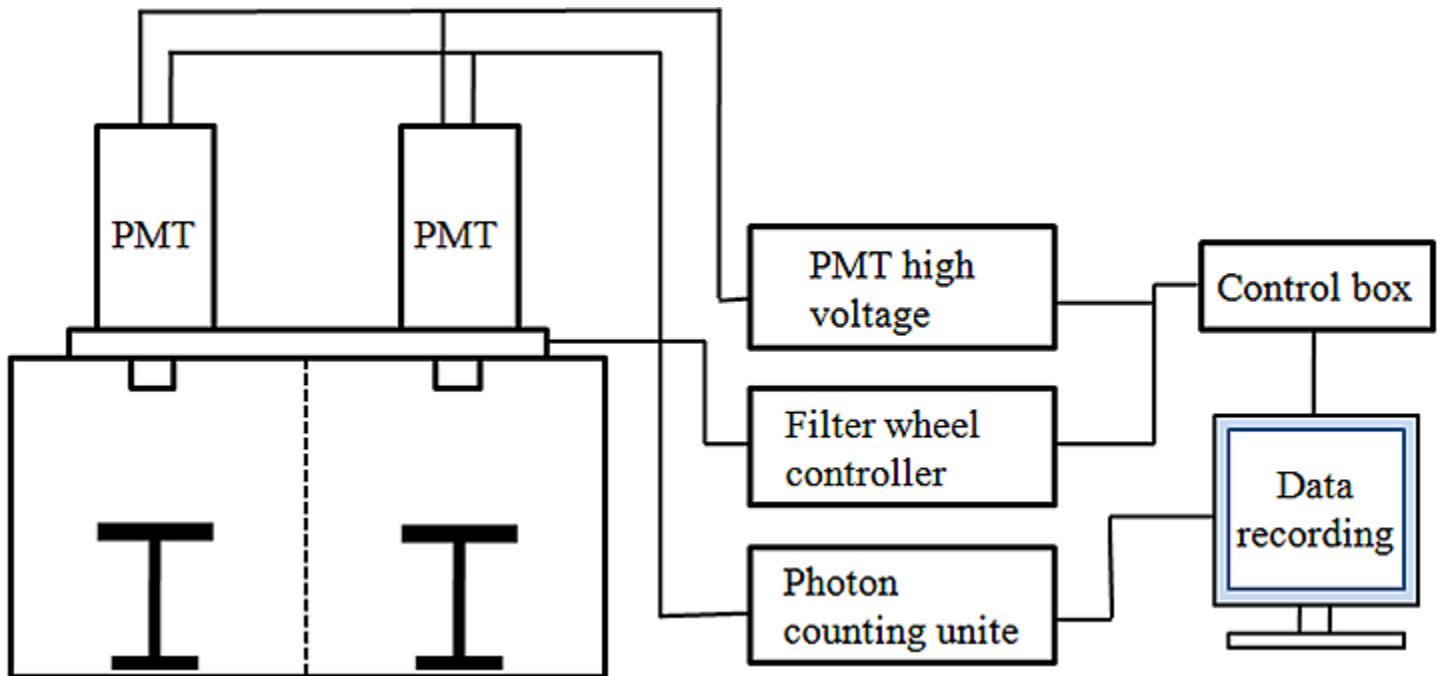


Figure 10. Schematic representation of the double-PMT SPE-detection system used in this study.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

and 610–630 nm increased even more when the tumor size further increased, and two peaks appeared in the spectrum of SPE: one at 495–550 nm, as in the controls; and another at 610–630 nm. Some researchers reported that the skin melanin might have some effects on SPE^{44,45}. Based on it, we performed a melanin analysis of skin from the nude mice using the Masson-Fontana silver staining method. We found that the skin melanin distribution in the nude mice showed negative results (see Supplementary Fig. S1). These results suggested that the skin melanin in nude mice was deficient and had no effect on SPE from the body surface of nude mice. Compared to the specific wavelength emitted by the electronically excited species, we speculated that changes in triplet excited carbonyl ($3R = O^*$), singlet excited pigment ($1P^*$) and singlet oxygen ($1O_2$), which are involved in a series of complex redox reactions, might be mainly responsible for the changes in spectral distribution of SPE from the right side of tumor mice. The increase in blood vessels at the lesion site and changes of active components in blood caused by cancers may also impact the spectral distribution of SPE, to a certain extent. In addition, with the growth of cancers, the signal intensities at 495–630 nm showed an increasing trend, especially at 610–630 nm. Although the precise mechanism by which ROS affects the spectrum of SPE is not clear, our results indicate that the spectrum of SPE is sensitive to the changes in physiological and pathological conditions of lesion site and could be used as a meaningful biophysical indicator for tumor analysis in breast cancer, even if the cancer is in its primary stage.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

For SPE from the no tumor side of tumor mice compared to controls, their spectral features were similar when the tumor diameter was less than 0.5 cm. With further tumor growth, the signal intensities at 610–630 nm subsequently increased; when the tumor diameter was larger than 1.5 cm, the SPE spectrum showed a second small peak at 610–630 nm, and the signal levels significantly increased at 495–550 nm ($p = 0.016$). These results may be related to changes in type and number of electronically excited species in blood or due to the tumor metastasis. Several researchers have demonstrated that the rate of singlet oxygen and hydrogen peroxide production was measurably higher in the plasma of breast cancer patients than in controls^{14,46}. Nevertheless, further studies are needed.

Another interesting finding in this study was that, the spectral ratio between the wavelength range 610–630 nm and 395–455 nm was positively correlated with the logarithm of the tumor volume for both the right side ($R^2 = 0.947$; $p < 0.001$) and the left side ($R^2 = 0.892$; $p < 0.001$) of the tumor mice, as showed in Fig. 9. This indicates that the spectral components of SPE from the tumor mice have a close relationship with the tumor status.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Conclusion

We reported the spectral characteristics of SPE from the body surface of human breast cancer-bearing nude mice models throughout the breast cancer growth process by using a high-sensitivity double-PMT SPE-detection system and a series of cut-off filters. Our data showed that the spectral distribution of SPE from the lesion side of the body surface of tumor mice was significantly different from that from the same side of healthy controls, regardless of whether there were visible morphological changes at the lesion site. As breast cancer developed ($1 < r < 1.5$ cm in this paper), the spectral distribution of SPE from the healthy side of the tumor mice also differed from the controls. In addition, the difference in spectrum was related with different growth states of tumors. Interestingly, there was a positive correlation between the spectral ratio (610–630/395–455 nm) and the logarithm of the tumor volume for both the right and left sides of the tumor mice. Although the precise mechanism of SPE from the body surface of nude mice has not been elucidated fully, these results indicate that the spectrum of SPE from the body surface contain abundant metabolic information and is closely related to breast cancer growth. The relationship between the ROS at the lesion site or serum at different growth stages of tumors and the spectral components of SPE from the body surface should be studied next. In our opinion, these first preliminary results are interesting. However, further data acquisition is necessary to come to the conclusion that SPE spectra might be a potential biophysical indicator for breast cancers research, particularly in their early stages.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Methods

Experimental detection system. A schematic representation of the double-PMT SPE-detection system is illustrated in Fig. 10. The main components of the detection system include two PMT (ET Enterprises, Britain, 9235QA), a high voltage power supply (Sens Tech PM20), a filter wheel and shutter system, two photon-counting units (C9744), a dark box consisting of two chambers, a control box and a computer including measuring and photon-counting software. The system was placed in a special operation room to ensure magnetic shielding.

Two PMTs sensitive in the spectral of 290–630 nm were installed on the top of the two chambers of the dark box. In front of the PMT, a filter wheel system was placed. Spectral analysis was performed using a set of filters (Schott Glaswerke AG, Main, Germany) with cut-off wavelengths at 395 nm, 455 nm, 495 nm, 550 nm and 610 nm, respectively. In addition to the above filters, one opening without filter was included in the filter wheel. The quantum efficiencies of the PMT for different spectral bands were 27% (290–395 nm), 23% (395–455 nm), 15% (455–495 nm), 6% (495–550 nm), 3% (550–610 nm) and 2% (610–630 nm).

To position the mice and ensure that the distance between the detection site and the PMT window was the same (1.0 cm) for all measurements, a sample holder with adjustable height was placed in each chamber of the dark box. The special design of two chambers and two PMT in a single dark box allowed us to measure two mice simultaneously. Temperature in the operation room was controlled at 25 ± 1 °C.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Cell lines. The human breast cancer cell line MDA-MB-231 used in this study was purchased from the cell bank of the Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Sciences. The cells were cultured in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 10% FBS, and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air as a monolayer culture in plastic culture plates (100 mm diameter). The cells were routinely subcultured when 80% confluence was reached.

Subcutaneous xenograft transplantation. Forty female BALB/C nude mice (5 weeks old) were obtained from the Beijing HFK Bioscience Company and were randomized into three groups: normal group, n = 5; control group, n = 10; and experiment group, n = 25. The MDA-MB-231 cells with good growth were trypsinized and suspended in physiological saline. In the experimental group, a total of 5×10^6 cells in 0.15 mL of physiological saline were injected subcutaneously into the right axillary of each nude mouse after one week of acclimation. For the control mice, their right axillary was injected with 0.15 mL of physiological saline only. The normal mice remained free from any injections. After injection, the mice were kept in a pathogen-free isolation facility under a 12-h light/dark cycle at 22–24 °C and 50% humidity with food and water available ad libitum. The animal studies were approved by the Animal Care and Ethics Committee of Department of Medicine and Life Sciences at the Shandong Academy of Medical Science and performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Measurement method. Each test was conducted between 2 p.m. and 4 p.m. to reduce the influence of diurnal rhythms⁴⁷. To ensure the consistency of the experiment, the following protocol was observed for all measurements. **a):** Mice were weighted and anesthetized using 7% pentobarbital sodium (70 mg/kg) to keep animals in exactly the same position during measurement. After injection, the mice were held in a cage for 5 min, and then placed in a completely dark room with controlled temperature (25 ± 1 °C) and humidity (50%) 20 min before the start of the measurement to eliminate the influence of external light. **b):** The empty chamber signals (BG) without and with filters in a sequence from 395 nm to 610 nm in both PMT were measured for 3 min at intervals of 1 s before measuring the mice to ensure the detection performance of the experimental system and for follow-up data analysis. **c):** Subsequently, two pretreated mice were placed on the two sample holders in different chambers, respectively. In this way, we gained signals from two mice, synchronously. The signals from the tumor transplantation site on the right sides of the two mice and the same site on the left sides were sequentially recorded. The duration for each filter was 3 min, with an interval time of 1 s, and the recording time for each side of a mouse with a full set of filters took approximately 18 min; roughly 40 min was required for a complete measurement. The next measurement was performed immediately thereafter. **d):** Finally, the BG without and with filters was measured again. It should be emphasized that despite the small difference between the two PMTs, our experimental data showed that the difference in the signals obtained by the two PMT from the same mouse were not significant.

Measurement of tumor transplantation sites began when the breast cancer cells were in the incubation period,

and measurements were performed twice per week until tumors were obvious (as shown in Fig. 2).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Data analysis. Statistical analysis of the data was performed with SPSS 18.0 (SPSS, USA). The differences were considered significant at $p < 0.05$. Data calculations and graphing were performed using Origin 9.1. Pearson correlation analysis was used to evaluate the correlation between SPE and the tumor volume (TV), and the TV was calculated by the following formula: $TV = 1/2ab^2$, where “a” represents the length of the tumor and “b” represents the width of it.

Data Availability. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*. **65**, 87–108, <https://doi.org/10.3322/caac.21262> (2015).
1. Kala, S., Pantola, C., Agarwal, A., Pradhan, A. & Thakur, S. Optical spectroscopy: A promising diagnostic tool for breast lesions. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*. **5**, 1574–1577 (2011).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Carney, P. A. *et al.* Likelihood of additional work-up among women undergoing routine screening mammography: the impact of age, breast density, and hormone therapy use. *Prev Med.* **39**, 48–55, <https://doi.org/10.1016/j.yjmed.2004.02.025> (2004).
 2. Hata, T. *et al.* Magnetic resonance imaging for preoperative evaluation of breast cancer: a comparative study with mammography and ultrasonography. *J Am Coll Surg.* **198**, 190–197, <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2003.10.008> (2004).
 3. Hindle, W. H., Davis, L. & Wright, D. Clinical value of mammography for symptomatic women 35 years of age and younger. *Am J Obstet Gynecol.* **180**, 1484–1490 (1999).
 4. Ostrander, J. H. *et al.* Optical Redox Ratio Differentiates Breast Cancer Cell Lines Based on Estrogen Receptor Status. *Cancer Res.* **70**, 4759–4766, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2572> (2010).
-
1. Ríos-Arrabal, S. *et al.* Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus.* **2**, 404, <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-404> (2013).
 2. Klaunig, J. E. & Kamendulis, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives.* **106**(Suppl 1), 289 (2004).
 3. Mori, K., Shibamura, M. & Nose, K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **64**, 7464–7472, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1725> (2004).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Pervin, S. *et al.* Oxidative stress specifically downregulates survivin to promote breast tumour formation. *Br J Cancer*. **108**, 848–858, <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.40> (2013).
2. Laurent, A. *et al.* Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res*. **65**, 948–956 (2005).
3. Ph.D, E. M. Vd. C. *et al.* Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients. *Cancer*. **94**, 3247–3251, <https://doi.org/10.1002/cncr.10611> (2002).
4. Pande, D., Negi, R., Khanna, S., Khanna, R. & Khanna, H. D. Vascular endothelial growth factor levels in relation to oxidative damage and antioxidant status in patients with breast cancer. *J Breast Cancer*. **14**, 181–184, <https://doi.org/10.4048/jbc.2011.14.3.181> (2011).
5. Vera-Ramirez, L. *et al.* Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. *Biological bases to develop oxidative-based therapies. Crit Rev Oncol Hematol*. **80**, 347–368, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.01.004> (2011).
6. Artachocordón, A., Artachocordón, F., Ríosarrabal, S., Calvente, I. & Núñez, M. I. Tumor microenvironment and breast cancer progression: a complex scenario. *Cancer Biol Ther*. **13**, 14–24, <https://doi.org/10.4161/cbt.13.1.18869> (2012).
7. Sener, D. E., Gönenç, A., Akinci, M. & Torun, M. Lipid peroxidation and total antioxidant status in patients with breast cancer. *Cell Biochem Funct*. **25**, 377–382, <https://doi.org/10.1002/cbf.1308> (2007).
8. Ives, J. A. *et al.* Ultraweak photon emission as a non-invasive health assessment: a systematic review. *Plos One*. **9**, e87401, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087401> (2014).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Kim, H. W. *et al.* Spontaneous photon emission and delayed luminescence of two types of human lung cancer tissues: Adenocarcinoma and Squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **229**, 283–289, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.038> (2005).
 2. Takeda, M. *et al.* Biophoton detection as a novel technique for cancer imaging. *Cancer Sci.* **95**, 656–661 (2004).
 3. Zhao, X. *et al.* Application of Spontaneous Photon Emission in the Growth Ages and Varieties Screening of Fresh Chinese Herbal Medicines. *Evid Based Complement Alternat Med* **2058120**, 31, <https://doi.org/10.1155/2017/2058120> (2017).
 4. Van, W. R., Van Wijk, E. P., Wiegant, F. A. & Ives, J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol.* **46**, 273–309 (2008).
 5. Prasad, A. & Pospíšil, P. Towards the two-dimensional imaging of spontaneous ultra-weak photon emission from microbial, plant and animal cells. *Sci Rep.* **3**, 1211, <https://doi.org/10.1038/srep01211> (2013).
 6. Pospíšil, P., Prasad, A. & Rác, M. Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. *J Photochem Photobiol B.* **139**, 11–23, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.02.008> (2014).
 7. Rác, M. *et al.* Oxidative damage of U937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. *PLoS One.* **10**, e0116958, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116958>. eCollection 2015 (2015).
 8. Kato, K. *et al.* Application of ultra-weak photon emission measurements in agriculture. *J Photochem Photobiol B.* **139**, 54–62, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.010> (2014).
1. Hossu, M., Ma, L. & Chen, W. Nonlinear enhancement of spontaneous biophoton emission of sweet potato by silver nanoparticles. *J Photochem Photobiol B.* **99**, 44–48, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.02.002> (2010).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Ives, J. A. *et al.* Ultraweak photon emission as a non-invasive health assessment: a systematic review. *Plos One*. **9**, e87401, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087401>. eCollection 2014.
2. Yang, M. *et al.* Spectral discrimination between healthy people and cold patients using spontaneous photon emission. *Biomed Opt Express*. **6**, 1331–1339, <https://doi.org/10.1364/BOE.6.001331> (2015).
3. van Wijk, E., Kobayashi, M., van Wijk, R. & van der Greef, J. Imaging of ultra-weak photon emission in a rheumatoid arthritis mouse model. *PLoS One*. 884579, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084579>. eCollection 2013 (2013).
4. Bustamante, J., Guerra, L., Bredston, L., Mordoh, J. & Boveris, A. Melanin content and hydroperoxide metabolism in human melanoma cells. *Exp cell res*. **196**, 172–176 (1991).
5. Takeda, M. *et al.* A novel method of assessing carcinoma cell proliferation by biophoton emission. *Cancer Lett*. **127**, 155–160 (1998).
6. Rác, M., Sedlářová, M. & Pospíšil, P. The formation of electronically excited species in the human multiple myeloma cell suspension.

Sci Rep. **5**, 8882, <https://doi.org/10.1038/srep08882> (2015).

1. Chen, P. *et al.* Spectral discrimination between normal and leukemic human sera using delayed luminescence. *Biomed Opt Express*.

3, 1787–1792, <https://doi.org/10.1364/BOE.3.001787> (2012).

1. Kim, J. *et al.* Scanning spontaneous photon emission from transplanted ovarian tumor of mice using a photomultiplier tube.

Electromagn Biol Med. **25**, 97–102, <https://doi.org/10.1080/15368370600719000> (2006).

1. Zhao, X. *et al.* Spontaneous photon emission: A promising non-invasive diagnostic tool for breast cancer. *J Photochem Photobiol B*.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

166, 232–238, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.009> (2016).

1. Wijk, E. P. & Wijk, R. V. M.-S. Recording and Spectral Analysis of Spontaneous Photon Emission from Human Body. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* **12**, 96–106, <https://doi.org/10.1159/000083935> (2005).
2. Han, D., Williams, E. & Cadenas, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J.* **353**, 411–416 (2001).
3. Bylund, J., Björnsdottir, H., Sundqvist, M., Karlsson, A. & Dahlgren, C. Measurement of Respiratory Burst Products, Released or Retained, During Activation of Professional Phagocytes. *Methods Mol Biol.* **1124**, 321–338, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-845-4_21 (2014).
4. Burgos, R. C. R. *et al.* Ultra-weak photon emission as a dynamic tool for monitoring oxidative stress metabolism. *Sci Rep.* **7**, 1229, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01229-x> (2017).
5. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* **123**, 309–314 (1956).
6. Yang, D. Q. *et al.* Measuring relative utilization of aerobic glycolysis in breast cancer cells by positional isotopic discrimination. *FEBS Lett.* **590**, 3179–3187, <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12360> (2016).
7. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* **324**, 1029–1033, <https://doi.org/10.1126/science.1160809> (2009).
8. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* **134**, 703–707, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021> (2008).

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

1. Kobayashi, M., Iwasa, T. & Tada, M. Polychromatic spectral pattern analysis of ultra-weak photon emissions from a human body. *J Photochem Photobiol B*. **159**, 186–90, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.037> (2016).
2. Ou-Yang, H., Stamatas, G. & Kollias, N. Dermal contributions to UVA-induced oxidative stress in skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. **25**, 65–70, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2009.00403.x> (2009).
3. Ray, G. *et al.* Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. **59**, 163–170

(2000).

1. Wijk, E. P. A. V., Wijk, R. V. & Cifra, M. Spontaneous ultra-weak photon emission from human hands varies diurnally. *Biophotonics Optics in Life Science*. **6633**, <https://doi.org/10.1117/12.727672> (2007).

Acknowledgements

This work is funded by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81273997), Ministry of Science and Technology of China (2014DFA30380) and Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2015HQ016). We thank all the individuals who participated in these studies and all the researchers, technicians and administrative staff who have enabled this work. We would like to acknowledge Dr. Eduard Van Wijk (Meluna Research) and Dr. Yu Yan (Meluna Research) for the construction of the equipment and technical assistance.

Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

Author Contributions

X.L.Z. and J.X.H. conceived and designed the study. X.L.Z., M.N.Y., Van Wijk E., and J.X.P. performed the statistical analyses and helped in selecting the data analysis methods. H.F., Y.L.L., L.W.Z. and W.Y. were involved in treatment of nude mice, collection and assembly of data. X.L.Z. was responsible for drafting the manuscript. All authors (X.L.Z., Van Wijk E., M.N.Y., Y.W., J.X.P., Y.L.L., H.F., L.W.Z. and J.X.H.) contributed to the interpretation of the results and critically reviewed the first draft of the manuscript; they all read and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13516-8>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or



Spettro di emissione di fotoni spontanei come promettente indicatore biofisico per la ricerca sul cancro al seno

format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017