

染色质重塑因子ZNHIT1在小鼠胸腺稳态维持中的功能研究

范士林¹ 吕珂² 王艳丽³ 朱思婕¹ Mathias Hochgerner² 唐晓芳^{1,4*} 林鑫华^{1,4*} 魏伟^{4,5*}

(¹复旦大学生命科学学院, 上海 200438; ²复旦大学人类表型组研究院, 上海 200438;

³内蒙古大学生物医学研究院, 呼和浩特 010070; ⁴粤港澳大湾区精准医学研究院(广州), 广州 511458;

⁵四川大学华西医院, 呼吸和共病全国重点实验室, 呼吸与危重症医学科, 成都 610041)

摘要 胸腺是T细胞发育与中枢耐受建立的关键器官, 其结构与功能依赖胸腺上皮细胞(thymic epithelial cell, TEC)提供的微环境支持。随着年龄增长, 胸腺发生进行性退化, 表现为皮质-髓质分区紊乱、脂肪浸润。胸腺衰老会导致免疫功能下降, 而表观遗传调控异常被认为是胸腺退化的重要驱动因素之一。锌指蛋白HIT结构域蛋白1(zinc finger HIT domain-containing protein 1, ZNHIT1)是SRCAP染色质重塑复合物的关键亚基, 可介导组蛋白变体H2A.Z的沉积并影响靶基因转录, 但其在胸腺稳态维持中的作用尚不明确。该研究通过构建*Znhit1*在胸腺上皮细胞相关条件性敲除的小鼠模型, 系统分析了ZNHIT1在胸腺结构与功能维持中的作用。结果显示, ZNHIT1在胸腺上皮中的缺失导致小鼠胸腺显著萎缩, 皮质-髓质结构紊乱。流式分析显示, *Znhit1*条件性敲除鼠TEC总数减少, mTEC/cTEC值失调, 且具有干性的MHCII^{lo} mTEC亚群比例显著下降。机制上, ZNHIT1缺失抑制了TEC的增殖并促进了cTEC的凋亡。TEC功能的受损进一步导致T细胞发育阻滞于DN1期, CD4和CD8双阳性(double positive, DP)细胞数量剧减, 最终引起外周初始T细胞输出量不足及DNFB诱导的接触性超敏反应模型中的炎症反应加剧。综上所述, ZNHIT1对TEC群体维持与胸腺微环境稳态具有关键作用, 其缺失可导致胸腺退化并引发外周免疫失衡。该研究揭示了染色质重塑因子在胸腺稳态调控中的功能, 为理解胸腺退化的表观遗传机制提供了新的理论依据。

关键词 *Znhit1*; 胸腺上皮细胞; 胸腺退化; 表观遗传; T细胞发育

Functional Investigation of the Chromatin Remodeling Factor ZNHIT1 in the Maintenance of Homeostasis in the Mouse Thymus

FAN Shilin¹, LÜ Ke², WANG Yanli³, ZHU Sijie¹, Mathias Hochgerner², TANG Xiaofang^{1,4*}, LIN Xinhua^{1,4*}, WEI Wei^{4,5*}

(¹School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China; ²Institute of Human Phenome, Fudan University, Shanghai 200438, China; ³Institutes of Biomedical Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China; ⁴Greater Bay Area Institute of Precision Medicine (Guangzhou), Guangzhou 511458, China; ⁵Department of Respiratory and Critical Care Medicine, State Key Laboratory of Respiratory Health and Multimorbidity, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Thymus is the central organ for T cell development and the establishment of central tolerance. Its structure and function critically depend on the microenvironment provided by TEC (thymic epithelial cell). With

收稿日期: 2026-04-26 接受日期: 2026-06-25

广州市科技计划(批准号: 2024D03J0014)和广东省基础与应用基础研究基金(批准号: 2023A1515110474)资助的课题

*通信作者。Tel: 18023450519, E-mail: tangxiaofang@ipm-gba.org.cn; Tel: 021-31246580, E-mail: xlin@fudan.edu.cn; Tel: 028-61526696, E-mail: hxweiwei@wchscu.edu.cn

Received: April 26, 2026 Accepted: June 25, 2026

This work was supported by the Grants from the Science and Technology Program of Guangzhou (Grant No.2024D03J0014), and the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (Grant No.2023A1515110474)

*Corresponding authors. Tel: +86-18023450519, E-mail: tangxiaofang@ipm-gba.org.cn; Tel: +86-21-31246580, E-mail: xlin@fudan.edu.cn; Tel: +86-28-61526696, E-mail: hxweiwei@wchscu.edu.cn

aging, the thymus undergoes progressive involution, characterized by disorganized cortical-medullary architecture, adipose infiltration. Aging of the thymus leads to reduced immune function. Epigenetic dysregulation is recognized as a key driver of thymic involution. ZNHIT1 (zinc finger HIT domain-containing protein 1) is a core subunit of the SRCAP chromatin remodeling complex, mediating the deposition of the histone variant H2A.Z and influencing target gene transcription. However, its role in thymic homeostasis remains poorly defined. This study employed a mouse model with *Znhit1* conditionally knocked out in TECs to systematically investigate the function of ZNHIT1 in maintaining thymic structure and function. Results demonstrated that ZNHIT1 deficiency in thymic epithelium led to significant thymic atrophy and disruption of cortical-medullary compartmentalization. Flow cytometric analysis revealed a reduction in total TEC numbers, an imbalance in the mTEC/cTEC value, and a marked decrease in the proportion of the stem-like MHCII^{lo} mTEC subpopulation. Mechanistically, ZNHIT1 ablation inhibited TEC proliferation and promoted apoptosis specifically in cTECs. This functional impairment of TECs subsequently disrupted T cell development, causing a block at the DN1 stage, a dramatic reduction in CD4⁺CD8⁺ DP (double-positive) thymocytes, and ultimately, insufficient output of naïve T cells to the periphery. Consequently, mice exhibited exacerbated inflammatory responses in a DNFB-induced contact hypersensitivity. Collectively, these findings establish that ZNHIT1 is essential for maintaining the TEC compartment and thymic microenvironment homeostasis. Its deficiency triggers thymic involution and leads to peripheral immune dysregulation. This work elucidates the role of a chromatin remodeler in regulating thymic homeostasis, providing novel mechanistic insights into the epigenetic underpinnings of thymic involution.

Keywords *Znhit1*; TEC (thymic epithelial cell); thymic involution; epigenetics; T cell development

胸腺是适应性免疫系统的核心器官, 通过其高度保守的皮质-髓质立体结构, 引导T细胞经历TCR重排、阳性/阴性选择并分化为功能性淋巴细胞^[1]。胸腺上皮细胞(thymic epithelial cell, TEC)是构成这一微环境的关键基质细胞。其中, 皮质胸腺上皮细胞(cortical thymic epithelial cell, cTEC)主要参与早期胸腺细胞定植、T细胞谱系决定及阳性选择, 而髓质胸腺上皮细胞(medulla thymic epithelial cell, mTEC)则在阴性选择和中枢免疫耐受建立中发挥核心作用^[2-4]。mTEC和cTEC的相对组成比例在生理状态下维持动态平衡, 这种平衡一旦被破坏, 可能导致胸腺结构紊乱、T细胞发育异常以及免疫耐受受损。

胸腺功能状态直接决定机体的免疫潜能。感染、衰老、怀孕、应激等多种生理病理因素均可诱发胸腺急性或慢性萎缩, 导致初始T细胞输出减少, 外周T细胞库多样性下降, 使机体面临感染风险及免疫监视功能下降^[5-8]。胸腺衰老是免疫系统衰退的核心驱动因素, 其病理特征主要表现为进行性萎缩与结构紊乱, 包括皮髓质界限模糊、脂肪组织浸润及衰老细胞积累等^[9-11]。其分子机制错综复杂, 其中TEC功能障碍被认为是关键环节。研究表明, 表观

遗传修饰异常, 如组蛋白甲基化改变等, 是导致TEC关键转录因子(如FOXN1、AIRE)表达下调及胸腺退化的重要机制^[12-14]。

ZNHIT1作为染色质重塑复合物SNF2相关的CPB激活蛋白复合体(SNF-2 related CBP activator protein, SRCAP)的核心亚基, 通过介导组蛋白变体H2A.Z替换核小体中的H2A, 调控染色质开放状态及基因转录^[15-16]。既往研究表明, ZNHIT1在小鼠睾丸、肠道及造血干细胞的稳态维持中发挥关键作用^[17-20]。然而, ZNHIT1在胸腺中的生物学功能尚属空白。本研究通过构建胸腺上皮相关*Znhit1*条件性敲除小鼠模型, 系统探究ZNHIT1对胸腺结构稳态、TEC分化及T细胞发育的影响, 旨在为解析胸腺退化的表观遗传机制提供新视角。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究中所用到的小鼠遗传背景均为C57BL/6J。实验所用小鼠品系来源如下: *Znhit1*^{fl/fl}品系小鼠和*Rosa26-mTmG*报告鼠购于南京大学模式动物研究中心, *p63-CreERT2*工具鼠由浙江大学蒋明教授赠送。所有小鼠饲养于复旦大学实验动

物中心江湾分中心SPF级环境, 实验已获复旦大学实验动物中心江湾分中心实验动物管理和使用委员会批准(复生动物研批第2021JS0079)。

1.1.2 主要试剂 衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(货号: 40754ES60)购于上海翌圣生物科技股份有限公司。苏木素-伊红(H&E)试剂(货号: G1120)购于武汉赛维尔生物科技有限公司。磁珠法总RNA提取试剂盒(货号: Y1423)及反转录试剂盒(货号: KR118)购于天根生化科技(北京)有限公司。实时荧光定量PCR试剂(货号: B21202)购于Bimake公司。固定破膜试剂Transcription Factor Buffer Set(货号: 562574)购于BD公司。

KRT5(货号: A11396)购于爱博泰克生物科技有限公司。KRT8(TROMA-I)购于DHSB公司。DAPI(货号: D9542)购于Sigma公司。APC/Cyanine7标记抗鼠CD45(货号: 103115)、APC标记抗鼠CD3 ϵ (货号: 100311)、FITC标记抗鼠CD4(货号: 100405)、PerCP/Cyanine5.5标记抗鼠CD8a(货号: 100733)、Brilliant Violet 421标记抗鼠CD44(货号: 103039)、PE/Cyanine7标记抗鼠CD25(货号: 102015)、PE/Cyanine7标记抗鼠CD62L(货号: 104417)、PE/Cyanine7标记抗鼠I-A/I-E(货号: 107629)、PE标记抗鼠CD19(货号: 115507)、APC标记抗鼠CD326(货号: 107629)、PE标记抗鼠Ki67(货号: 151209)、PerCP/Cyanine5.5标记抗鼠Ly51(货号: 108315)均购于深圳市达科为生物技术股份有限公司。Biotinylated UEA-I(货号: B-1065-2)购于深圳欣博盛生物科技有限公司。Alexa Fluor 488标记驴抗兔IgG(货号: SA00013-6)、Alexa Fluor 594标记驴抗小鼠IgG(货号: SA00013-7)均购于武汉三鹰生物技术有限公司。Alexa Fluor 647标记驴抗大鼠IgG(货号: A78947)购于ThermoFisher Scientific公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型构建与诱导 将p63-CreERT2小鼠与*Znhit1*^{fl/fl}小鼠杂交, 构建基因型为*Znhit1*^{fl/fl};p63-CreERT2的实验组(cKO)及基因型为*Znhit1*^{fl/+};p63-CreERT2的对照组(CTRL)。选取6~8周龄小鼠, 腹腔注射他莫昔芬(溶于玉米油, 每天100 mg/kg), 连续注射5 d以诱导基因敲除。在他莫昔芬诱导完成后第7、14、21天分别取出小鼠胸腺进行实验。

1.2.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测*Znhit1* mRNA的表达情况 通过流式分选获得胸腺上皮

细胞(CD45⁻EpCAM⁺), 利用RNA提取试剂盒提取总RNA, 并使用反转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。随后采用RT-qPCR法检测*Znhit1*的mRNA表达水平。*Znhit1*和内参基因*Gapdh*的引物序列分别为:*Znhit1*-F(5'-CAG ACG GCG AGA CAA GTT C-3'), *Znhit1*-R(5'-CAA ACT GAG GTA GCC TCT TGC-3'), *Gapdh*-F(5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3'), *Gapdh*-R(5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3')。每个样本设置3个重复, 用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目标基因相对表达量。

1.2.3 组织学染色 苏木素&伊红(H&E)染色。胸腺组织用4%多聚甲醛4 °C避光固定12 h, 再依次经过30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%梯度酒精脱水和二甲苯透明后包埋入石蜡。石蜡切片依次经过二甲苯脱蜡, 100%、95%、90%、80%、70%梯度乙醇复水, 再进行苏木素-伊红染色。切片先在苏木素染液中室温条件下染色3 min, 随后迅速进行分化和返蓝, 最后转移至伊红染液中室温染色3 min。切片洗净封片后用显微镜观察。

油红O(oil red O)染色及 β -半乳糖苷酶染色。冰冻切片室温平衡后, 使用油红O工作液在室温进行避光染色, 以检测脂肪沉积情况; 或使用 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老情况。

免疫荧光。切片用柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复, 随后用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温下封闭2 h, 结束后4 °C过夜孵育一抗(KRT5、KRT8, 稀释比1:200)。第二天用PBST缓冲液洗去一抗, 加入荧光二抗(稀释比1:1 000), 室温孵育1 h, 最后用DAPI复染细胞核并封片干燥。切片由Olympus公司的激光共聚焦显微镜FV3000成像。

1.2.4 流式细胞术 将分离干净的胸腺组织放入预配制好的消化液(在RPMI 1640培养基中加入25 U/mL LiberaseTM和100 U/mL DNaseI)中37 °C消化30 min, 消化结束后加入20% FBS终止, 随后将细胞悬液通过40 μ m滤网, 得到单细胞悬液。对于细胞表面标志物染色, 所有表面标志物在4 °C下染色30 min, 然后立即用含1% BSA的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)洗涤并上机检测。对于Ki67染色, 细胞先使用Transcription Factor Buffer Set进行固定和破膜, 具体操作如下: 细胞用固定破膜缓冲液于室温孵育细胞30 min, 结束后用含1% BSA的PBS溶液洗涤

并加入破膜缓冲液重悬。随后加入Ki67抗体(稀释比1:200)4℃避光孵育30 min。染色结束后,细胞使用破膜缓冲液洗涤2次,最终重悬于PBS中并进行流式细胞术检测。

1.2.5 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)诱导接触性超敏反应 小鼠经他莫昔芬诱导后第15天于其左侧背部剃毛并单次涂抹50 μ L 0.5% DNFB(溶剂体系:丙酮/橄榄油=4:1)进行致敏处理。致敏后5 d,在小鼠右耳双侧涂抹10 μ L 0.3% DNFB溶液激发炎症反应,自激发日起连续14 d用游标卡尺动态监测耳廓厚度变化,并于第14天终点采集耳部组织及引流淋巴结进行组织病理学与流式细胞术分析。

1.2.6 公共空间转录组数据分析 公开胸腺空间转录组数据下载自GEO数据库(GSM7679867、GSM7679868),包含2月龄和18月龄C57BL/6野生型小鼠胸腺样本。数据由10 $\times$ Genomics Visium平台获得,参小鼠参考基因组GRCm38/mm10。使用Scanpy读取原始数据矩阵文件后,对每个样本分别过滤并保留总表达计数大于或等于1的空间位点,以及至少在1个空间位点中检测到表达的基因。随后,对保留的数据进行文库大小归一化处理并进行对数化转换。基于共同检测到的上皮标志基因*Epcam*、*Krt8*、*Krt18*、*Krt5*和*Krt14*计算每个空间位点的上皮特征评分,在每个样本内选取评分位于前20%的空间位点并将其定义为上皮富集位点。提取*Znhit1*在上述上皮富集位点中的对数归一化表达值,采用曼-惠特尼U检验(Mann-Whitney U test, MWU)和韦尔奇t检验(Welch t test, Welch t)比较年轻组与老年组的表达差异;同时将*Znhit1*表达值大于0的空间位点定义为阳性,采用Fisher's精确检验和卡方检验比较两组阳性位点比例的显著性差异。图形使用Seaborn和Matplotlib工具包绘制。

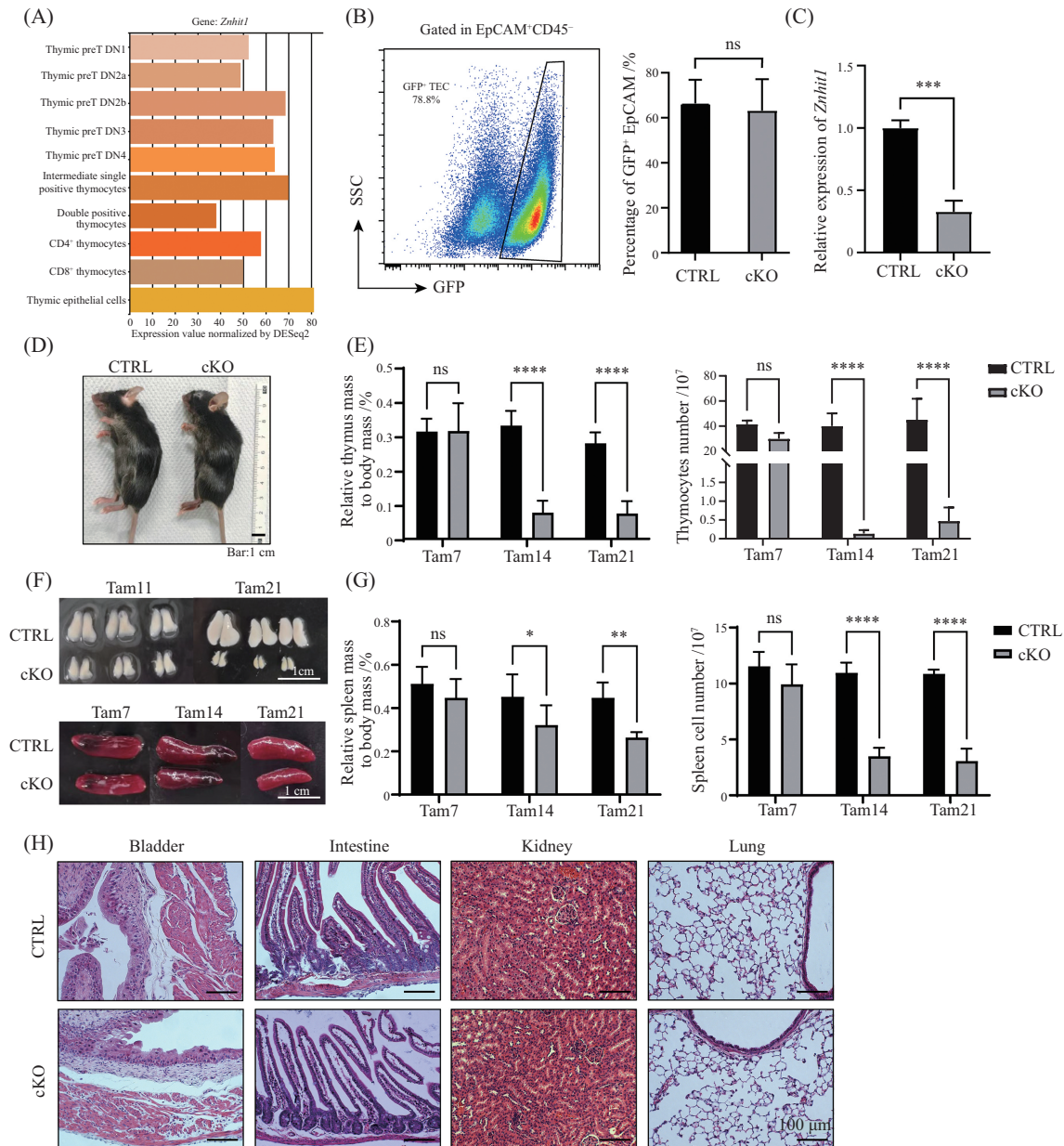
1.2.7 量化统计学分析 本研究所有结果均经过三次及以上独立实验重复验证。免疫荧光和苏木素-伊红染色等图像结果通过ImageJ软件统计分析。流式结果通过FlowJo软件统计分析。所有统计结果均由GraphPad Prism 9.3.0软件进行统计并进行显著性计算。统计图中每一个数据点代表一个独立样本,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)或者均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,采用GraphPad Prism 9.3.0进行t检验或Two-Way ANOVA分析。 $P<0.05$ 被视为差异具有显著性。

2 结果

2.1 胸腺上皮中ZNHIT1缺失导致胸腺显著萎缩与结构退化

ZNHIT1蛋白及SRCAP复合物通过调控组蛋白变体H2A.Z的替换,在干细胞命运决定及基因转录网络中承担重要角色。已有文献报道,ZNHIT1可促进肠上皮干细胞和造血干细胞的稳态维持^[17,20],但在胸腺中的功能尚不清晰。我们查阅文献发现,*Znhit1*基因在小鼠胸腺组织中的表达量非常高,仅次于睪丸组织,暗示其在胸腺中可能发挥关键作用^[18]。我们查询ImmGen数据库发现*Znhit1*在胸腺多种细胞类型中均有表达,其中在胸腺上皮细胞中表达量最高(图1A)。为探究ZNHIT1在胸腺上皮细胞中的作用,我们利用Cre-Loxp系统构建了*Znhit1*^{fl/fl};p63-CreERT2条件性敲除纯合子、*Znhit1*^{fl/fl};p63-CreERT2杂合子,以及*Znhit1*^{fl/fl}野生型小鼠。连续5 d对6~8周龄的小鼠进行腹腔注射他莫昔芬(Tamoxifen, Tam),以此诱导基因敲除。值得注意的是,相较于野生型小鼠,杂合子小鼠并未表现出异常,纯合子小鼠表现出显著的胸腺缩小,因此在后续的研究中,我们使用同窝杂合子小鼠(CTRL)作为纯合子敲除组(cKO)的对照。为了检测基因敲除水平,我们引入mTmG荧光报告小鼠与以上基因型小鼠进行杂交,并且利用流式细胞术检测了经他莫昔芬诱导7 d的小鼠胸腺上皮细胞中GFP阳性细胞的比例,结果显示,在EpCAM⁺CD45⁻胸腺上皮细胞群体中检测到70%~80%的GFP阳性细胞类群(图1B)。同时,分选TEC的RT-qPCR结果显示*Znhit1*表达水平在cKO组中显著下降(图1C),表明该模型可有效降低胸腺上皮中*Znhit1*水平。

表型观察显示,在他莫昔芬诱导后第14天(Tam14),相比于体态正常的CTRL小鼠,cKO小鼠开始出现系统性早衰样改变,包括背部佝偻、眼周脱毛以及四肢皮肤角质层异常增厚(图1D)。解剖后发现cKO小鼠的胸腺明显减小,其体质量不到CTRL小鼠的1/3(图1E和图1F),而其他器官如膀胱、小肠、肾脏和肺组织等与CTRL小鼠相比未见明显组织学差异(图1H)。细胞计数分析显示,cKO小鼠胸腺中最主要的细胞类群胸腺细胞数量较CTRL组下降了99%以上($P<0.0001$,图1E)。同时,作为外周次级淋巴器官的脾脏,其总细胞数也出现了50%~60%的显著下降($P<0.0001$,图1G)。值得注意的是,与诱导后



A: 基于ImmGen数据库分析*Znhit1*在6周野生型小鼠胸腺中不同细胞群的表达水平。横坐标表示ImmGen数据库中经DESeq2标准化处理后的表达值; B: *p63*-CreERT2;mTmG报告小鼠在他莫昔芬诱导后第7天, 流式细胞术分析胸腺上皮细胞中的GFP表达比例, 左为代表性流式图, 右为CTRL和cKO小鼠的GFP⁺ TEC统计; C: 腹腔注射他莫昔芬诱导第7天cKO小鼠和CTRL小鼠胸腺上皮的*Znhit1* mRNA相对表达水平; D: 腹腔注射他莫昔芬诱导第14天cKO小鼠和CTRL小鼠的表型变化; E: 他莫昔芬诱导后第7、14、21天小鼠胸腺质量变化和细胞数量变化; F: 他莫昔芬诱导后cKO小鼠和CTRL小鼠在他莫昔芬诱导后第7、14、21天的胸腺和脾脏表型变化; G: 他莫昔芬诱导后第7、14、21天小鼠脾脏质量变化和细胞数变化; H: 分别收取他莫昔芬诱导第21天的CTRL和cKO小鼠膀胱、小肠、肾脏、肺, 对其进行苏木素-伊红染色; $n \geq 3$, $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ 。

A: expression profile of *Znhit1* in different thymic cell populations of 6 weeks WT mouse based on the ImmGen database. The x-axis represents expression values normalized by DESeq2 from the ImmGen database; B: representative flow cytometry plot (left) and statistical analysis (right) showing GFP expression in EpCAM⁺CD45⁻ thymic epithelial cells from *p63*-CreERT2;mTmG reporter mice at 7 days post tamoxifen induction; C: relative level of *Znhit1* mRNA in the thymic epithelium of cKO mice and CTRL mice at 7 days post tamoxifen induction; D: phenotypic comparison between cKO and CTRL mice at 14 days post tamoxifen induction by intraperitoneal injection; E: phenotypic changes in thymus mass and total cell number at 7, 14, and 21 days post tamoxifen induction; F: phenotypic alterations in thymus and spleen of cKO mice relative to CTRL mice at 7, 14, and 21 days post tamoxifen induction; G: phenotypic changes in spleen mass and total cell number at 7, 14, and 21 days post tamoxifen induction; H: bladder, small intestine, kidney, and lung tissues from CTRL and cKO mice at 21 days posttamoxifen induction were subjected to H&E staining. $n \geq 3$, $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$ 。

图1 胸腺上皮中的*Znhit1*缺失后小鼠胸腺缩小

Fig.1 Thymic atrophy in mice after *Znhit1* deletion in thymic epithelium

第14天相比,第21天时cKO小鼠胸腺细胞数量的下降比例略有缓和。这可能与他莫昔芬在小鼠体内的代谢清除有关。他莫昔芬及其活性代谢产物的半衰期通常在7至14 d之间。在第14天时,Cre介导的基因重组和急性细胞丢失达到峰值;而到了第21天,随着体内药物浓度的衰减,重组效率降低,结合胸腺细胞高度动态更新的特性,部分未发生重组的细胞可能发生代偿,导致细胞数量下降的比例不再继续扩大(图1E和图1F)。

为了在组织学层面系统评估胸腺缩小的病理特征,我们收集了不同时间点的胸腺组织进行H&E染色。结果显示,正常CTRL小鼠的胸腺具有致密的皮质区和着色较浅的髓质区,皮髓质交界清晰。然而,cKO小鼠在Tam14时,皮质与髓质的界限彻底消失,组织结构呈现高度散乱状态,且血管周围空间异常扩大(图2A)。免疫荧光原位标记结果进一步证实,在CTRL组中呈经典内外分区排布的皮质胸腺上皮(cTEC, KRT8阳性)和髓质胸腺上皮(mTEC, KRT5阳性),在cKO小鼠中呈现极度分布紊乱、交织穿插的状态(图2C)。

值得注意的是,胸腺萎缩、皮髓质紊乱是典型胸腺年龄相关性退化的标志,通常伴随着脂肪浸润^[21-23]和细胞衰老。为此,我们对Tam21的胸腺冰冻切片进行了油红O染色和衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色。统计结果显示,cKO小鼠胸腺内脂滴大量积累,脂肪化区域面积显著扩大;同时,呈蓝色的SA- β -Gal阳性衰老细胞比例较CTRL组激增了一倍以上(图2B和图2D)。上述结果表明,Znhit1的缺失使得胸腺上皮无法维持正常的组织网络,导致了小鼠胸腺发生严重的早衰样胸腺退化表型。为进一步评估Znhit1与生理性胸腺衰老的关系,我们分析了公开数据库中胸腺的空间转录组数据。结果显示,在上皮富集区域中,Znhit1阳性空间位点的比例在18月龄小鼠胸腺中较2月龄小鼠胸腺下降(18.5% vs 11.5%),且其整体表达水平呈下降趋势(图2E和图2F),提示Znhit1可能与年龄相关胸腺退化有关。

2.2 ZNHIT1维持胸腺上皮细胞的亚群稳态与干性

鉴于p63-CreERT2主要靶向胸腺上皮细胞,我们利用流式细胞术对Tam21的胸腺单细胞悬液进行定量分析,以探究TEC的亚群变化。在总细胞层面上,虽然cKO小鼠胸腺总细胞数极低,但由于淋巴细胞的流失速度远超基质细胞,导致胸腺上皮细胞

(CD45-EpCAM⁺)在存活细胞中的相对比例显著升高(图3A),但其绝对数量较CTRL组已出现显著下降(图3B)。

为精确追踪敲除细胞的命运,我们引入了Rosa26-mTmG报告小鼠,在GFP阳性的细胞群中分析cTEC(EpCAM⁺UEA-1⁻)和mTEC(EpCAM⁺UEA-1⁺)的亚群变化^[24-25]。结果显示,ZNHIT1缺失打破了正常的上皮亚群平衡:cKO小鼠中mTEC相对比例下降,而cTEC比例被动升高,导致mTEC/cTEC值异常降低(图3C和图3D),说明cKO小鼠中胸腺微环境已经受到破坏。

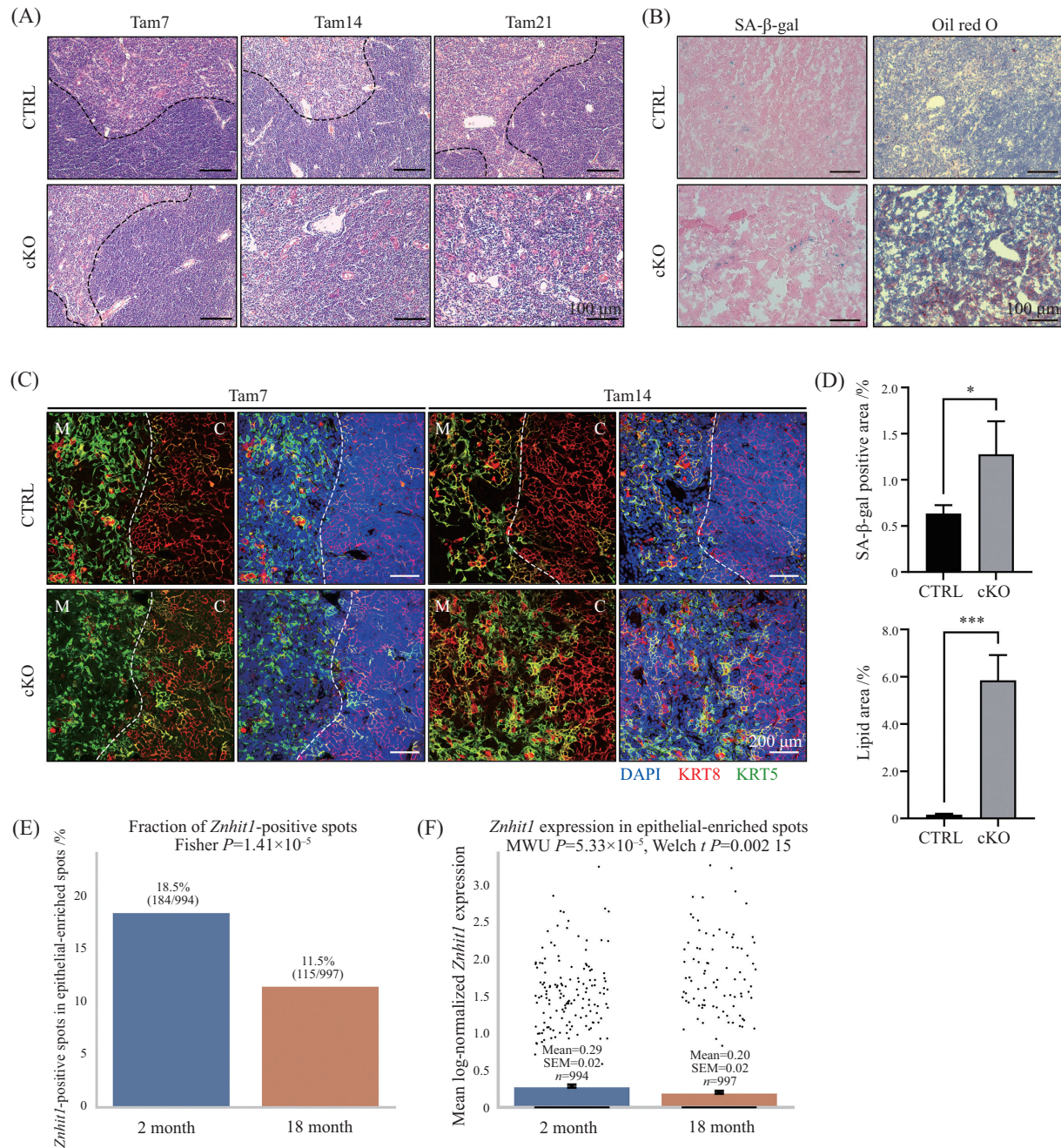
此外,依据MHCII分子的表达水平,成体小鼠mTECs可被划分为富集干性前体细胞的MHCII^{lo}亚群和具备抗原递呈功能的终末分化MHCII^{hi}亚群^[26-27]。流式分析结果显示,在cKO小鼠的mTEC群体中,具有干性特征的MHCII^{lo}亚群发生了显著缩减,而终末分化的MHCII^{hi}细胞占据了主导地位(图3E和图3F)。这提示ZNHIT1对于维持胸腺上皮细胞的干性池不可或缺,其缺失直接导致了上皮自我更新能力的枯竭。

2.3 ZNHIT1缺失抑制TEC增殖并诱导凋亡

为阐明TEC数量锐减的细胞生物学机制,我们从细胞增殖与凋亡两个维度进行了探究。考虑到此前有研究指出ZNHIT1可通过负调控Cdk6影响细胞周期进程^[28],我们利用流式细胞术检测了Tam21时TEC的生存状态。我们利用核内蛋白Ki67作为标志物,评估处于活跃增殖期细胞的比例。结果显示,cKO小鼠中无论是cTEC还是mTEC,其增殖细胞比例均大幅下降,不足对照组的10%(图4A和图4C)。这一结果与ZNHIT1在其他干细胞中调控细胞周期的功能一致,说明ZNHIT1对于维持TEC的增殖活性至关重要。随后,我们评估了ZNHIT1缺失对TEC细胞凋亡的影响,Annexin V/PI染色显示,ZNHIT1缺失显著增加了cTEC细胞早期凋亡的趋势,对cTEC的晚期凋亡和mTEC的凋亡水平则无显著影响(图4B和图4D)。另外,对CTRL和cKO小鼠的组织切片进行原位Caspase3染色,也同样发现皮质区域凋亡水平增加,与流式结果一致(图3E和图3F)。

2.4 TEC功能受损阻滞T细胞发育

胸腺上皮细胞的重要功能是支持T淋巴细胞的发育。cKO小鼠的TEC网络严重受损,因此我们检测了这种基质缺陷对T细胞发育轨迹的继发性影响。

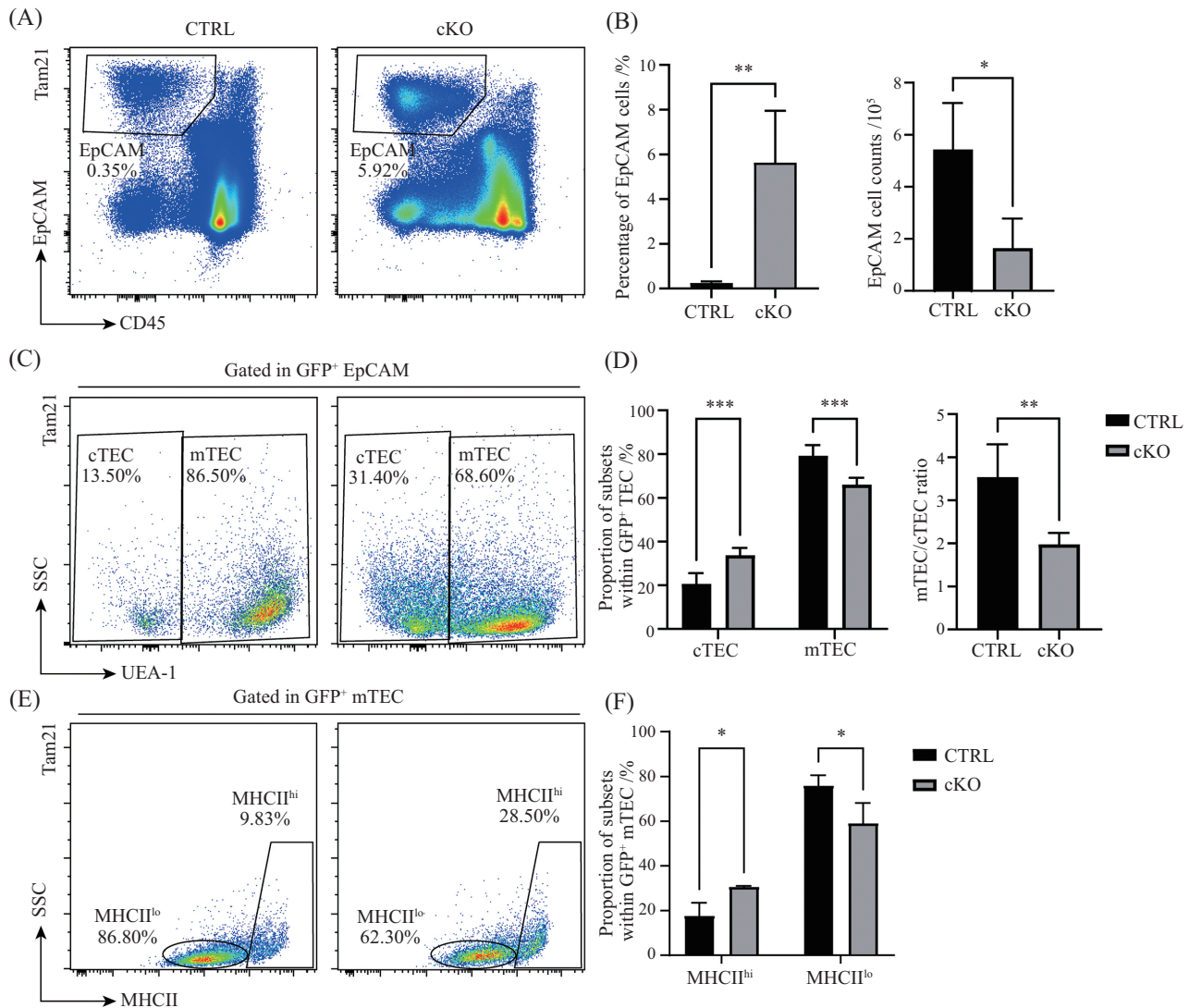


A: 分别收取他莫昔芬诱导后第7、14、21天的CTRL和cKO小鼠胸腺, 对其进行苏木素-伊红染色; B: 收取他莫昔芬诱导第21天的CTRL和cKO小鼠胸腺, 对其进行 β -半乳糖苷酶染色(蓝色, 左图)和油红O染色(红色, 右图); C: 收取他莫昔芬诱导第7天和14天的CTRL和cKO小鼠胸腺, 对其进行免疫荧光染色。M代表胸腺髓质区域, C代表胸腺皮质区域。图中DAPI(蓝色)标记细胞核, KRT5(绿色)标记髓质胸腺上皮细胞, KRT8(红色)标记皮质胸腺上皮细胞; D: 对B中SA- β -gal区域和脂肪区域面积的统计学分析。 $n \geq 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$; E: 空间转录组数据分析2月龄与18月龄小鼠胸腺上皮中*Znhit1*阳性空间位点的比例比较; F: 2月龄小鼠和18月龄小鼠具有上皮富集特征的空间位点中*Znhit1*的表达水平比较。散点表示单个空间位点的标准化对数表达值, 误差棒表示均值 $\pm$ 标准误。

A: H&E staining of thymic tissues from CTRL and cKO mice harvested at 7, 14 and 21 days posttamoxifen induction; B: thymuses were collected from CTRL and cKO mice at 21 days posttamoxifen induction (Tam21), and then stained with β -galactosidase (blue, left) and Oil red O (red, right); C: immunofluorescence staining of thymic tissues from CTRL and cKO mice harvested at 7 and 14 days posttamoxifen induction. Immunofluorescence characterization of thymic epithelial subpopulations. M is medullary region of the thymus; C is cortical region of the thymus. DAPI (blue): nuclear counterstain; KRT5 (green): mTEC (medullary thymic epithelial cell); KRT8 (red): cTEC (cortical thymic epithelial cell); D: statistical analysis of the area of SA- β -gal region and lipid region in B. $n \geq 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$; E: comparison of the proportion of *Znhit1*-positive spots in thymic epithelium between 2-month-old and 18-month-old mice based on spatial transcriptomic data; F: comparison of *Znhit1* expression in epithelial-enriched spots between 2-month-old and 18-month-old mice. Each dot represents the normalized log-transformed expression value of an individual spot, and bars indicate mean $\pm$ SEM.

图2 *Znhit1*缺失导致胸腺上皮结构破坏及皮质-髓质分区异常

Fig.2 *Znhit1* ablation disrupts thymic epithelial architecture and cortico-medullary zonation



A: Tam21对照组(CTRL)与条件性敲除(cKO)中胸腺上皮细胞(TEC, CD45⁺EpCAM⁺)的流式细胞术门控策略; B: A中总胸腺上皮细胞比例(左)和细胞数(右)统计; C: 髓质胸腺上皮细胞(mTECs, UEA1⁺Ly51⁻)和皮质胸腺上皮细胞(cTEC, UEA1⁻Ly51⁺)的亚群分析; D: C中胸腺上皮细胞亚群的比例统计(左)和mTEC/cTEC亚群的比例分布(右); E: mTEC亚群的进一步流式分析, MHCII^{hi}和MHCII^{lo}; F: mTEC不同亚群比例的统计。每组 $n \geq 3$ 只小鼠。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: flow cytometric gating strategy for TEC (CD45⁺EpCAM⁺) in CTRL and cKO; B: quantification of total TEC frequency (left) and absolute count (right) from A; C: subset analysis of medullary TEC (mTEC, UEA1⁺Ly51⁻) and cortical TEC (cTEC, UEA1⁻Ly51⁺); D: statistical analysis of the proportion of thymic epithelial cell subsets in C (left) and the ratio of mTEC/cTEC subsets (right); E: high-resolution profiling of mTEC populations, MHCII^{lo} and MHCII^{hi}; F: statistical comparison of mTEC subset frequencies. $n \geq 3$ mice per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

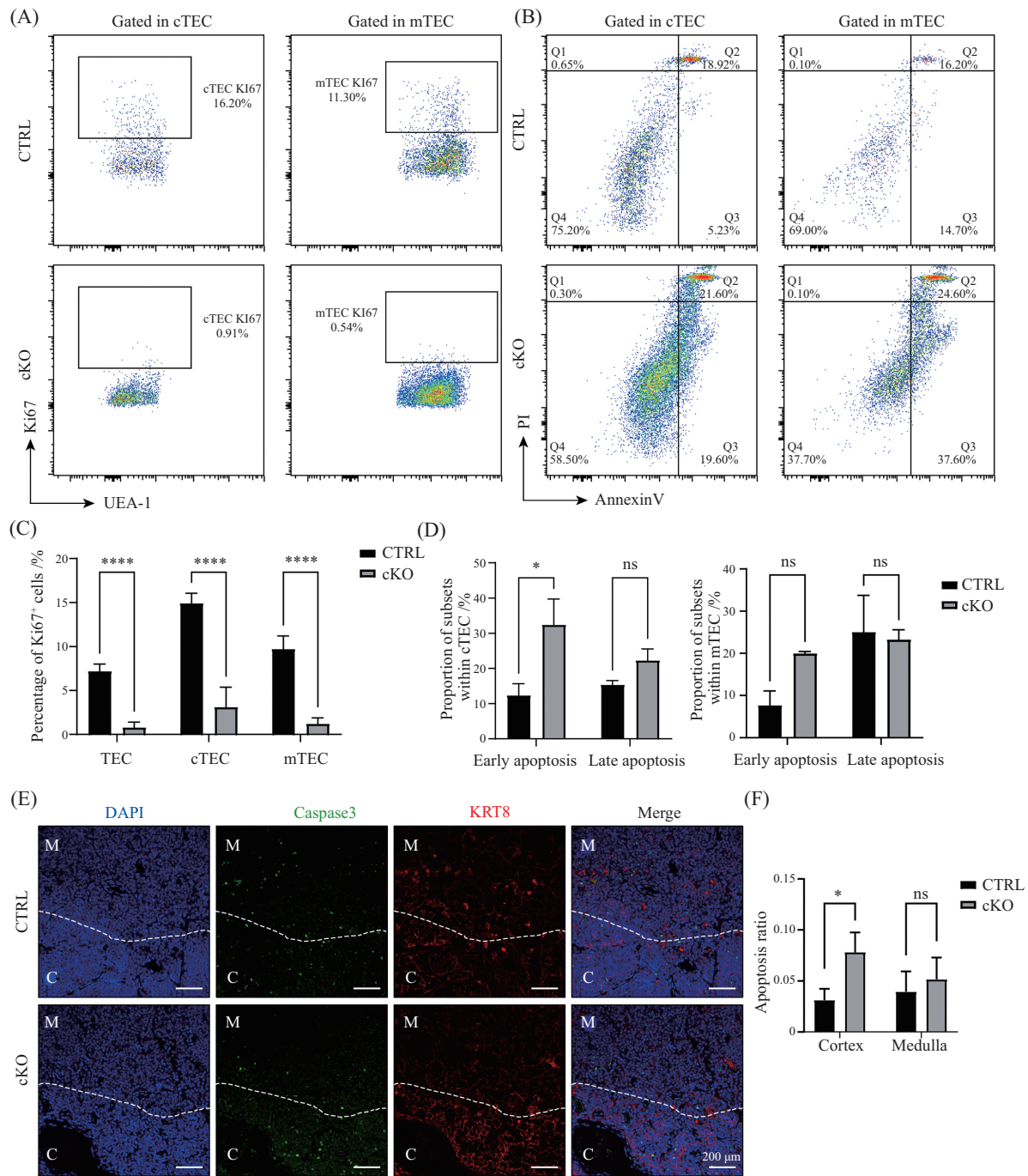
图3 *Znhit1*基因敲除破坏了TEC亚群的细胞组成

Fig.3 *Znhit1* ablation disrupts TEC subpopulation composition

在正常的胸腺发育历程中,早期胸腺祖细胞(early thymic progenitor, ETP)进入胸腺后,会依次经历双阴性阶段[DN(double negative), CD4⁻CD8⁻]、双阳性阶段[DP(double positive), CD4⁺CD8⁺],最终经阳性和阴性选择发育为单阳性T细胞[SP(single positive), CD4⁺或CD8⁺]^[29]。流式细胞分析显示,他莫昔芬诱导14 d后, cKO小鼠胸腺内DP细胞的比例发生显著下降,从正常情况下的约80%锐减至50%;相应地,

尚未表达CD4和CD8受体的DN细胞比例被动升高(图5A~图5C)。这一表型暗示我们T细胞的发育可能被阻断在了极早期阶段。

为了精确定位阻滞发生的节点,我们利用表面标志物CD44和CD25将DN细胞进一步细分为DN1(CD44⁺CD25⁻)、DN2(CD44⁺CD25⁺)、DN3(CD44⁻CD25⁺)和DN4(CD44⁻CD25⁻) 4个连续阶段。流式分析结果显示, cKO小鼠胸腺内的T细胞发



A: 流式检测Ki67阳性的增殖细胞(UEA-1用于亚群标记); B: 流式细胞术检测皮质胸腺上皮细胞(cTEC)和髓质胸腺上皮细胞(mTEC)的凋亡情况(Annexin V标记早期凋亡, PI标记晚期凋亡); C: 总TEC、cTEC及mTEC中Ki67阳性细胞比例; D: B图中cTEC和mTEC的凋亡情况的比例统计; E: 收取他莫昔芬诱导第21天的CTRL和cKO小鼠胸腺, 对其进行免疫荧光染色。图中DAPI(蓝色)标记细胞核, Caspase3(绿色)标记凋亡细胞, KRT8(红色)标记皮质胸腺上皮细胞。M代表胸腺髓质区域, C代表胸腺皮质区域; F: 对图4E中凋亡细胞的统计。每组 $n \geq 3$ 只小鼠。 $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$ 。

A: flow cytometry analysis of Ki67 positive proliferating cells in cTEC and mTEC (UEA-1 staining for subset identification); B: flow cytometry analysis of apoptosis in cortical (cTEC) and medullary (mTEC) thymic epithelial cells, gated based on Annexin V (early apoptosis) and PI (late apoptosis) staining; C: percentage of Ki67 positive cells in total TEC, cTECs, and mTEC; D: statistical analysis of apoptosis in cortical (cTEC) and medullary (mTEC) thymic epithelial cells; E: immunofluorescence staining of thymic tissues from CTRL and cKO mice harvested at 21 days posttamoxifen induction. Immunofluorescence characterization of thymic epithelial subpopulations, DAPI (blue): nuclear counterstain; Caspase3 (green): apoptotic cells; KRT8 (red): cTEC; M is medullary region of the thymus; C is cortical region of the thymus; F: quantification of apoptotic cells in Fig.4E. $n \geq 3$ mice per group. $^{ns}P > 0.05$, $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$ 。

图4 *Znhit1*缺失对皮质和髓质胸腺上皮细胞凋亡及增殖的影响

Fig.4 Effect of *Znhit1* ablation on apoptosis and proliferation of cTEC and mTEC

育停滞在了DN1期,而DN3和DN4时期细胞比例则显著降低(图5D~图5F)。

有文献报道, DN1向DN2的过渡依赖于cTEC提供的Notch配体(如Dll4)以及各类趋化因子(如Ccl25)的生存信号^[30-31],这一发育阻滞表型与我们在2.2节观察到的cTEC大量减少相互佐证。相较于CTRL,在Tam7时,cKO小鼠胸腺的体质量和胸腺细胞数量保持不变,而在Tam14时,胸腺显著缩小,胸腺细胞数也显著减少(图1)。在Tam7时,cKO小鼠T细胞的数量和发育状态并无异常,而在Tam14时,cKO小鼠T细胞数量显著减少,且发育阻滞。这些结果说明,上皮细胞中*Znhit1*对TEC的存活至关重要,TEC细胞死亡后,作为结果,T细胞数量自然就发生了明显的下降。ZNHIT1缺失损伤了诱导T细胞谱系定向分化的皮质微环境,导致了后续T细胞的发育过程受阻。

2.5 TEC中ZNHIT1缺失导致外周T细胞数量减少

T细胞在胸腺中发育阻滞很有可能影响到机体全身免疫系统的稳态,为了探究胸腺上皮微环境的紊乱对外周T细胞库的远端影响,我们收取了他莫昔芬诱导第7天和第14天小鼠的脾脏进行免疫表型分析(图6A)。与我们在图1和图5中得到的结果相符,流式结果显示,在敲除早期的Tam7阶段,cKO小鼠脾脏内CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞的绝对数量及相对比例与CTRL组相比尚无显著变化(图6B和图6C)。然而,在Tam14阶段,cKO小鼠脾脏内CD4⁺与CD8⁺T细胞的绝对数量均发生了显著下降,均不足CTRL小鼠的一半(图6B和图6D)。这提示我们胸腺萎缩导致初始T细胞输出中断。

T细胞的活化与分化是启动适应性免疫应答的核心步骤。为了评估外周T细胞的分化情况,我们利用细胞表面分子CD44和CD62L的双参数逻辑设门,将外周T细胞精准划分为初始T细胞(naïve T, CD44⁻CD62L⁺)、中枢记忆T细胞(central memory T, CM, CD44⁺CD62L⁺)和效应记忆T细胞(effector memory T, EM, CD44⁺CD62L⁻)。流式统计发现无论是敲除后7 d还是14 d cKO小鼠的外周T细胞的分化情况均无异常,其naïve、CM以及EM亚群的相对分布比例均与CTRL小鼠无统计学差异($P>0.05$,图6E~图6H)。值得注意的是,在胸腺衰老导致的胸腺T细胞输出下降后,机体会通过一系列稳态代偿机制来维持外周免疫池的稳定^[32-33]。因此,在这里我们推测短期内T细胞的分化状态未见明显变化,可能与机体在衰老状

态下维持外周免疫稳态的代偿机制相关。

总结来说,TEC中*Znhit1*敲除导致初始T细胞输出外周数量显著下降,使外周T细胞池萎缩。

2.6 ZNHIT1缺失诱发外周免疫炎症反应

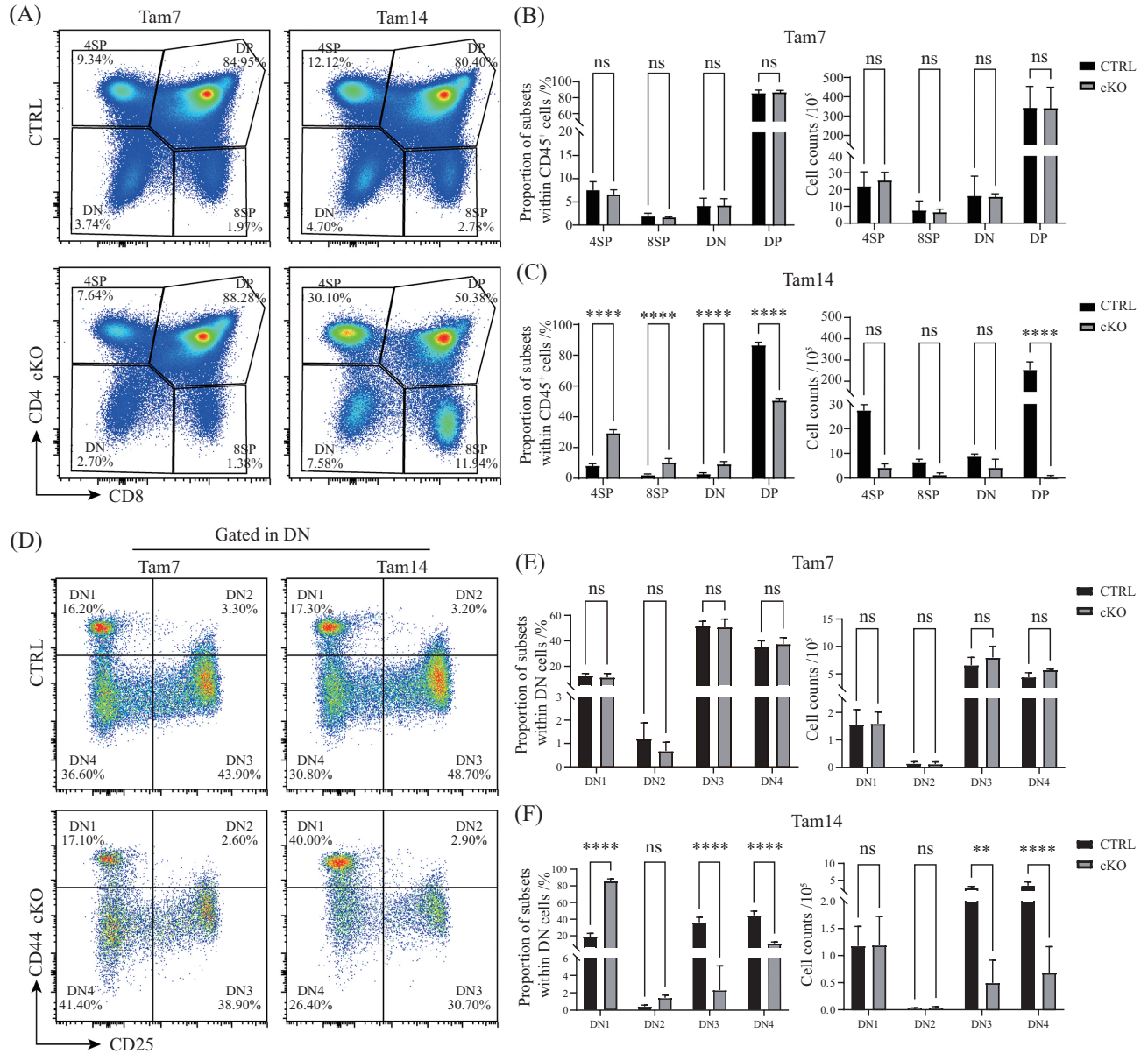
胸腺上皮细胞缺失*Znhit1*导致T细胞发育受损和外周初始T细胞输出减少。尽管这些外周T细胞的分化能力与CTRL小鼠的T细胞短期内相比并无异常,但外周初始T细胞库的显著缩小是否影响机体整体免疫功能尚不明确。为探究此问题,我们利用DNFB建立了接触性超敏反应(contact hypersensitivity, CHS)模型(图7A)。结果显示,CTRL小鼠在激发后耳部厚度迅速增加,于第7~9天达到炎症峰值,随后启动免疫消退机制,肿胀逐渐缓解(图7B),展现了健康机体正常的自限性炎症反应。与之不同的是,尽管cKO小鼠体内缺乏成熟T细胞,其耳部炎症在激发后第6天表现出炎症加剧,耳部厚度远超对照组且迟迟无法消退(图7B)。

为了解析这种现象,我们在激发第14天取受损耳组织进行胶原酶消化并开展流式细胞学分析。结果显示,浸润在cKO小鼠耳部的免疫细胞,其中绝大多数(>90%)为表达CD24⁺Ly6G⁺标志物的中性粒细胞(图7C和图7D),提示其正处于强烈的炎症反应状态。综上所述,*Znhit1*缺失导致小鼠产生更严重的炎症。

3 总结和讨论

本研究通过构建胸腺上皮细胞相关性*Znhit1*条件性敲除的小鼠模型,系统性地阐明了染色质重塑复合物核心亚基ZNHIT1在维持胸腺稳态、调控T细胞发育以及保障外周免疫稳态中的重要作用。我们的发现可以概括为3个层面:在器官层面,*Znhit1*缺失诱发了胸腺萎缩、骨髓质界限消失及脂肪浸润;在细胞层面,其缺失阻遏了TEC的细胞周期,诱导cTEC凋亡并导致具有干性的mTEC祖细胞库枯竭;在免疫功能层面,受损的胸腺微环境不仅将T细胞发育阻滞在DN1阶段,更导致了外周免疫调控失衡,表现为在接触性皮炎模型中加剧了中性粒细胞浸润。本研究首次将ZNHIT1介导的表观遗传调控与胸腺退化直接联系起来。

哺乳动物的胸腺会经历年龄相关性退化,其核心病理机制被认为是胸腺上皮细胞表型及功能的进行性丧失^[6,10]。既往研究提示,TEC的衰老伴随着



A: CD4/CD8双参数流式分析胸腺T细胞发育阶段, CD4⁺CD8⁻(DN期)、CD4⁺CD8⁺(DP期)、CD4⁺CD8⁻(4SP期)、CD4⁺CD8⁺(8SP期)细胞群分布; B、C: Tam7(B)和Tam14(C)胸腺中DN、DP、4SP和8SP期细胞比例及绝对数量统计; D: CD44/CD25双参数流式分析DN期T细胞发育, CD44⁺CD25⁻(DN1)、CD44⁺CD25⁺(DN2)、CD44⁻CD25⁺(DN3)、CD44⁻CD25⁻(DN4)细胞群分布; E、F: Tam7(E)和Tam14(F)胸腺中DN1~4期细胞比例及绝对数量统计。每组 $n \geq 3$ 只小鼠。ns $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

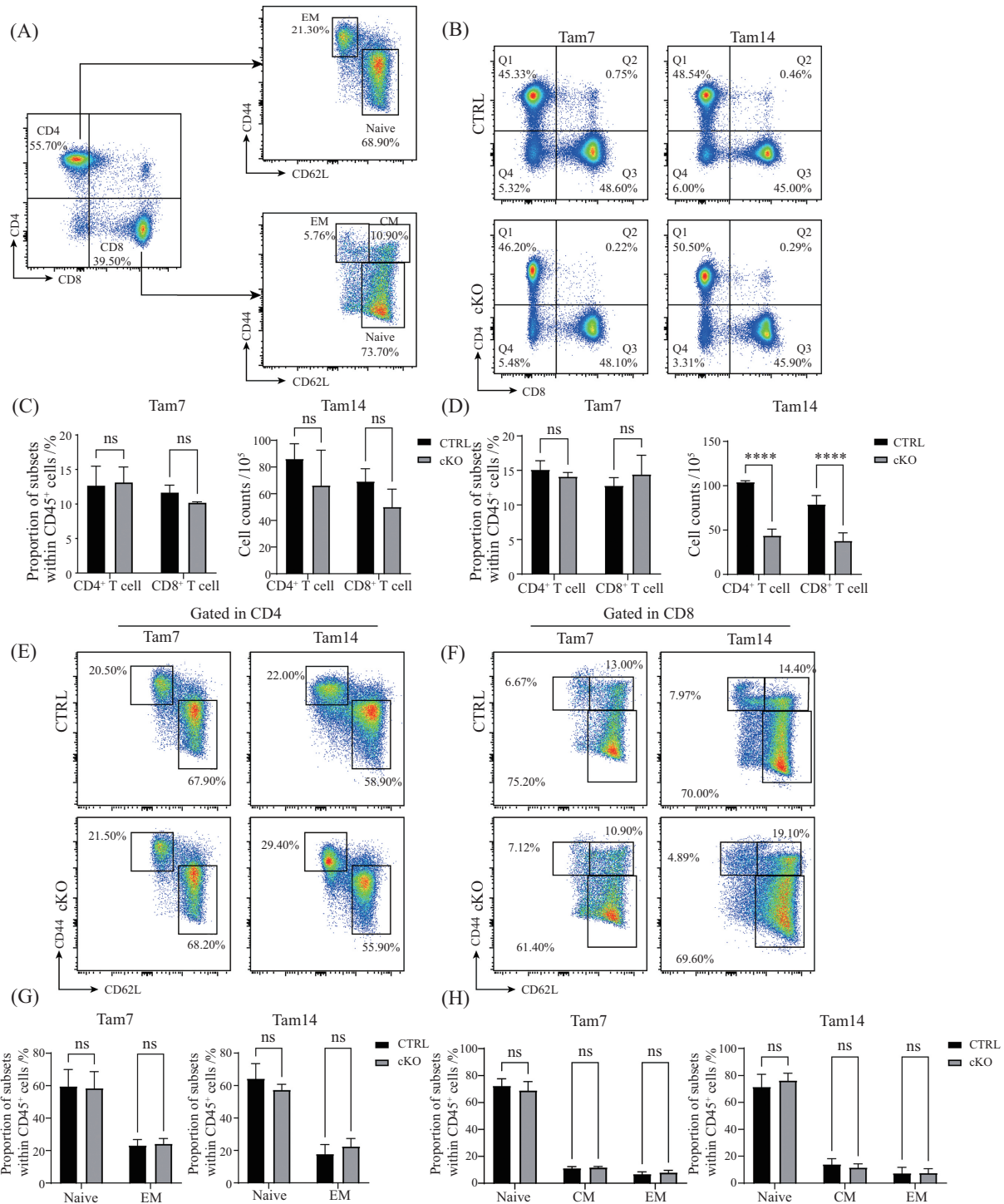
A: flow cytometric analysis of thymocyte development by CD4/CD8 staining. Populations: CD4⁺CD8⁻ (DN), CD4⁺CD8⁺ (DP), CD4⁺CD8⁻ (4SP), CD4⁺CD8⁺ (8SP); B,C: statistical analysis of proportions and absolute counts of DN, DP, 4SP, and 8SP stage cells in the thymus at Tam7 (B) and Tam14 (C); D: flow cytometric analysis of DN subsets by CD44/CD25 staining. Populations: CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3), CD44⁻CD25⁻ (DN4); E,F: statistical analysis of proportions and absolute counts of DN1~4 subsets in the thymus at Tam7 (E) and Tam14 (F). $n \geq 3$ mice per group. ns $P > 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图5 *Znhit1*诱导敲除后胸腺中T细胞发育阻断DN1期

Fig.5 *Znhit1* knockout blocks thymic T-cell development at DN1 stage

全局组蛋白修饰的改变, 如H3K27me3异染色质修饰的积累, 进而导致转录因子*Foxn1*的表达沉默^[34]。H2A.Z的动态沉积通常富集于活跃转录基因的启动子和增强子区域, 对于维持染色质的开放状态和基因表达至关重要^[16,35]。

在本研究中, cKO小鼠表现出经典的胸腺衰老表型。我们推测, ZNHIT1的缺失阻碍了H2A.Z在染色质上的正常沉积, 可能导致TEC维持谱系特征与细胞周期的关键靶基因(例如转录因子*Foxn1*及抗凋亡分子家族等)启动子及增强子区域的染色质重塑

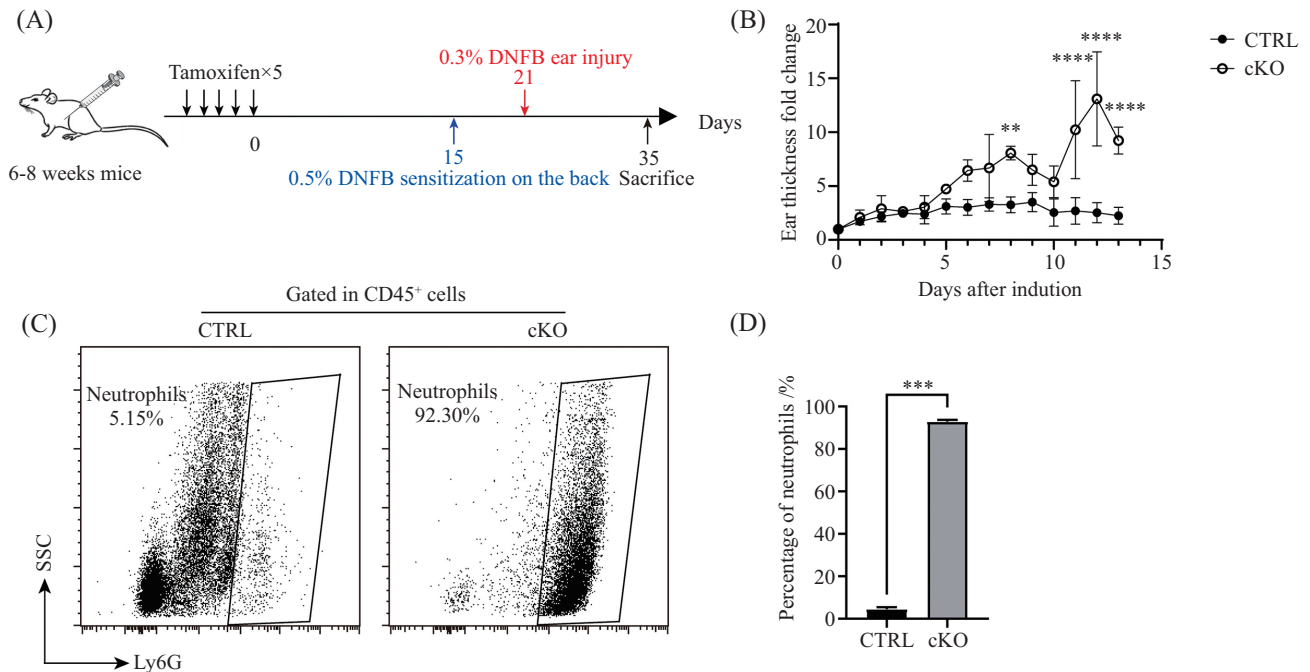


A: 圈门逻辑, CD4⁺和CD8⁺细胞群分别代表CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞, 通过CD44/CD62L双设门流式分析T细胞分化状态, CD44⁺CD62L⁺: 初始T细胞(naïve T); CD44⁺CD62L⁻: 中枢记忆T细胞(central memory T, CM); CD44⁻CD62L⁻: 效应T细胞(effector T, EM); B~D: 脾脏中CD4⁺和CD8⁺ T细胞的流式分析图(B)及比例和数量统计(C、D); E、G: CD4⁺ T细胞各分化阶段的流式分析图(E)及比例和数量统计(G); F、H: CD8⁺ T细胞各分化阶段的流式分析图(F)及比例和数量统计(H); 每组 $n \geq 3$ 只小鼠。ns $P > 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

A: gating logic, CD4⁺ and CD8⁺ cell populations represent CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, respectively; the differentiation status of T cells was analyzed by flow cytometry with dual gating on CD44/CD62L: CD44⁺CD62L⁺ (naïve T cells), CD44⁺CD62L⁻ (central memory T cells, CM), CD44⁻CD62L⁻ (effector T cells, EM); B-D: flow cytometric analysis (B) and quantification (C,D) of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the spleen; E,G: flow cytometric analysis (E) and quantification (G) of CD4⁺ T cells at each differentiation stage; F,H: flow cytometric analysis (F) and quantification (H) of CD8⁺ T cells at each differentiation stage. $n \geq 3$ mice per group. ns $P > 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

图6 *Znhit1*诱导敲除对小鼠外周T细胞分化无显著影响

Fig.6 Conditional knockout of *Znhit1* has no significant impact on peripheral T-cell differentiation



A: 实验设计流程图。6~8周龄小鼠经5次他莫昔芬处理后,第15天背部用0.5% DNFB致敏,第21天耳部用0.3% DNFB刺激,第35天处死小鼠; B: 耳部厚度动态变化; C、D: 耳组织中性粒细胞流式分析图(C)及统计结果(D), Ly6G⁺细胞群代表中性粒细胞; 每组 $n \geq 3$ 只小鼠。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: experimental workflow. 6-8 week-old mice were treated with tamoxifen five times, followed by sensitization with 0.5% DNFB on the back on day 15. The ears were challenged with 0.3% DNFB on day 21, and the mice were sacrificed on day 35; B: ear thickness dynamics; C,D: flow cytometry of ear neutrophils (C) and statistics (D), Ly6G⁺ population indicates neutrophils. $n \geq 3$ mice per group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图7 *Znhit1*条件性敲除增强接触性超敏反应的中性粒细胞炎症

Fig.7 *Znhit1* conditional knockout potentiates neutrophilic inflammation in contact hypersensitivity

失败,进而发生表观遗传层面的异染色质化沉默。这种转录网络的全面崩溃不仅阻遏了TEC的细胞周期进程,诱发了早衰样改变,更从分子层面解释了为何MHCII^{lo}干性细胞群快速消耗^[26,28],以及皮质区缺乏足够的Notch配体信号来支撑外周祖细胞的T谱系承诺信号^[30-31]。因此,我们推测*Znhit1*可能在决定胸腺的衰老以及由此影响的免疫系统的衰老方面起着关键作用。

本研究中另一个显著的表现是T细胞发育被阻滞在了最早期的DN1阶段。T淋巴细胞本身不具备自主发育的能力,其每一次谱系承诺和分化都依赖微环境基质细胞的信号支持。早期胸腺祖细胞(ETPs)进入胸腺后,首先进入皮质区域,此时cTEC通过表达*Dll4*向祖细胞传递NOTCH1信号,以迫使骨髓前体细胞走向T细胞发育谱系^[29,36-38]。流式数据表明,TEC的增殖明显受到抑制,我们还观察到cTEC细胞凋亡的趋势有所增加。而cTEC的死亡意味着皮质区Notch配体及趋化因子的局部浓度降低,

发育微环境不能提供足够的信号支持。这解释了T细胞为何无法完成从DN1向DN2的发育阶段,也提示我们ZNHIT1促进cTEC存活及抑制其凋亡的功能,是T细胞发育上游阶段的重要靶点。

此外,我们利用DNFB诱导接触性超敏反应模型时,观察到了一个看似矛盾的现象:尽管*Znhit1*敲除切断了胸腺中绝大部分T细胞的输出,外周初始T细胞数量枯竭,但cKO小鼠在遭受化学刺激时,耳部的炎症反应反而比免疫系统健全的对照组更为猛烈,且浸润了大量的中性粒细胞。在经典CHS模型中,正常胸腺会持续输出胸腺源性调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)抑制Th1和Th17细胞招募中性粒细胞,以维持外周耐受并抑制过度炎症^[39-40],在我们的模型中*Znhit1*在TEC中的缺失导致了cTEC和mTEC细胞数量减少以及上皮结构崩塌,髓质上皮负责自身免疫耐受和Treg细胞的发育,*Znhit1*缺失可能切断了Treg的供应并导致Treg发育不良,导致原本由Treg压制的固有免疫系统失去了刹车机制,无

法调节巨噬细胞从M1到M2的转变。第14天强烈的中性粒细胞浸润表明炎症的消退受到了阻碍,进而诱发了失控的组织级联炎症反应。结果提示我们,胸腺上皮ZNHIT1的缺失最终导致了机体从“免疫防御状态”滑向了“病理性炎症状态”。

综上所述,本研究不仅确立了ZNHIT1作为胸腺上皮细胞功能与稳态维持的关键表观遗传调控因子,更将组蛋白重塑机制与胸腺退化的器官级病理过程紧密关联。这一发现为深入理解机体免疫衰老的分子基础提供了崭新的理论线索。鉴于胸腺萎缩是导致老年人免疫力低下及肿瘤易感性增加的核心诱因,靶向ZNHIT1或调控H2A.Z的相关通路,未来极有可能成为延缓胸腺早衰、改善临床应激状态下免疫功能重塑的新型干预策略。

4 本研究的局限性

最后,本研究仍存在一定的局限性,由于*p63*启动子在全身复层上皮中均有一定表达,在DNFB诱导的CHS模型中观察到的过度炎症表型很可能是多种因素共同作用的结果:缺乏*Znhit1*的皮肤表皮内在结构或功能缺陷可能会在DNFB损伤下加剧屏障破坏,刺激局部产生招募中性粒细胞的趋化因子。同时严重胸腺退化引起的免疫反应失调使得炎症反应失去“刹车片”,加剧炎症失控。此外,鉴于*p63*启动子驱动的Cre酶表达覆盖了cTEC和mTEC谱系,本研究目前尚未能严格区分ZNHIT1在这两种TEC亚群中发挥作用的独立分子机制。未来我们将引入针对cTEC特异的 $\beta 5t$ -Cre或针对mTEC特异的*Aire*-Cre工具鼠,以实现更精细的谱系命运解析,并结合转录组学等多组学技术,进一步锚定ZNHIT1/H2A.Z调控胸腺上皮稳态的具体分子靶标。

参考文献 (References)

- [1] Boehm T, Swann J B. Origin and evolution of adaptive immunity [J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2014, 2: 259-283.
- [2] Sun L, Luo H, Li H, et al. Thymic epithelial cell development and differentiation: cellular and molecular regulation [J]. Protein & Cell, 2013, 4(5): 342-355.
- [3] Rodewald H R. Thymus organogenesis [J]. Annual Review of Immunology, 2008, 26: 355-388.
- [4] Leng F, Huoh Y S, Hur S. Multimerizing transcription factors FOXP3 and AIRE as chromatin architectural regulators [J]. Nature Immunology, 2026, 27: 900-911.
- [5] Lynch H E, Goldberg G L, Chidgey A, et al. Thymic involution and immune reconstitution [J]. Trends in Immunology, 2009, 30(7): 366-373.
- [6] Chen L, Xiao S, Manley N R. Foxn1 is required to maintain the postnatal thymic microenvironment in a dosage-sensitive manner [J]. Blood, 2009, 113(3): 567-574.
- [7] Santamaria J C, Irla M. Age-related thymic involution: mechanistic insights and rejuvenating approaches to restore immune function [J]. Science Advances, 2026, 12(7): eacb2970.
- [8] Goyani P, Christodoulou R, Vassiliou E. Immunosenescence: aging and immune system decline [J]. Vaccines, 2024, 12(12): 1314.
- [9] Thomas V, Ann V G, Alice D, et al. Dynamic changes in epithelial cell morphology control thymic organ size during atrophy and regeneration [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 4402.
- [10] Gui J, Mustachio L M, Su D M, et al. Thymus size and age-related thymic involution: early programming, sexual dimorphism, progenitors and stroma [J]. Aging and Disease, 2012, 3(3): 280-290.
- [11] Sonar S A, Watanabe M, Nikolich J Z. Disorganization of secondary lymphoid organs and dyscoordination of chemokine secretion as key contributors to immune aging [J]. Seminars in Immunology, 2023, 70: 101835.
- [12] Mathis D, Benoist C. Aire [J]. Annual Review of Immunology, 2009, 27: 287-312.
- [13] Zhang Z, Burnley P, Coder B, et al. Insights on FoxN1 biological significance and usages of the “nude” mouse in studies of T-lymphopoiesis [J]. International Journal of Biological Sciences, 2012, 8(8): 1156-1167.
- [14] Han J, Golzari-Sorkheh M, Rajan V, et al. RNA-binding proteins Zfp361l and Zfp3612 protect against premature thymic involution [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2026, 23: 505-516.
- [15] Yu J L, Sui F R, Gu F, et al. Structural insights into histone exchange by human SRCAP complex [J]. Cell Discovery, 2024, 10(1): 15.
- [16] Giaimo B D, Ferrante F, Herchenrother A, et al. The histone variant H2A.Z in gene regulation [J]. Epigenetics Chromatin, 2019, 12(1): 37.
- [17] Sun S F, Jiang N G, Jiang Y M, et al. Chromatin remodeler Znhit1 preserves hematopoietic stem cell quiescence by determining the accessibility of distal enhancers [J]. Leukemia, 2020, 34(12): 3348-3358.
- [18] Sun S F, Jiang Y M, Zhang Q L, et al. Znhit1 controls meiotic initiation in male germ cells by coordinating with Stra8 to activate meiotic gene expression [J]. Developmental Cell, 2022, 57(7): 901-913, e904.
- [19] Wei W, Tang X F, Jiang N, et al. Chromatin remodeler Znhit1 controls bone morphogenetic protein signaling in embryonic lung tissue branching [J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(10): 102490.
- [20] Zhao B, Chen Y, Jiang N, et al. Znhit1 controls intestinal stem cell maintenance by regulating H2A.Z incorporation [J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1071.
- [21] Langhi L G, Andrade L R, Shimabukuro M K, et al. Lipid-laden multilocular cells in the aging thymus are phenotypically heterogeneous [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141516.
- [22] de Mello-Coelho V, Cutler R G, Bunbury A, et al. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by growth

- hormone treatment [J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2017, 167: 46-55.
- [23] Mello Coelho V, Bunbury A, Rangel L B, et al. Fat-storing multilocular cells expressing CCR5 increase in the thymus with advancing age: potential role for CCR5 ligands on the differentiation and migration of preadipocytes [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2009, 7(1): 1-14.
- [24] Abramson J, Anderson G. Thymic epithelial cells [J]. *Annual Review of Immunology*, 2017, 35: 85-118.
- [25] Bautista J L, Cramer N T, Miller C N, et al. Single-cell transcriptional profiling of human thymic stroma uncovers novel cellular heterogeneity in the thymic medulla [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 1096.
- [26] Sekai M, Hamazaki Y, Minato N. Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance [J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 753-761.
- [27] Lopes N, Boucherit N, Santamaria J C, et al. Thymocytes trigger self-antigen-controlling pathways in immature medullary thymic epithelial stages [J]. *eLife*, 2022, 11: e69982.
- [28] Yang Z, Cao Y, Zhu X, et al. Znhit1 causes cell cycle arrest and down-regulates CDK6 expression [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 386(1): 146-152.
- [29] Khosravi-Maharlooei M, Li H W, Sykes M. T cell development and responses in human immune system mice [J]. *Annual Review of Immunology*, 2025, 43(1): 83-112.
- [30] Gossens K, Naus S, Corbel S Y, et al. Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25 [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2009, 206(4): 761-778.
- [31] Liu D, Kousa A I, O'Neill K E, et al. Canonical Notch signaling controls the early thymic epithelial progenitor cell state and emergence of the medullary epithelial lineage in fetal thymus development [J]. *Development*, 2020, 147(12): dev178582.
- [32] Hale J S, Boursalian T E, Turk G L, et al. Thymic output in aged mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(22): 8447-8452.
- [33] Kilpatrick R D, Rickabaugh T, Hultin L E, et al. Homeostasis of the naive CD4⁺ T cell compartment during aging [J]. *Journal of Immunology*, 2008, 180(3): 1499-1507.
- [34] Barthlott T, Handel A E, Teh H Y, et al. Indispensable epigenetic control of thymic epithelial cell development and function by polycomb repressive complex 2 [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 3933.
- [35] Jin C, Zang C, Wei G, et al. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions [J]. *Nature Genetics*, 2009, 41(8): 941-945.
- [36] Koch U, Fiorini E, Benedito R, et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(11): 2515-2523.
- [37] Hozumi K, Mailhos C, Negishi N, et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2008, 205(11): 2507-2513.
- [38] Rodrigues P M, Sousa L G, Alves N L. Cortical thymic epithelial cells: key developers of the code of t-cell selection and TCR repertoire diversity [J]. *Immunological Reviews*, 2025, 332(1): e70049.
- [39] Ashby K M, Hogquist K A. A guide to thymic selection of T cells [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2024, 24(2): 103-117.
- [40] Lehtimäki S, Savinko T, Lahl K, et al. The temporal and spatial dynamics of Foxp3⁺ Treg cell-mediated suppression during contact hypersensitivity responses in a murine model [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2012, 132(12): 2744-2751.