DOI:10.16853/j.cnki.1009-3575.2026.05.001

不同氧气浓度对小鼠肠道精密切片内参基因Ct值的影响

云 舒,韩 旭,贺幼义东,苏日古嘎,哈斯苏荣*
(内蒙古农业大学兽医学院,呼和浩特 010011)

摘要:探索不同氧气浓度(常氧20%和高氧80%)培养对小鼠肠道精密切片(PCIS)内参基因Ct值稳定性的影响。制备PCIS,分别在20%和80% O_2下培养1 h、3 h、6 h、12 h、24 h,提取总RNA并检测其质量和浓度,RT-qPCR检测*β-actin*、*18S rRNA*、*Ywhaz*、*Gapdh*和*Hprt1*的Ct值。RNA质量合格(A260/280:1.93~2.03),RNA浓度随培养时间延长下降。RT-qPCR结果显示,*Ywhaz*在高氧条件下Ct值最稳定(21.50~22.67),*β-actin*在高氧下也较稳定(15.44~17.74),但在常氧条件下波动较大;*18S rRNA*、*Gapdh*、*Hprt1*在高氧条件下相对稳定,在常氧条件下波动大。*Ywhaz*是PCIS高氧培养最稳定的内参基因;*β-actin*在高氧下也可用,但在常氧下稳定性欠佳;*18S rRNA*、*Gapdh*、*Hprt1*稳定性受氧气浓度影响显著。

关键词:精密肠道切片;内参基因;氧气浓度
中图分类号:Q813.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-3575(2026)05-0001-07

Effect of Different Oxygen Concentrations on the Ct Value of the House Keeping Genes in Mice Precision-cut Intestinal Slices

YUN Shu, HAN Xu, HE Youyidong, Suriguga, Hasisurong*
(*College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot*, 010011, *China*)

Abstract: This study aimed to investigate the impact of different oxygen concentrations (20% and 80%) during culture on the stability of reference gene Ct values within mouse precision-cut intestinal slices (PCIS). PCIS were prepared and cultured under either 20% O_2 (normoxia) or 80% O_2 (hyperoxia) for 1, 3, 6, 12, and 24 hours. Total RNA was subsequently extracted, its quality and concentration were assessed, followed by the RT-qPCR analysis to determine the Ct values of the candidate reference genes *β-actin*, *18S rRNA*, *Ywhaz*, *Gapdh*, *and Hprt1*. The results showed that, the RNA quality was confirmed to be acceptable (A260/280 absorbance ratios: 1.93-2.03), although the RNA concentration decreased with prolonged culture duration. RT-qPCR analysis revealed that Ywhaz exhibited the highest stability under hyperoxic conditions (80% O_2), with Ct values ranging narrowly from 21.50 to 22.67. *β-actin* also demonstrated relative stability under hyperoxia (Ct range: 15.44-17.74) but exhibited significant variations under normoxic conditions. The genes *18S rRNA*, *Gapdh*, and *Hprt1* showed moderate stability under hyperoxia, but their Ct values fluctuated considerably under normoxic conditions. In conclusion, *Ywhaz* is the most stable reference gene for PCIS cultured under hyperoxic (80% O_2) conditions. While *β-actin* may also be suitable under hyperoxia, its stability is compromised under normoxia. The stability of *18S rRNA*, *Gapdh*, and *Hprt1* is significantly influenced by the ambient oxygen concentration.
Key words: Precision-cut intestinal slices; Reference genes; Oxygen concentration

不同于单层细胞培养,精密组织切片(precision-cut tissue slices, PCTS)完整保留了器官的解剖学结构,其细胞保持在原始的组织-基质构型中,并维持多种器官特异性特征,如代谢活性、组织稳态以及一定程度的免疫功能。该模型因其能高度模拟体内微环境,已成为毒理学和药物研究中的重要工具[1-4]。此外,PCTS的应用能显著减少实验动物的使用量,符合3R原则与动物福利要求[5]。精密肠道切片体外培养时,常氧(20% O_2)培养相比高氧(80% O_2)培养PCIS较安全、经济和便利。RT-qPCR分析PCIS目的基因表达时,内参基因的选择会影响实验结果的准确性。因此,本论文为保证RT-qPCR实验基因表达量计算的准确性,考察了不同氧气浓度培养PCIS时内参基因的Ct值。

1 材料与方法

1.1 试验动物

4只昆明系SPF级小鼠,雄性,7周龄,购买自斯贝福生物技术公司(生产许可号:SCXK(京)2024-0001)。小鼠饲料购买自同公司。

收稿日期:2025-09-25
基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2025QN03082);内蒙古农业大学优秀博士人才引进科研启动项目(NDYB2021-18)
作者简介:云 舒(2002—),女,硕士研究生,主要从事小鼠精密肠切片方面的研究,E-mail:1597058654@qq.com;*为通信作者,哈斯苏荣(1965—),男,博士,教授,主要从事兽医药物动力学、天然活性物质药理学、兽医临床药理学、反刍家畜寄生虫病学等方面的研究,E-mail:surong@imau.edu.cn

1.2 试验材料

William's Medium E(1X)、Glutamax™、PBS pH 7.4 basic(1X)均购自美国GIBCO生物技术公司；低熔点琼脂糖、硫酸庆大霉素、葡萄糖购自Sigma(上海)贸易有限公司；两性霉素B购自北京索莱宝生物科技有限公司；UE总RNA小量制备试剂盒购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司；5*HiFiScript RT Master Mix、10*gDNA Remover Mix、ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix均购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小鼠PCIS的制备

小鼠脱颈处死后将回肠取出置于预冷的PBS中，将回肠剪成约1.5 cm长后，用滴管吸取PBS洗涤液进行冲洗，之后使用肠线将回肠一侧末端打结，并从回肠的另一侧用滴管滴入3%低熔点琼脂糖溶液填充整个回肠肠腔，使回肠充分展开。待琼脂糖凝固后，将回肠置于振动切片机样品模具槽中，用琼脂糖溶液垂直固定于模具中间。待琼脂糖凝固后，将其从模具中取出，修整形状。将合适形状的琼脂块用胶水粘在切片机载物台中间固定，在样品槽周围放冰块，将切片组织厚度调整到400 μm开始切片，所有操作均在冰上进行。制备流程如图1。

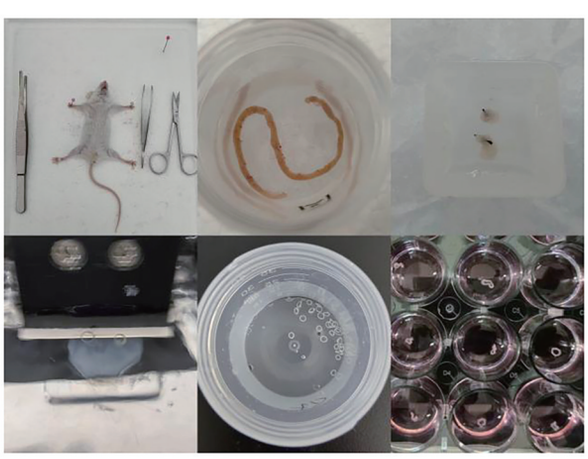


图1 精密肠道切片制备流程图

Fig. 1 Flow chart of preparation of the precision-cut intestinal slices

1.3.2 小鼠PCIS的培养

在37 ℃，5% CO_2条件下，20% O_2常氧或供应80% O_2培养PCIS，培养基组成见表1。在2种氧气浓度培养1 h、3 h、6 h、12 h和24 h后收集PCIS，在液氮速冻后-80 ℃保存待用。

表1 培养基主要成分

Table 1 The main components of the culture medium

培养基成分	培养基含量
WME培养基 William's Medium E	500 mL
葡萄糖 Glucose	1.375 g
庆大霉素 Gentamicin	25 mg
两性霉素 Amphotericin B	1.25 mg
谷氨酰胺 GlutaMAX	5 mL

1.3.3 小鼠PCIS RNA提取和cDNA合成

使用5片精密肠切片，根据制造商的说明书，使用UE总RNA小量制备试剂盒进行总RNA提取。通过酶标仪(SYNERGY|HT，BioTek)测量260 nm和280 nm处的吸光度来确定RNA的质量和浓度。5*HiFiScript RT Master Mix处理每个样本的1 μg RNA，42 ℃孵育2 min，以去除基因组DNA污染。使用10*gDNA Remover Mix合成预混液在PCR仪(SCI1000-G，北京东胜创新生物科技有限公司)中于37 ℃下15 min，然后在85 ℃下孵育5 s，待样品冷却至4 ℃。将cDNA样品储存在-20 ℃下进行RT-qPCR分析。

1.3.4 RT-qPCR检测内参基因

按照说明书提取RNA，反转录后进行RT-qPCR扩增，引物信息见表2，扩增反应体系按25 μL体系进行：12.5 μL 2×SuperStar Universal SYBR Master Mix，10 μL ddH_2O，上下游引物各0.75 μL、1.00 μL cDNA。充分振荡混匀后离心。反应参数为：95 ℃预变性30 s，95 ℃变性10 s，60 ℃退火30 s，95 ℃延伸15 s，进行39个循环，溶解曲线60 ℃ 1 min，95 ℃ 1 s。

表2 荧光定量PCR引物

Table 2 Real-time PCR primer

引物序列	引物序列(5'→3')
β-actin F	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA
β-actin R	GCCGGACTCATCGTACTCC
Ywhaz F	TTACTTGGCCGAGGTTGCT
Ywhaz R	TGCTGTGACTGGTCCACAAT
18S rRNA F	CTGAGAAACGGCTACCACATC
18S rRNA R	GCCTCGAAAGAGTCCTGTATTG
Gapdh F	CCTCGTCCCGTAGACAAAATG
Gapdh R	TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT
Hprt1 F	GACTGATTATGGACAGGAC
Hprt1 R	ACAGTCATAGGAATGGATCT

2　结果

2.1　RNA 的纯度分析

如图 2 所示，20% O_2 和 80% O_2 各组 RNA 样本纯度 OD_{260}/OD_{280} 比值均在 1.93~2.03 之间，说明小鼠 PCIS RNA 纯度较好。结果表明，两种氧气浓度处理条件下 RNA 的提取均符合 RT-qPCR 实验的质量要求。

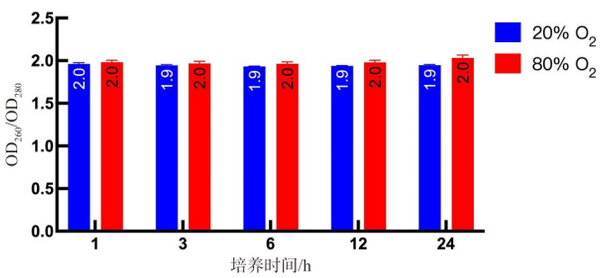


图 2　RNA 质量对比图

Fig. 2　RNA quality comparison chart

2.2　RNA 的浓度分析

如图 3 所示，20% O_2 提取的 RNA 浓度（黑色柱）在 1 h 时 261 ng/μL，3 h 时 287 ng/μL，6 h 时 246 ng/μL，12 h 时 193 ng/μL，24 h 时 176 ng/μL；80% O_2 提取的 RNA 浓度（粉色柱）在 1 h 时 365 ng/μL，3 h 时 310 ng/μL，6 h 时 303 ng/μL，12 h 时 217 ng/μL，24 h 时 179 ng/μL。结果表明，小鼠 PCIS 随着培养时间的变长，RNA 的浓度不断减少。同时氧浓度对 RNA 的提取有一定影响，在高氧条件下，RNA 浓度较高，但无明显统计学差异。

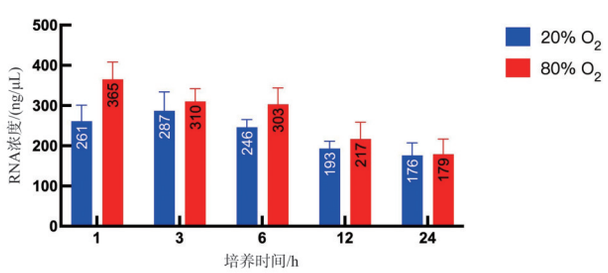


图 3　RNA 浓度对比图

Fig. 3　Comparison chart of RNA concentration

2.3　内参基因 Ct 值

2.3.1　内参基因 *β−actin* 的 Ct 值

如图 4 所示，20% O_2 条件下 *β−actin* 的 Ct 值在 18.43~21.48 之间，有一定波动，尤其在 24 h 时波动较大，说明表达稳定性相对较差。80% O_2 条件下 *β−actin* 的 Ct 值在 15.44~17.74 之间，整体波动较小，表现出较好的稳定性，小鼠个体样本间误差较小。

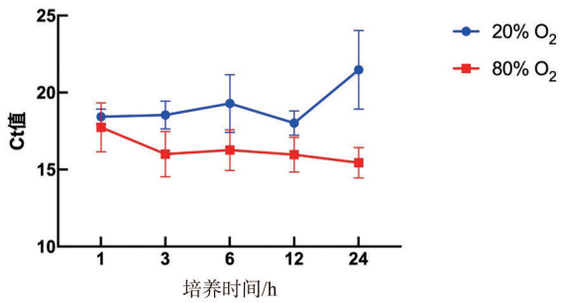


图 4　*β−actin* 的 Ct 值

Fig. 4　Ct value of *β−actin*

2.3.2　内参基因 *18S rRNA* 的 Ct 值

如图 5 所示 20% O_2 条件下 *18s rRNA* 的 Ct 值在 15.64~20.15 之间，波动幅度较大，尤其在 6~24 h 时间段 Ct 值明显升高，误差也相对较大，说明表达不够稳定。80% O_2 条件下 *18S rRNA* 的 Ct 值在 12.78~15.32 之间，整体波动较 20% O_2 小。

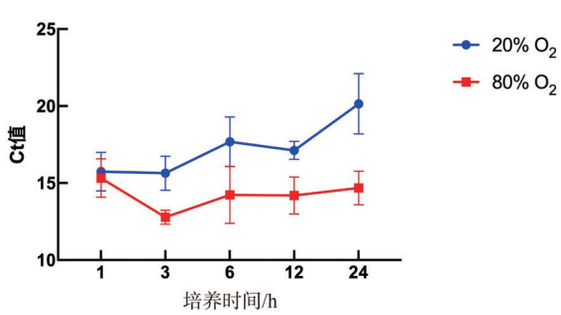


图 5　*18s rRNA* 的 Ct 值

Fig. 5　Ct value of *18s rRNA*

2.3.3　内参基因 *Ywhaz* 的 Ct 值

如图 6 所示 20% O_2 条件下 *Ywhaz* 的 Ct 值在 23.20~25.42 之间，整体波动幅度较小，但在 24 h 时略有升高，误差略大，说明存在一定时间依赖性波动，表达稳定性一般。80% O_2 条件下 *Ywhaz* 的 Ct 值在 21.50~22.67 之间，整体波动小，误差较小，表现出较好的表达稳定性。

2.3.4　内参基因 *Gapdh* 的 Ct 值

如图 7 所示 20% O_2 条件下 *Gapdh* 的 Ct 值在 22.85~25.17 之间，整体波动幅度较小，但在 24 h 时略有升高，误差略大，说明存在一定时间依赖性波动，表达稳定性一般。80% O_2 条件下 *Gapdh* 的 Ct 值在 20.99~23.81 之间。

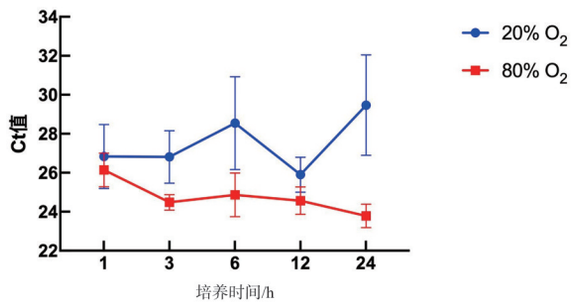


图6 *Ywhaz*的Ct值

Fig. 6 Ct value of *Ywhaz*

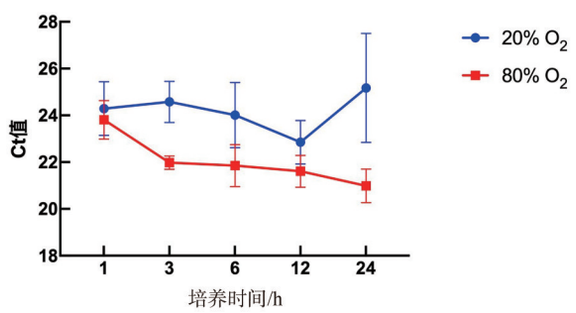


图7 *Gapdh*的Ct值

Fig. 7 Ct value of *Gapdh*

2.3.5 内参基因*Hprt1*的Ct值

如图8所示20% O_2条件下*Hprt1*的Ct值在25.90~29.47之间,整体波动幅度较大,误差略大,表达稳定性一般。80% O_2条件下*Hprt1*的Ct值在23.79~26.15之间,表达稳定性一般。

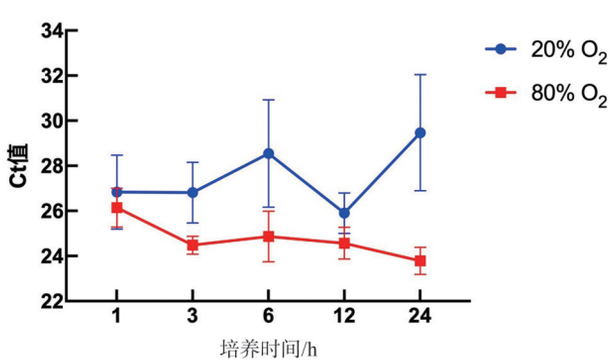


图8 *Hprt1*的Ct值

Fig. 8 Ct value of *Hprt1*

3 讨论

精密切割技术最初主要应用于肝脏和肾脏等实体器官,而肠道由于其独特的中空结构,切片和培养难度较大,早期并未被纳入应用范畴,制备肠切片最初使用的并不是半自动切片仪,而是通过取芯工具直接从肠壁冲压取样,获得包含肠壁全层厚度的样本,但是以此方法获得的切片活力维持时间极短[6-7]。PCIS的制备后来由De Kanter等[8]引入,他们使用低凝胶琼脂糖填充大鼠肠腔,并垂直于肠道长度切片肠段,从而形成大鼠PCIS的组织环。本研究支撑小鼠回肠组织所用的3%低熔点琼脂糖,主要用于支撑组织结构、保持组织形态,便于后续均匀且高质量地切片,琼脂糖增加组织的硬度,使其更适合在振动切片机上进行切割;减少了切片过程中组织的形变与撕裂;保证了组织切片厚度一致性,有利于后续培养、染色或功能性研究。注意事项:琼脂糖温度过高会损伤组织,过低则可能凝固太快,造成包埋不均;包埋过程中避免气泡,气泡会在切片时造成组织破损;包埋后的组织尽量及时切片,以防干燥或变性;切片时加入预冷PBS缓冲液以保证组织活性。

从RNA质量来看,所有样本的OD_{260}/OD_{280}值均介于1.93到2.03,说明了RNA纯度较高,适合用于后续的反转录和RT-qPCR实验。RNA浓度方面,随培养时间延长整体呈下降趋势,尤其在24 h后明显降低。这可能与组织代谢逐渐减弱或细胞凋亡增加有关。近期研究结果表明,TRIzol溶解的琼脂糖(用作细胞培养的三维支架)会与RNA共同保留在水相中[9],琼脂糖会干扰正常的RNA分离。因此,Stegmayr等[10]学者在氯仿诱导的相分离后加入了DNA去除步骤(如DNase处理),并发现该步骤对于获得高纯度/高质量的RNA是必要的。

反转录是一种把RNA转化成互补DNA(cDNA)的过程,为了后续实时定量PCR(RT-qPCR)做准备。试验中,会选用引物结合到RNA后,逆转录酶就会沿着RNA模板合成出对应的cDNA。因为cDNA比RNA稳定很多,所以更适合后续的定量检测和长期保存。RT-qPCR技术是分析PCTS中基因表达最常用的方法。PCTS的总RNA通常通过组织匀浆结合TRIzol®(或其他等效试剂)法提取。随后,提取的RNA经过反转录合成cDNA,并通过RT-qPCR进行目的基因的定量分析。虽然单个PCTS能够提供足够的RNA量,但为减少个体差异和提高数据稳定性,大多数研究倾向于汇集多个PCTS样本进行RNA提取和后续分析[11]。由于PCTS样本间潜在的转录活性差异,选择表达稳定的内参基因(或称管家基因、参考基因)对RT-qPCR数据的准确归一化

至关重要[12]。最常用的数据归一化策略依赖于内源性归一化基因。这些基因的表达应具有高度的组成型稳定性，即其 mRNA 水平在不同试验条件（如本研究的氧浓度和处理时间）、组织类型或生理状态下保持一致，且表达丰度与目标基因相当[13]。因此，使用比较循环阈值（comparative Ct，ΔΔCt）等方法分析 RT-qPCR 数据时，一个合格的内参基因是必不可少的。基于上述要求，本研究旨在评估不同氧气浓度（20% vs 80% O_2）培养条件下，常用候选内参基因（*Gapdh*，*β-actin*，*18S rRNA*，*Ywhaz*，*Hprt1*）在 PCIS 模型中的表达稳定性。

Gapdh 全称甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase），是糖酵解途径（glycolysis）中的一个关键酶。它催化甘油醛-3-磷酸（G3P）转化为 1，3-二磷酸甘油酸（1，3-BPG）的步骤，同时将 NAD^+ 还原为 NADH + H^+[14-15]。因此，它在细胞能量代谢中扮演核心角色，因为糖酵解是所有细胞获取能量的最基本途径之一，所以 *Gapdh* 基因在绝大多数细胞和组织中持续、稳定、高水平地表达[16]。这种表达稳定性使其成为分子生物学实验中最常用、最经典的内参基因之一，但 *Gapdh* 的表达在某些特定情况下也会发生变化，例如：在 IBD 患者中，肠道炎症显著影响黏膜 *Gapdh* 表达的稳定性，这在非炎症和发炎黏膜之间表现出高度变异性[17]。*Gapdh* 在氧化应激（如一氧化氮 NO）条件下会发生翻译后修饰（如 S-亚硝基化）并从胞浆转位到核内，其表达水平和定位都可能发生变化[18]。尽管 20% O_2 被视为“常氧”，但在厚度达 400 μm 的 PCIS 模型中，氧扩散限制可能导致组织深部（尤其隐窝区域）实际处于功能性缺氧状态。肠道在体生理氧分压仅为 2%~8% O_2[19-20]，体外 20% O_2 虽高于生理水平，却因缺乏脉管系统的氧输送，无法满足整个切片的均一氧供。这种局部缺氧可迅速稳定缺氧诱导因子 HIF-1α，触发其下游转录程序。在缺氧条件下，HIF-1α 稳定并激活，促进多种糖酵解相关基因的表达，包括 *Gapdh*2。HIF-1α 通过结合这些基因的启动子区域，增强其转录活性，从而上调 *Gapdh* 的表达[21]。此外，HIF-1α 还能通过调控代谢重编程，间接影响 *Gapdh* 的活性，支持细胞在缺氧环境中的能量代谢需求[22]。本研究中 *Gapdh* 在常氧条件下的 Ct 值波动（尤其在 24 h），与 HIF 激活导致其转录增加或细胞代谢状态剧烈变化一致。

β-actin（ACTB）编码细胞骨架蛋白 β-肌动蛋白，它在维持细胞形态、运动和胞内运输中起基础性作用，因此在多数组织和细胞中呈高丰度、高保守性表达[23-24]。有研究显示，在大鼠关节炎和肺炎模型中 *18S rRNA* 表达在所有检查的基因表达中最稳定[25]。但在肠道炎症中，*β-actin* 在健康黏膜和发炎黏膜之间表现出很高的变异性[17]。上述研究表明，*β-actin* 的稳定性可能依赖于物种和组织类型。在本研究中，*β-actin* 在常氧条件下波动较大，高氧条件下表达较稳定，可能是缺氧诱导的 ATP 耗竭、氧化应激（ROS 累积）及细胞骨架重构，间接导致 *β-actin* 的表达失调。

18S rRNA 属于核糖体 RNA，是真核生物核糖体小亚基的核心组成部分，广泛应用于基因表达研究中的内参基因。在探究肺高血压鸡中最稳定的参考基因的研究中，*18S rRNA* 被认为是较为稳定的内参基因[26]。但也有学者研究了小鼠左心室中不同发育阶段的 21 个广泛使用的家政基因的基因表达特征，发现 *18S rRNA* 在小鼠左心室发育研究中不适合用作参考基因[27]。本研究中，*18S rRNA* 在不同氧气浓度条件下表达不够稳定。

Ywhaz（tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta）是一种经典的内参基因，编码 14-3-3ζ 蛋白，该蛋白参与细胞信号转导、细胞周期调控和细胞凋亡等多种基础细胞活动[28]。在结直肠癌细胞系、患者来源的类器官和组织样本中，*Ywhaz* 在放疗前后的表达稳定性较好，被推荐作为 RT-qPCR 分析的内参基因[29]。在探究氧气浓度对精密肺切片中细胞死亡、抗氧化转录、急性炎症和细胞增殖的影响时，*Ywhaz* 作为内参基因用来计算目的基因表达[30]。这表示 *Ywhaz* 在不同氧气浓度培养条件下比较稳定，可能是因为 14-3-3ζ 这类“枢纽”蛋白的表达通常受进化保守的启动子调控，对急性环境应激（如缺氧）的转录响应远低于代谢酶，这与我们的研究结果一致。

Hprt1 是一种酶，它通过将 5-磷酸基团从 5-磷酸基-1-焦磷酸中转移出去，来催化将黄嘌呤转化为肌苷一磷酸以及将鸟嘌呤转化为鸟苷一磷酸的反应。该酶在通过嘌呤回收途径生成嘌呤核苷酸的过程中起着核心作用[31]。在绝大多数组织（脑、肝、肾、免疫细胞等）和细胞类型中组成性表达，符合管家基因定义。在多种生理/病理条件下（如细胞周期、分化、非增殖状态）表现稳定[32-33]。但在小鼠肠道中的表达稳定性较差[16]。

研究结果表明,氧气环境是影响内参基因稳定性的重要因素。综合分析不同氧浓度下各基因的Ct值变化趋势和稳定性,发现*Ywhaz*在高氧(80% O_2)条件下表现最为稳定,是此环境下PCIS研究的较好的内参基因;*β-actin*在高氧条件下也表现出较好的稳定性,但在常氧(20% O_2)环境下波动性增大。

4 结论

氧气浓度(20% O_2 vs 80% O_2)对精密肠道切片提取的RNA纯度和总RNA浓度基本没有影响。80% O_2浓度培养时内参基因*β-actin*、*Ywhaz*均较20% O_2浓度好。在相同氧气浓度条件下稳定性最好的内参基因是*Ywhaz*。因此本论文建议选择80% O_2浓度培养PCIS并使用*Ywhaz*作为RT-qPCR的内参基因。

参考文献:

[1] MAJOROVA D, ATKINS E, MARTINEAU H, et al. Use of precision-cut tissue slices as a translational model to study host-pathogen interaction[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 686088.

[2] DE GRAAF I A M, OLINGA P, DE JAGER M H, et al. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies[J]. Nature Protocols, 2010, 5(9): 1540-1551.

[3] BENEKE V, GRIEGER K M, HARTWIG C, et al. Homeostatic T helper 17 cell responses triggered by complex microbiota are maintained in *ex vivo* intestinal tissue slices[J]. European Journal of Immunology, 2024, 54(8): 2350946.

[4] PHAM B T, VAN HAAFTEN W T, OOSTERHUIS D, et al. Precision-cut rat, mouse, and human intestinal slices as novel models for the early-onset of intestinal fibrosis[J]. Physiological Reports, 2015, 3(4): e12323.

[5] LI M, DE GRAAF I A M, GROOTHUIS G M M. Precision-cut intestinal slices: alternative model for drug transport, metabolism, and toxicology research[J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2016, 12(2): 175-190.

[6] VICKERS A E, FISCHER V, CONNORS S, et al. Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines[J]. Drug Metabolism and Disposition, 1992, 20(6): 802-809.

[7] FISHER R L, VICKERS A E M. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal[J]. Xenobiotica, 2013, 43(1): 8-14.

[8] DE KANTER R, TUIN A, VAN DE KERKHOF E, et al. A new technique for preparing precision-cut slices from small intestine and colon for drug biotransformation studies[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2005, 51(1): 65-72.

[9] OGURA T, TSUCHIYA A, MINAS T, et al. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct[J]. BMC Research Notes, 2015, 8: 644.

[10] STEGMAYR J, ALSAFADI H N, LANGWIŃSKI W, et al. Isolation of high-yield and-quality RNA from human precision-cut lung slices for RNA-sequencing and computational integration with larger patient cohorts[J]. American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2021, 320(2): L232-L240.

[11] DEWYSE L, REYNAERT H, VAN GRUNSVEN L A. Best practices and progress in precision-cut liver slice cultures[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 7137.

[12] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.

[13] COULSON D T R, BROCKBANK S, QUINN J G, et al. Identification of valid reference genes for the normalization of RT qPCR gene expression data in human brain tissue[J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9: 46.

[14] NICHOLLS C, LI H, LIU J P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2012, 39(8): 674-679.

[15] EL KADMIRI N, SLASSI I, EL MOUTAWAKIL B, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease[J]. Pathologie Biologie, 2014, 62(6): 333-336.

[16] SIRAKOV M, BORRA M, CAMBULI F M, et al. Defining suitable reference genes for RT-qPCR analysis on intestinal epithelial cells[J]. Molecular Biotechnology, 2013, 54(3): 930-938.

[17] BAMIAS G, GOUKOS D, LAOUDI E, et al. Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2013, 19(13): 2840-2847.

[18] HARA M R, CASCIO M B, SAWA A. GAPDH as a sen-

sor of NO stress[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006,1762(5):502-509.

[19] GRANT J,LEE E,ALMEIDA M,et al. Establishment of physiologically relevant oxygen gradients in microfluidic organ chips[J]. Lab on a Chip,2022,22(8):1584-1593.

[20] CARREAU A,EL HAFNY-RAHBI B,MATEJUK A,et al. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2011, 15(6):1239-1253.

[21] MCGETTRICK A F,O'NEILL L A J. The role of HIF in immunity and inflammation[J]. Cell Metabolism, 2020,32(4):524-536.

[22] YANG Z,SU W,WEI X Y,et al. Hypoxia inducible factor-1α drives cancer resistance to cuproptosis[J]. Cancer Cell,2025,43(5):937-954. e9.

[23] GUO C M, LIU S Q, WANG J S, et al. ACTB in cancer[J]. Clinica Chimica Acta,2013,417:39-44.

[24] RUAN W J,LAI M D. Actin,a reliable marker of internal control?[J]. Clinica Chimica Acta,2007,385(1/2): 1-5.

[25] JIANG C S,MENG L S,ZHU W H,et al. Housekeeping gene stability in pristane-induced arthritis and antigen-induced pulmonary inflammation of rats[J]. Inflammation Research,2009,58(9):601-609.

[26] HASSANPOUR H,BAHADORAN S,FARHADFAR F, et al. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in lung and heart of pulmonary hypertensive chickens[J]. Poultry Science,2018,97(11): 4048-4056.

[27] REN J,ZHANG N N,LI X J,et al. Identification of reference genes for gene expression studies among different developmental stages of murine hearts[J]. BMC Developmental Biology,2021,21(1):13.

[28] GAN Y,YE F,HE X X. The role of YWHAZ in cancer: A maze of opportunities and challenges[J]. Journal of Cancer,2020,11(8):2252-2264.

[29] KIM S,PARK J Y,LEE H W,et al. *YWHAZ* and *TBP* are potential reference gene candidates for qPCR analysis of response to radiation therapy in colorectal cancer[J]. Scientific Reports,2023,13:12902.

[30] RUIGROK M J R,TOMAR J,FRIJLINK H W,et al. The effects of oxygen concentration on cell death,antioxidant transcription,acute inflammation,and cell proliferation in precision-cut lung slices[J]. Scientific Reports,2019,9:16239.

[31] FU L Y,JIA H L,DONG Q Z,et al. Suitable reference genes for real-time PCR in human HBV-related hepatocellular carcinoma with different clinical prognoses[J]. BMC Cancer,2009,9:49.

[32] SOUNBULI K,ALEKSEEVA L A,SEN'KOVA A V,et al. Tbp and Hprt1 are appropriate reference genes for splenic neutrophils isolated from healthy or tumor-bearing mice[J]. Biomedicines,2024,12(11):2571.

[33] SONG J,CHO J,PARK J,et al. Identification and validation of stable reference genes for quantitative real time PCR in different minipig tissues at developmental stages[J]. BMC Genomics,2022,23(1):585.