

Dosage à haut débit de la prolifération de cellules en culture primaire : validation et application du kit « CyQuant® NF » aux cellules de nageoires de poisson rouge

Nathalie Chênais, Catherine Labbé

Résumé

L'utilisation du kit CyQuant® NF pour des comptages cellulaires à haut débit et pour des mesures de proliférations a été testée sur des cellules de nageoires de poisson rouge issues de culture primaire, comme une alternative aux lourds comptages manuels sur cellules de Malassez. Nous montrons que le dosage présente, pour nos cellules, une très bonne répétabilité intra et interdosage. Une forte corrélation linéaire ($r^2 = 0,999$) est obtenue entre le nombre de cellules par puits et l'intensité de fluorescence du CyQuant® lié à l'ADN des cellules. L'établissement d'une équation basée sur un grand nombre de données permet une traduction rapide du signal CyQuant® en concentration de cellules. Le dosage est également applicable à l'étude de la prolifération des cellules de nageoires en microplaque si les densités d'ensemencement initiales sont comprises entre 20 000 et 35 000 cellules par puits. En conclusion, le dosage CyQuant® NF représente un outil idéal pour réaliser des comptages de routine de grandes séries d'échantillons et des mesures d'activité proliférative sur des cultures primaires de cellules de poisson.

Mots clés : numération cellulaire, prolifération, contenu d'ADN, fluorescence, cellules de nageoires

Introduction

Le comptage cellulaire demeure un outil d'importance fondamentale en recherche scientifique en permettant notamment d'apprécier un niveau de prolifération cellulaire. Ainsi, la majorité des expérimentations réalisées sur cultures de cellules nécessitent une étape de comptage de la population cellulaire. Cette dernière se fait le plus souvent manuellement sur cellules de Malassez en association avec une coloration au bleu de trypan permettant de discriminer cellules vivantes de cellules mortes (Freshney, 1987 ; Lee *et al.*, 2008). Cette façon de procéder reste cependant longue et fastidieuse surtout lorsqu'elle s'applique à de grandes séries d'échantillons.

Pour pallier cette lourdeur expérimentale et réaliser des numérations à haut débit, de nombreux dosages de prolifération cellulaire sont répertoriés dans la littérature (Jiang *et al.*, 2008; Bopp *et Letieri* 2008; Quent *et al.*, 2010). Certains estiment le nombre de cellules par l'activité métabolique cellulaire comme le kit MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), AlamarBlue®, par la synthèse d'ADN après incorporation de nucléotide modifié (BrdU, [³H]-thymidine) ou par la mesure du contenu d'ADN cellulaire (Hoechst 33258, SYBR green, PicoGreen).

Notre choix s'est porté sur un kit basé sur ce dernier principe, le kit CyQuant® Cell Proliferation Assay commercialisé par Invitrogen.

Le colorant utilisé, le CyQuant®, représente un fluorochrome de choix pour mesurer des petites quantités d'ADN et détecter la croissance de cellules de culture primaire de faible activité mitotique (Quent *et al.*, 2010) ce qui est le cas de notre modèle cellulaire dont le cycle mitotique est de 42h. De par sa simplicité, sa rapidité d'exécution et son automatisation en microplaques 96 puits, ce kit nous a paru de plus être le plus pertinent à tester sur notre modèle cellulaire pour réaliser des comptages de routine et des mesures de prolifération en format microplaque.

La version CyQuant® NF du kit a été choisie par rapport à la version originale CyQuant® GR pour sa plus grande rapidité d'exécution, car elle évite l'étape de lyse cellulaire grâce à un agent de perméabilisation des membranes plasmiques.

Si de nombreuses lignées cellulaires issues de différentes espèces mammaliennes (humaine, murine, canine) ont été testées, seule une lignée cellulaire chez le poisson « CHSE, Chinook salmon embryo cells » a été analysée de manière fiable avec la procédure CyQuant® GR (Jones *et al.*, 2001). Le dosage CyQuant® NF, quant à lui a été testé par le fabricant sur différents types cellulaire : cellules HeLa, hepG2, 3T3 et CHO (M1WT3) mais néanmoins il reste peu cité dans la littérature en dehors de lignées cellulaires humaines (Chen *et al.*, 2010, Prudnikowa *et al.*, 2010, Liao *et al.*, 2011). Il n'est fait référence à aucune lignée poisson pour cette version améliorée du kit, et aucune information n'est donnée sur la validité de ce kit pour des cultures primaires de poisson.

L'objectif de ce travail est de valider l'utilisation *in vitro* du kit CyQuant® NF sur notre modèle de cellules de poisson rouge (*Carassius auratus*) dérivées, non pas de lignées cellulaires, mais de culture primaire d'explants de nageoire. L'enjeu est de montrer que le CyQuant® NF représente un outil utilisable en routine dans notre laboratoire pour des comptages et des mesures à haut débit de prolifération de cellules de nageoire. Nous avons dans un premier temps testé la fiabilité du kit CyQuant® NF sur cellules de nageoires issues de culture primaire et repiquées pour comptage en plaques 96 puits. L'application possible des conditions du kit à ces cellules a été analysée en vérifiant la sensibilité du kit, la linéarité et la répétabilité intra et interdosage des valeurs données par le kit. Dans un second temps, l'application du kit CyQuant® NF à l'étude de la prolifération des cellules de nageoires a été testée après 5 jours de culture. Pour ce faire, il a été nécessaire de tester différentes densités d'ensemencement de façon à définir la densité d'ensemencement optimale garantissant un gain de prolifération cellulaire maximal en microplaques 96 puits.

1. Matériels et méthodes

1.1 Les poissons et le prélèvement des nageoires

La souche de poisson rouge utilisée pour cette étude provient des étangs de l'unité expérimentale U3E (Inra, Rennes). Quelques semaines avant les prélèvements, les poissons âgés de 2 ans ont été transférés dans des bassins de 1 m³ en circuit fermé au sein des installations expérimentales de l'unité Inra-Scribe de Rennes. Les poissons ont été maintenus sous photopériode estivale (16h jour/8h nuit) à une température régulée à 14°C.

Les prélèvements des nageoires caudales ont été réalisés sur animaux euthanasiés, en condition non stérile, par une personne détentrice d'un agrément de manipulation des animaux (n°78-25) délivré par la Direction des services vétérinaires. Dans le cas de petits poissons (taille inférieure à 10 cm), les nageoires de deux individus sont

mélangées et considérées comme un seul échantillon donnant lieu, après culture primaire, à une seule préparation cellulaire. Dans le cas contraire, chaque nageoire est traitée individuellement et donnera lieu à la production d'une préparation cellulaire. Au total six préparations cellulaires différentes, issues de culture primaire, ont été testées par le kit CyQuant® NF.

1.2 La culture primaire des explants de nageoires

Suite aux prélèvements, les nageoires sont essuyées, rincées plusieurs fois puis coupées en explants de 3mm². Les explants sont déposés en plaque 12 puits à raison d'une dizaine d'explants environ par puits, et le milieu de culture est ajouté progressivement (Moritz et Labbé, 2008). Brièvement, la culture primaire est réalisée avec le milieu de culture Leibovitz L15 (Sigma L5520) supplémenté en Hepes 5 mM et bicarbonate 2 mM, de pression osmotique fixée à 293 mOsmol/l et de pH 7.3, à 25°C sous air (sans CO₂ ajouté). Au cours des 3 premiers jours, les boîtes de culture sont conservées sous atmosphère humide afin d'éviter l'augmentation de la pression osmotique dans les puits tant que la totalité du milieu (1,5 mL) n'a pas été ajoutée.

1.3 Ensemencement des cellules en microplaque 96 puits

Les cellules issues de chaque culture primaire sont récupérées par digestion douce à la trypsine entre le 20^e et le 23^e jour de culture puis dénombrées sur cellule de Malassez (Freshney, 1987). L'ensemencement en plaques 96 puits est réalisé en présence de L15 additionné d'Hepes et de bicarbonates de sodium à des concentrations supérieures à celles utilisées en culture primaire (respectivement 20 mM et 4 mM). Pour chaque préparation cellulaire, les ensemencements ont été réalisés en quadruplicats dans des puits préalablement traités à la Poly-L-Lysine (Sigma, 50 µg / mL ; traitement recommandé par le fabricant du kit pour favoriser l'adhésion des cellules au support plastique). Différentes densités d'ensemencement ont été testées (de 100 à 35 000 cellules par puits, voir §1.5).

1.4 Le dosage CyQuant® NF : protocole, révélation et quantification du signal fluorescent

Un temps minimum d'adhésion de 4 h est recommandé par le fabricant du kit. Nous avons vérifié au microscope qu'après 4 h d'incubation, les cellules de nageoire présentaient toutes une bonne adhésion au support, et qu'aucune n'était retrouvée en suspension dans le milieu. A l'issue de cette étape d'adhésion de 4 h (J0+4h), le milieu de culture de chaque puits (280 µL) est aspiré dans sa totalité et remplacé par 100 µL du mélange des composés du kit (CyQuant® NF, Invitrogen, ref. C35006) préparé extemporanément dans les proportions suivantes : 22 µL du réactif A contenant le CyQuant® NF combiné à un agent de perméabilisation de membrane plasmique pour 11 mL de tampon 1X HBSS. La durée d'incubation des cellules avec le réactif est de 30 min à 37°C, temps permettant la perméabilisation de la membrane plasmique et la liaison du CyQuant® à l'ADN.

L'intensité du signal fluorescent de chaque puits est mesurée directement à l'aide d'un lecteur de plaques (lecteur BioTek Synergy 2) équipé de filtres fluorescents standard (excitation à 485 nm et émission à 530 nm). La sensibilité du lecteur a été fixée à 45 pour l'ensemble des dosages du fait qu'elle n'amène à aucune saturation du signal fluorescent même à forte densité et après 5 jours de culture (donnée non montrée). Pour chaque puits, le signal fluorescent obtenu est automatiquement soustrait de la valeur

moyenne des puits sans cellules (blancs). Les résultats individuels sont ensuite exprimés par la moyenne \pm écart-type de chaque quadruplicat.

1.5 Plan expérimental

1.5a Linéarité du dosage

La linéarité a été vérifiée sur six préparations cellulaires différentes. Pour chacune d'entre elles, des dilutions successives ont été réalisées de façon à ensemercer les puits à des densités croissantes de 100-500-1000-2000-5000-10 000-20 000-35 000 cellules par puits (de surface 0,33 cm²). La densité maximale d'ensemencement correspond à celle utilisée en routine pour ces cellules en plaque 24 puits (200 000 cellules par puits de surface 1,9 cm²). La relation entre l'intensité de fluorescence et le nombre de cellules par puits a été analysée : une droite de corrélation linéaire a été établie pour chaque préparation cellulaire.

1.5b Répétabilité intradosage

La répétabilité intradosage a été étudiée en analysant la qualité des quadruplicats de différents échantillons à différentes densités cellulaires. Pour chacun des quadruplicats, le coefficient de variation a été calculé. Ce dernier représente le rapport de l'écartype des quadruplicats sur la moyenne des intensités de fluorescence. Un coefficient de variation élevé rendra compte d'une mauvaise répétabilité intradosage. Pour en faciliter la lecture, ce coefficient sera exprimé ici en pourcentage de la moyenne des replicats.

1.5c Répétabilité interdosage

La répétabilité interdosage a été déterminée en analysant la même préparation cellulaire dans trois dosages indépendants. Pour cela, un ensemencement de la même préparation cellulaire aux densités de 5000 et 35 000 cellules par puits a été effectué dans trois plaques 96 puits différentes, et la révélation a été faite avec trois préparations de réactif indépendantes. La procédure a été répétée pour trois préparations cellulaires distinctes. Pour chaque préparation cellulaire, la moyenne et écart type des valeurs données dans les trois dosages indépendants sont calculés, et le coefficient de variation déterminé.

1.5d Application du dosage CyQuant® NF après 5 jours de culture : choix de la densité d'ensemencement optimale

Six préparations cellulaires ont fait l'objet d'un ensemencement en quadruplicats à des densités croissantes (de 500 à 35 000 cellules par puits) sur deux plaques 96 puits : l'une arrêtée à J0+4h et l'autre après 5 jours de culture (J5). Par préparation cellulaire et pour chacune des densités testées, les intensités de fluorescence des échantillons ont été mesurées à ces deux temps. Une expression des valeurs de fluorescence à J5 par un rapport des valeurs à J0+4h [$(I_{J5}/I_{J0+4h}) \times 100$], appelé rapport J5/J0, a permis d'estimer la capacité proliférative de chaque préparation cellulaire après une culture de 5 jours. Tout rapport supérieur à 100% a été considéré comme le signe d'un gain de prolifération cellulaire. Les moyennes des gains obtenues pour chaque densité cellulaire ont été comparées deux à deux par le test statistique de Student de façon à statuer sur la densité d'ensemencement la plus favorable à la prolifération. Les différences significatives ont été déterminées au seuil $p < 0,05$.

2. Résultats et discussion

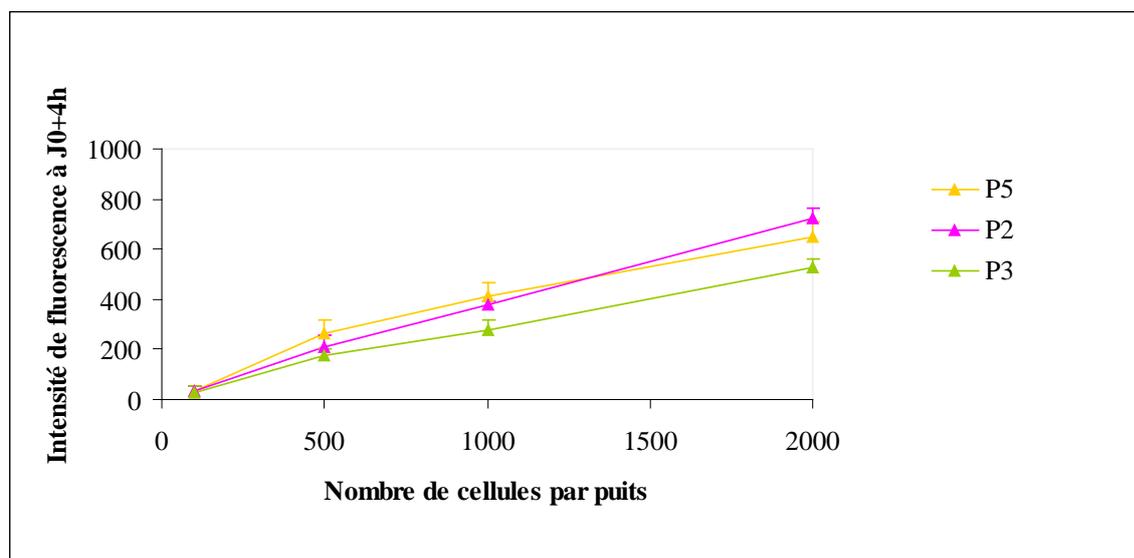
2.1 Linéarité du dosage

L'objectif de cette analyse était de vérifier que des densités croissantes d'ensemencement induisaient bien une augmentation proportionnelle du signal fluorescent, la qualité de la relation étant approchée par le coefficient de corrélation correspondant. Nous voulions également déterminer quelle densité cellulaire minimale était détectable dans nos conditions.

La **Figure 1** montre l'influence de la densité cellulaire sur l'intensité de fluorescence lue à J0+4h. Pour ce qui est de la densité d'ensemencement 100 cellules par puits, nous observons sur les trois préparations cellulaires testées un signal fluorescent dont l'intensité moyenne n'est pas significativement différente du blanc (**Figure 1A**). En revanche, l'intensité de fluorescence détectée devient significative à partir de 500 cellules par puits. Elle augmente ensuite de façon proportionnelle à la densité cellulaire d'ensemencement pour atteindre une valeur maximale à 35 000 cellules par puits quelles que soient les préparations cellulaires (**Figure 1B**). Pour les six préparations cellulaires, l'augmentation de fluorescence est similaire, même si des différences d'intensité à une densité donnée sont observées entre préparations (**Figure 1B**). Ces différences mineures sont vraisemblablement liées à des petites variations dans le comptage déterminant les concentrations des suspensions cellulaires initiales. Il n'en reste pas moins que le coefficient de corrélation r entre les intensités de fluorescence et la densité d'ensemencement est élevé pour les six préparations cellulaires (valeurs comprises entre 0.989 et 0.999), ce qui indique que la relation entre nombre de cellules et intensité de fluorescence est totalement fiable sur plusieurs échantillons d'origine différente. De même, le coefficient calculé sur les valeurs d'intensité moyennes des 6 préparations cellulaires est proche de 1 ($r = 0,999$, **Figure 2**). La détermination de l'équation à partir des six préparations cellulaires différentes, validée par ce coefficient de corrélation élevé, nous permet alors d'obtenir un outil de quantification pouvant servir de références pour des comptages de routine.

Ces résultats démontrent que vis-à-vis de notre modèle cellulaire, le dosage CyQuant® NF est sensible dès 500 cellules par puits et qu'il est linéaire au moins jusqu'à 35 000 cellules par puits. Pour les plus faibles densités, le dosage paraît, dans nos conditions, être peu informatif. Ces résultats sont compatibles avec ceux du fabricant à l'exception près des basses densités pour lesquelles il est montré une détection fiable d'un signal fluorescent dès 100 voire 20 cellules pour certaines lignées cellulaires, notamment la lignée CHO. La raison de cette différence pourrait peut-être s'expliquer par une quantité d'ADN moindre dans nos cellules de poisson que dans les cellules mammaliennes.

A



B

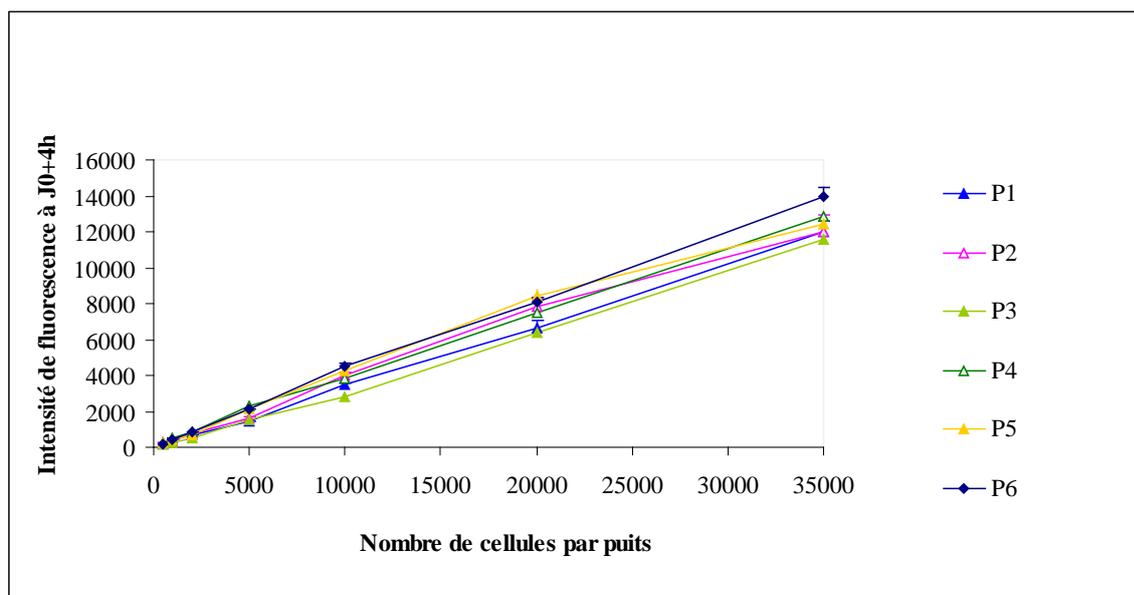


Figure 1. Analyse de l'évolution des intensités de fluorescence en fonction du nombre de cellules par puits (A) sur l'intervalle [100 à 2000] (B) sur l'intervalle [100 à 35 000]. Chaque courbe représente des préparations cellulaires distinctes (P1 à P6). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm écartype des quadruplicats. Le dosage est réalisé 4h après l'ensemencement (J0+4h).

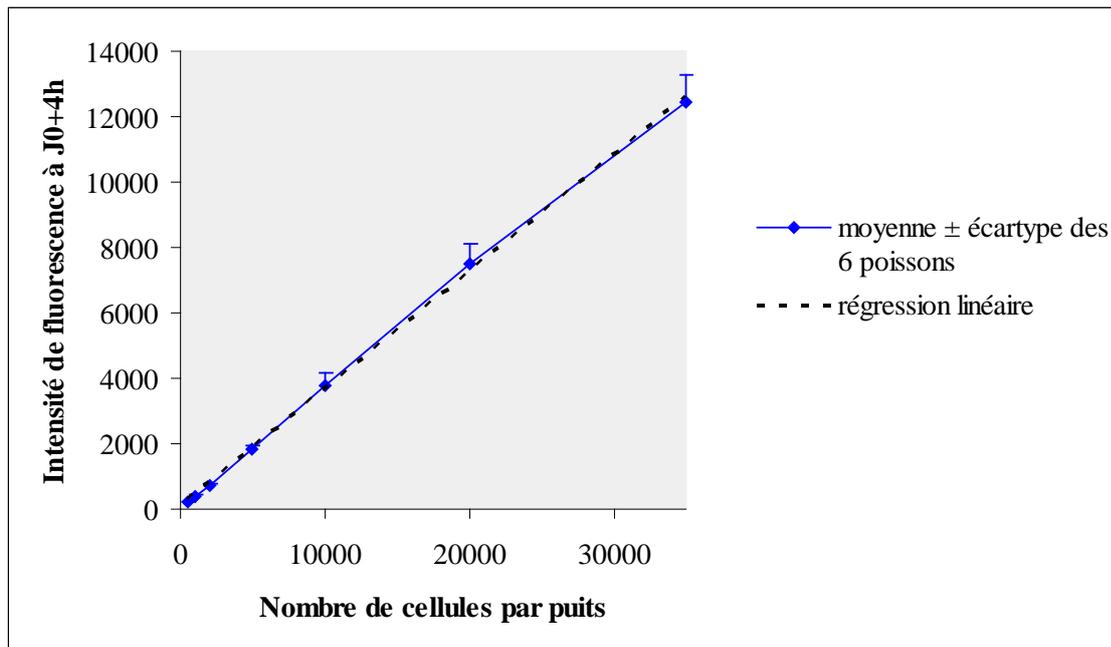


Figure 2. *Corrélation entre intensité de fluorescence et densité cellulaire pour le dosage de 6 préparations cellulaires distinctes 4 h après ensemencement (J0+4h). La droite de régression linéaire est calculée sur les valeurs moyennes des 6 préparations obtenues à chaque densité.*

L'équation de la droite de régression linéaire est $Y=0,3584x + 87,089$ avec $r = 0,9991$.

2.2 Répétabilité intradosage

L'objectif de cette étude était d'analyser si de multiples dépôts ($n = 4$) en puits d'une même suspension cellulaire donnaient des intensités de fluorescence homogènes. Nous présentons dans le **Tableau 1** les coefficients de variation des quadruplicats réalisés pour chaque densité d'ensemencement. Ces données ont été obtenues sur six suspensions cellulaires indépendantes. Nous observons que ces coefficients présentent des valeurs comprises entre 2 et 22 % sachant que ces dernières sont pour leur majorité inférieures ou très proches de 10%. Ces résultats sont en faveur d'une bonne répétabilité du dosage. Ils valident à la fois la qualité de nos répliqués de pipetage ainsi que l'homogénéité de l'adhésion des cellules à leur support après 4 h d'ensemencement.

Tableau 1. Répétabilité intradosage

Valeurs des coefficients de variations (en %) obtenus par quadruplicats pour chaque densité d'ensemencement et par préparation cellulaire (P1 à P6)

Numéros préparations cellulaires						
Cellules / puits	P1	P2	P3	P4	P5	P6
500	19	22	12	9	14	14
1000	13	3	14	9	14	5
2000	10	5	6	4	14	6
5000	8	13	11	3	10	5
10 000	11	9	16	7	8	4
20 000	9	12	11	2	6	6
35 000	7	11	4	4	16	7

2.3 Répétabilité interdosage

Dans un protocole classique d'étude de prolifération, le dosage repose sur la mesure de fluorescence d'un échantillon à J0+4h, et sur la mesure d'un autre échantillon de la même préparation cellulaire après un certain temps de culture. Il fallait donc s'assurer, par la mesure de la variabilité interdosage, que deux dosages indépendants n'induisaient pas de biais dans nos conditions. La répétabilité interdosage a été appréciée en analysant la même préparation cellulaire dans trois dosages indépendants, et ce à deux densités. Les résultats de la **Figure 3** montrent que les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues pour une même préparation cellulaire, ensemencée à la densité 35 000 cellules par puits, sont répétables d'un dosage à l'autre. En effet, les coefficients de variation obtenus sur les trois dosages sont de l'ordre de 8%. Cette qualité de la répétabilité interdosage est obtenue pour les trois préparations cellulaires testées (**Figure 3**). Des coefficients similaires de variation interdosage (7%-8%) ont également

été observés pour les trois préparations cellulaires après un ensemencement à la densité 5000 cellules par puits. L'ensemble de ces résultats est donc en faveur d'une répétabilité interdosage très élevé.

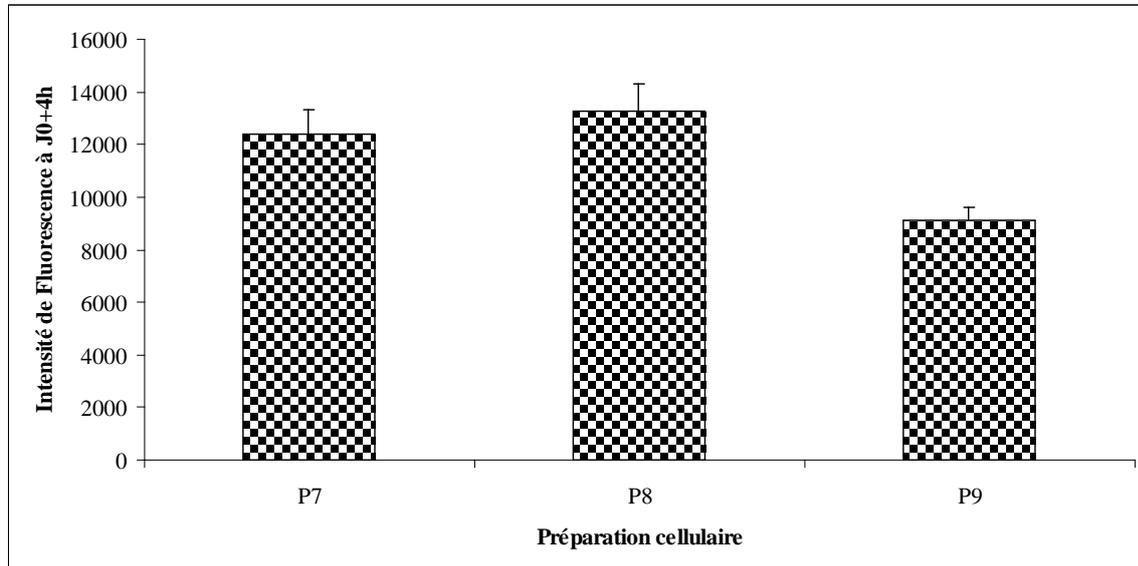


Figure 3. Répétabilité interdosage

Chaque préparation cellulaire, ensemencée à 35 000 cellules par puits, a fait l'objet de 3 dosages CyQuant® NF indépendants : les coefficients de variation interdosage sont indiqués en %.

La répétabilité a été testée sur 3 préparations cellulaires distinctes (notée P7-P8 et P9).

2.4 Application du dosage CyQuant® NF à l'étude de prolifération des cellules de nageoires en culture : effet de la densité initiale d'ensemencement

L'objectif de cette analyse était d'appliquer le kit CyQuant® NF à l'étude de la prolifération des cellules de nageoires après 5 jours de culture. Pour ce faire, il a été nécessaire de déterminer la densité cellulaire d'ensemencement garantissant un gain de prolifération maximal en microplaques sur la période de culture définie. La notion de gain a été appréciée par le dépassement de la valeur seuil du rapport J5/J0 fixée à 100%. Cette valeur correspond en effet à un nombre de cellules exactement identique entre J0 et J5.

On observe sur la **Figure 4** que les rapports d'intensités de fluorescence J5/J0 sont inférieurs à la valeur seuil de 100% pour la grande majorité des préparations cellulaires ensemencées entre 500 et 2000 cellules par puits, suggérant une mortalité cellulaire prédominante. En effet, même si ce test ne nous permet pas de discriminer la proportion de cellules ayant éventuellement proliféré de celles qui se sont dégradées, le bilan net est négatif.

Concernant les densités intermédiaires (5000 et 10 000 cellules), les rapports de fluorescence tendent à augmenter mais de façon non significative par rapport aux densités inférieures. Par ailleurs, ces rapports restent proches de la valeur seuil 100%,

indiquant pour cet intervalle de densité une absence de gain de prolifération sur la période de culture considérée.

La valeur des rapports obtenue pour la densité 20 000 augmente nettement en valeur absolue par rapport aux densités intermédiaires. Cette augmentation reste pourtant non significative statistiquement, du fait notamment de la grande variabilité des valeurs observées entre préparations cellulaires qui se répartissent entre 90 et 188%. Il n'en reste pas moins que seules deux préparations ont un gain nul ou médiocre (90 et 115%), alors que les quatre autres préparations ont des gains largement positifs de 140, 156 et 179 et 188 %.

La valeur des rapports obtenue pour la densité 35 000 est, quant à elle, significativement supérieure à celle des autres densités testées à l'exception de celle correspondant à la densité 20 000 cellules pour laquelle il n'y a pas de différence significative (**Figure 4**). Les gains de prolifération obtenus à 35 000 cellules sont, à l'exception d'une préparation où le taux avoisine les 115%, toujours globalement bien supérieurs à la valeur seuil de 100% (145 à 189%).

Il ressort clairement que la densité d'ensemencement 35 000 cellules par puits est la plus adaptée pour engendrer un gain de prolifération cellulaire en microplaques 96 puits. Elle serait à privilégier dans les futures expérimentations pour favoriser la prolifération cellulaire. Néanmoins, la densité 20 000, plus variable dans ces séries expérimentales, permet également une prolifération correcte : elle pourrait en ce sens trouver un intérêt dans les expérimentations où le nombre cellulaire total à disposition peut parfois se révéler limitant.

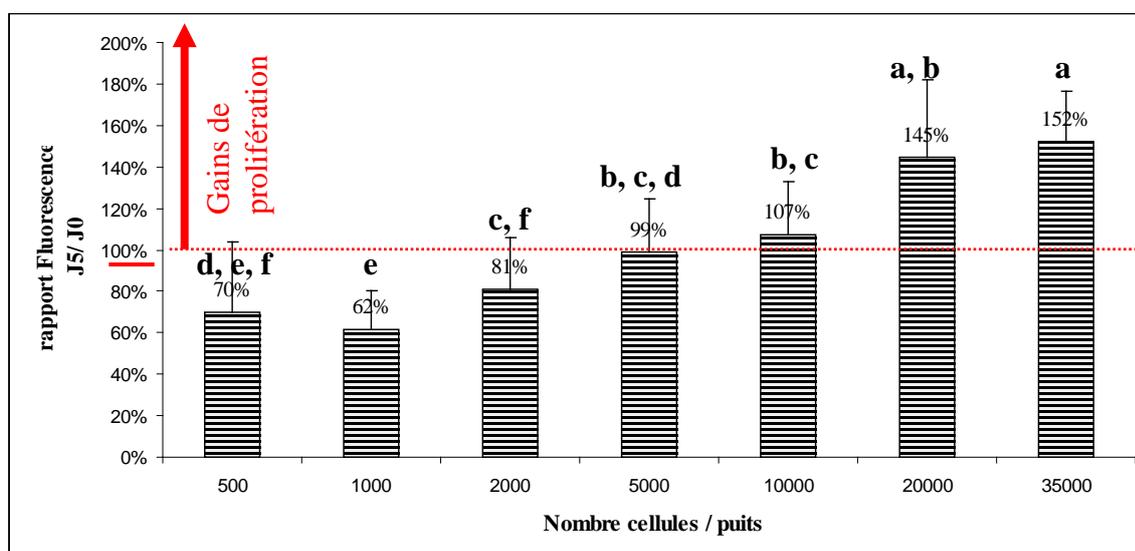


Figure 4. Capacité proliférative des cellules de nageoires après 5 jours de culture en microplaque en fonction du nombre de cellules par puits.

Les rapports d'intensité de fluorescence J5/J0 exprimés en % ont été moyennés sur 6 préparations cellulaires distinctes à chaque densité cellulaire. Toute valeur supérieure au seuil de 100% est signe d'un gain de prolifération cellulaire. Les moyennes ont été comparées 2 à 2 par le test statistique de Student. Les différences significatives ont été déterminées pour une valeur de $p < 0,05$.

Conclusion

Les résultats de ce travail montrent que le dosage CyQuant® NF appliqué aux cellules de nageoires de poisson rouge présente des caractéristiques hautement représentatives d'un dosage fonctionnel : corrélation linéaire entre fluorescence et nombre de cellules, haute sensibilité dès 500 cellules par puits et très bonne répétabilité intra et interdosage. De plus, l'équation linéaire, obtenue à partir de six préparations cellulaires différentes, validée par un coefficient de corrélation élevé ($r = 0,9991$), nous permet d'obtenir un outil de quantification hautement fiable pour le comptage cellulaire. Son automatisation en microplaque lui confère également un intérêt inestimable en gain de temps pour le comptage de grandes séries d'échantillons.

L'ensemble de ces résultats témoignent de l'intérêt du dosage CyQuant® NF et valident clairement son utilisation *in vitro* sur les cellules de nageoires, de poisson rouge, issues de culture primaire. Il représente aussi un outil idéal pour réaliser des mesures de prolifération cellulaire en microplaques après une période de culture définie, pour des densités d'ensemencement comprises entre 20 000 et 35 000 cellules par puits. Ce dosage est maintenant pratiqué en routine dans le laboratoire. Il a été récemment utilisé pour l'analyse de toxicité de molécules d'intérêt sur cellules de nageoires en culture. La culture en microplaques a notamment permis de réaliser une économie notable en terme de quantité de molécules testées (souvent très coûteuses) grâce aux faibles volumes de milieu requis.

Références bibliographiques

Bopp SK, Lettieri T (2008) Comparison of four different colorimetric and fluorimetric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology* 8:8-8.

Chen Q, Ding JX, Liu B, Stone P, Feng YJ, Chamley L (2010) Spreading endothelial cell dysfunction in response to necrotic trophoblasts. Soluble factors released from endothelial cells that have phagocytosed necrotic shed trophoblasts reduce the proliferation of additional endothelial cells. *Placenta* 31: 976-981.

Freshney R (1987) *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, p.117, Alan R.Liss, Inc., New York.

Jiang HB, Xu M, Wang XP (2008) Pancreatic stellate cells promote proliferation and invasiveness of human pancreatic cancer cells via galectin-3. *World J Gastroenterol* 14: 2023-2028.

Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL (2001) Sensitive determination of cell number using CyQuant® cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254: 85-98.

Liao W, Goh FY, Betts RJ, Kemeny DM, Tam J, Bay BH, Wong WS (2011) A novel anti-apoptotic role for apolipoprotein L2 in IFN- γ -induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells. *J Cell Physiol* 226: 397-406.

Lee EJ, Lee BB, Kim SJ, Park YD, Park J, Kim DH (2008) Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells. *Int J Oncol* 33:767-776.

Moritz C, Labbé C (2008) Cryopreservation of goldfish fins and optimization for field scale cryobanking. *Cryobiology* 56:181-188.

Prudnikova TY, Mostovich LA, Domanitskaya NV, Pavlova TV, Kashuba VI, Zabarovskiy ER, Grigorieva EV (2010) Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 19:10-27.

Quent VM, Loessner D, Friis T, Reichert JC, Huttmacher DW (2010) Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J Cell Mol Med* 14:1003-1013.