

GLP-1/FGF21 双因子高表达间充质干细胞的 DNA 甲基化分析

王艳超¹, 徐晓蒙², 于婷婷², 陈鑫², 胡康洪^{1*}, 薛冰华^{2*}

(¹湖北工业大学 中德生物医学中心, 工业发酵省部共建协同创新中心, 教育部及国家外专局“111”细胞调控与分子药理学学科创新引智基地, 湖北 武汉 430068; ²北京吉源生物科技有限公司, 北京 101300)

摘要: [目的] 在全基因组水平上对 GLP-1/FGF21 双基因修饰后的人脂肪间充质干细胞进行重亚硫酸盐甲基化测序, 分析其 DNA 甲基化模式。 [方法] 培养高表达 GLP-1/FGF21 脂肪间充质干细胞、普通脂肪间充质干细胞, 设高表达 GLP-1/FGF21 脂肪间充质干细胞组为高表达组, 普通脂肪间充质干细胞为对照组, 进行全基因组甲基化测序, 用生信学方法寻找高表达组与对照组之间的差异甲基化区域 (DMR), 对所得的 DMR 进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。 [结果] 高表达组与对照组的 DMR 共有 21 536 个; GO 富集分析显示只有蛋白质结合方面有统计学意义 ($P < 0.05$), 共有 415 个蛋白质结合相关 DMR 在高表达组干细胞基因主体部分高甲基化; 此外 KEGG 富集结果显示高表达组干细胞有 9 个 NF- κ B 通路相关 DMR 在启动子区域甲基化水平更低 ($P < 0.05$)。 [结论] GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞有 415 个蛋白质结合功能相关 DMR 在基因主体区域高甲基化, 提示其在蛋白质信号转导方面更为活跃, 这与 GLP-1/FGF21 高表达可能相关; 而 9 个 NF- κ B 通路相关 DMR 在启动子区域甲基化水平更低, 表明其在 NF- κ B 通路上更加突出, 提示其在炎症与免疫方面可以发挥更大作用。

关键词: GLP-1/FGF21; 脂肪间充质干细胞; 糖尿病; 基因修饰; 甲基化测序; 差异甲基化区域; 蛋白质结合; NF- κ B; 生物信息学

中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16519/j.cnki.1004-311x.2025.04.0065

DNA 甲基化是一种被广泛应用的表观遗传修饰方式, 可在不改变 DNA 序列的前提下通过甲基化修饰改变 DNA 片段活性, 在物理水平上阻止转录因子与 DNA 结合, 进而调控基因表达^[1-2]。检测细胞 DNA 甲基化水平, 有助于从分子层面解析细胞基因表达差异及其与细胞表型的关联^[3-4]。随着基因编辑技术发展, 为加强干细胞治疗效果, 基因修饰干细胞药物逐渐兴起^[5-6]。前期笔者成功构建 GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞, 通过三者联合发挥多重修复作用, 相较于普通脂肪间充质干细胞, 糖尿病小鼠降糖降脂效果显著^[7], 但其分子机制仍不明确。研究表明, 基因编辑存在脱靶风险^[8], 可能改变 DNA 甲基化状态^[9-10]。因此, 深入研究基因修饰干细胞 DNA 甲基化变化具有重要意义。

目前, 基因修饰干细胞对 DNA 甲基化水平的影响尚未见报道。为明确 GLP-1/FGF21 修饰对人脂肪间充质干细胞的影响, 本文对 GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞和普通脂肪间充质干

细胞开展全基因组甲基化测序, 以生信学方法鉴定差异甲基化区域 (Differentially Methylated Region, DMR), 对 DMR 相关基因进行 GO 功能富集、KEGG 通路富集分析, 旨在从分子层面揭示基因表达差异原因, 为 GLP-1/FGF21 高表达脂肪间充质干细胞治疗糖尿病提供表观遗传学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

人 GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞、普通脂肪间充质干细胞由北京吉源生物科技有限公司制备, 以无菌冻存管储存于液氮中。细胞采集制备伦理获北京翰洁吉源医院伦理委员会批准 (伦审第 [2022]001 号)。

1.1.2 试剂

α -MEM 基础培养基 (C12571500BT), Thermo Fisher Scientific 公司; 血小板裂解液 (PL-NH-

收稿日期: 2024-09-27

项目资助: 国家重点研发计划 (2020YFA0112800); 湖北省重点研发计划 (2022BCA018); 湖北省/教育部省部共建工业发酵协同创新中心计划 (2022KF16)

作者简介: 王艳超 (1986-), 女, 河北省邯郸人, 学士, 研实员, 研究方向: 干细胞生物学, 发表论文 1 篇, E-mail: wangyanchao@jiyuanbio.com.cn。

* 通信作者: 胡康洪 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 生物医学, 发表论文 175 篇, E-mail: hukh@hbut.edu.cn。

薛冰华 (1990-), 女, 内蒙古锡林郭勒盟人, 博士, 副研究员, 研究方向: 生物医学, 发表论文 20 余篇, 获授权发明专利 13 件, E-mail: xuebinghua@jiyuanbio.com.cn。

500) ,Sexton Biotechnologies 公司; GLP-1 ELISA 检测试剂盒(ab184857) ,Abcam 公司; FGF21 ELISA 检测试剂盒(EHC146.96) ,欣博盛生物科技有限公司。

1.1.3 仪器

Countess II 细胞计数仪,Thermo Fisher Scientific 公司; 往复式脱色摇床,上海碧云天生物技术有限公司; VARIOSKAN LUX 酶标仪,Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.4 培养基

取 95mL α-MEM 基础培养基,加入 5mL 血小板裂解液,混匀使用。

1.2 方法

1.2.1 样本分组与蛋白表达量鉴定

人 GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞组标记为 BT 组,包括 BT1、BT2、BT3 三个生物学重复。普通脂肪间充质干细胞组标记为 JY 组,包括 JY1、JY2、JY3 三个生物学重复。各组细胞在传代培养中融合度达 90% 时,收集细胞培养上清,依据 ELISA 试剂盒说明书检测 GLP-1 和 FGF21 蛋白表达量。

1.2.2 全基因组甲基化测序

收集两组细胞样本,细胞计数仪计数,各选取 1×10^6 个细胞,通过全基因组重亚硫酸盐甲基化测序(Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS) 完成甲基化检测,该测序由北京诺禾致源科技股份有限公司具体实施。简要过程如下: 提取细胞 DNA 并质控,用 Covaris S220 超声随机打断至 200~400 bp,经 Bisulfite 处理,经过处理,未甲基化的 C 变成 U,而甲基化 C 保持不变,随后链接测序接头,合成双链 DNA,经片段筛选后 PCR 扩增构建 DNA 文库,最终于 IlluminaHiSeq 2000 平台进行双端测序。

1.2.3 测序数据处理

对测序数据进行质量评估,采用过滤后的高质量序列(Clean reads) 进行后续分析。用 Bismark 软件将序列与人类参考基因组(CRCh38) 比对组装,得到甲基化位点信息。将 C 位点甲基化数(mC) 、总 C 位点数(mC + umC) 、非转化率(r) 进行二项检验(经 FDR 校正的 $P < 0.05$) 来鉴定甲基化位点。

1.2.4 差异甲基化分析

用 DSS 分析软件筛选 DMR。通过 R 包 Goseq 对 DMR 相关基因进行 GO(Gene Ontology) 富集分析,以 $P \text{ adj} < 0.05$ 为显著性富集阈值,用 KOBAS 软

件进行 KEGG 通路富集分析。

1.2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.3.0 软件进行统计分析,两组间比较用 t 检验,当 $P < 0.05$ 表示有统计学差异,当 $P < 0.01$ 有显著差异。

2 结果与分析

2.1 人 GLP-1 和 FGF21 蛋白表达量鉴定

ELISA 检测培养过程中的细胞上清液(图 1) 结果显示,BT 组和 JY 组均表达 GLP-1、FGF21 蛋白,但 BT 组蛋白表达量显著高于 JY 组($P < 0.0001$) ,证明人 GLP-1、FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞构建成功。

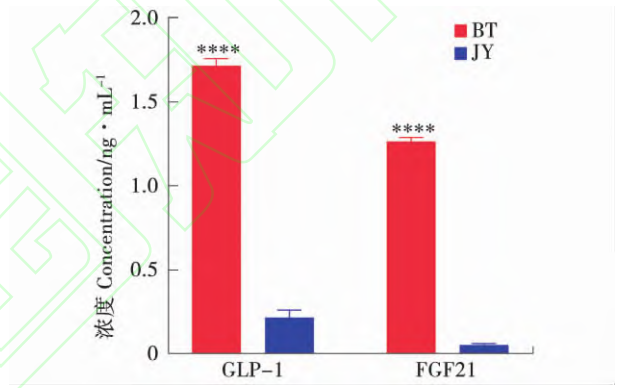


图1 GLP-1 和 FGF21 蛋白表达量鉴定

注解: BT 为人 GLP-1 和 FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞组,JY 为普通脂肪间充质干细胞组。纵坐标代表蛋白浓度,单位是 ng/mL。与普通脂肪间充质干细胞组比较,**** $P < 0.0001$ 。

Fig.1 Identification of GLP-1 and FGF21 protein expression

Note: BT is a human adipose-derived mesenchymal stem cell group with high expression of GLP-1 and FGF21, and JY is a common adipose-derived mesenchymal stem cell group. The ordinate represents the protein concentration in ng/mL. Compared with the normal adipose-derived mesenchymal stem cell group, **** $P < 0.0001$.

2.2 甲基化水平分析

用 Circos 软件绘制染色体 DNA 甲基化分布图(图 2) 显示,BT 组甲基化密度和水平较低。两组甲基化位点总数约 4000 万,绝大多数位于 mCG 序列背景中(98% 以上) (表 1) ,JY 组稍高。基因组甲基化水平分布趋势分析表明,两组整体模式一致,但 BT 组甲基化水平稍低(图 3) 。以上结果表明,BT 组与 JY 组甲基化水平相似性较高,但 BT 组整体甲基化水平略低于 JY 组。

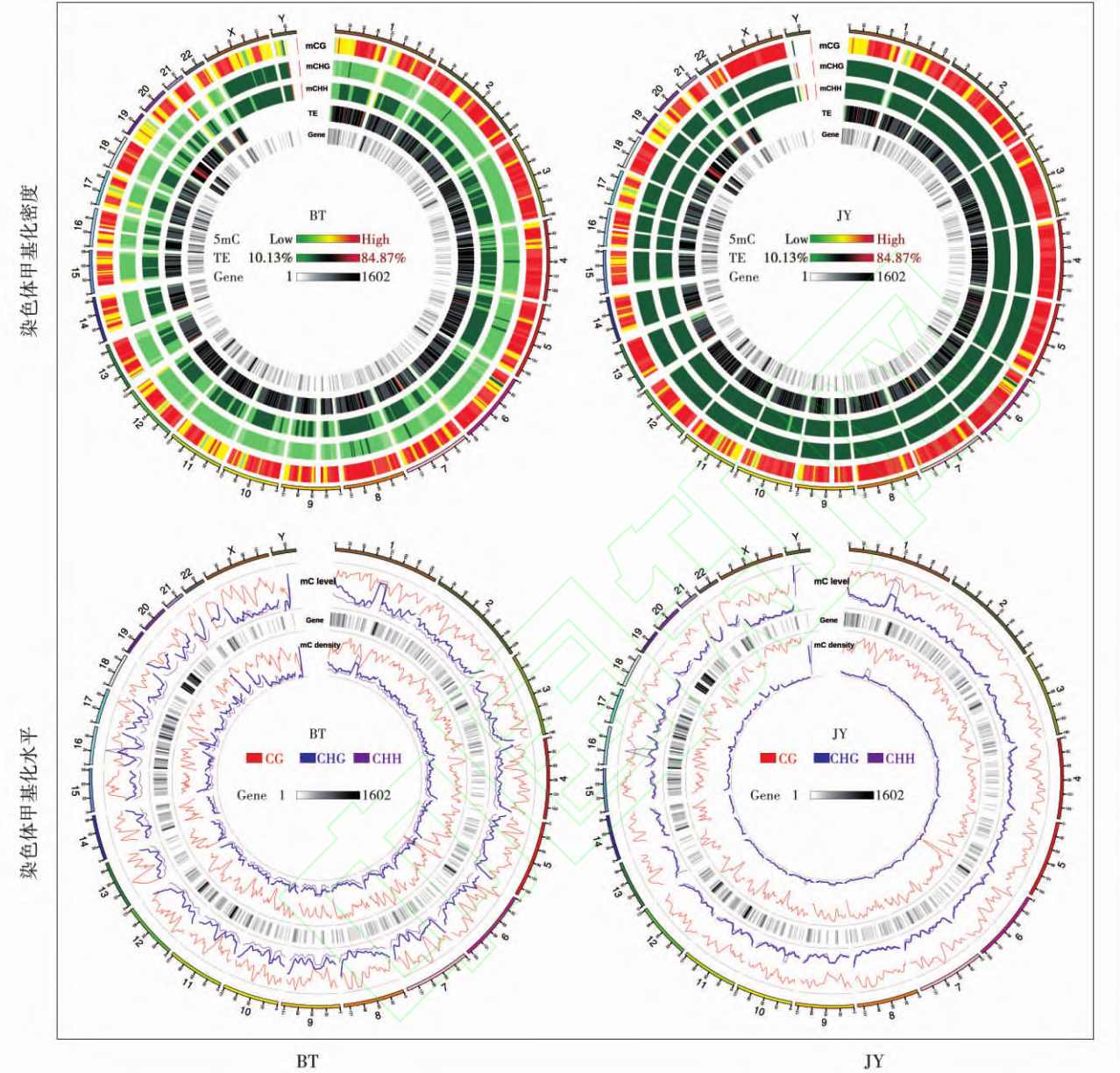


图 2 染色体甲基化分布图谱

注解: 染色体甲基化密度分布自外向内依次呈现: CG 序列环境甲基化密度、CHG 序列环境甲基化密度、CHH 序列环境甲基化密度,以及 TE (转座元件) 占比密度热图和基因密度热图。对应颜色标尺为: 甲基化密度采用渐变色谱(绿色→黄色→红色)表征低→高水平; TE 比例以渐进色阶(绿色→黑色→红色)反映重复序列占比低→高梯度; 基因密度则通过灰度变化(灰白→黑色)指示基因数目稀疏至密集状态。染色体甲基化水平由外向内依次表示: 甲基化水平线性展示, gene 数目密度热图, 甲基化密度线性展示; 内部标尺: 三种序列环境(CG 为红色, CHG 为蓝色, CHH 为紫色), gene 密度热标: 由灰白到黑表示基因数目由低到高。

Fig. 2 Chromosome methylation distribution map

Note: The distribution of chromosome methylation density presents in turn from outside to inside: CG sequence environmental methylation density, CHG sequence environmental methylation density, CHH sequence environmental methylation density, TE (transposable element) ratio density thermogram and gene density thermogram. The corresponding color scale is: methylation density is characterized by gradient chromatography (green → yellow → red) from low to high level; TE proportion reflects a gradient of low to high proportion of repeated sequences in a gradual color scale (green → black → red); Gene density indicates that the number of genes is sparse to dense through gray scale change (gray → black). Chromosome methylation levels are expressed in turn from outside to inside: linear display of methylation level, gene number density thermogram and linear display of methylation density; Internal scale: three sequence environments (CG is red, CHG is blue, CHH is purple), and gene density scale: from gray to black indicates that the number of genes is from low to high.

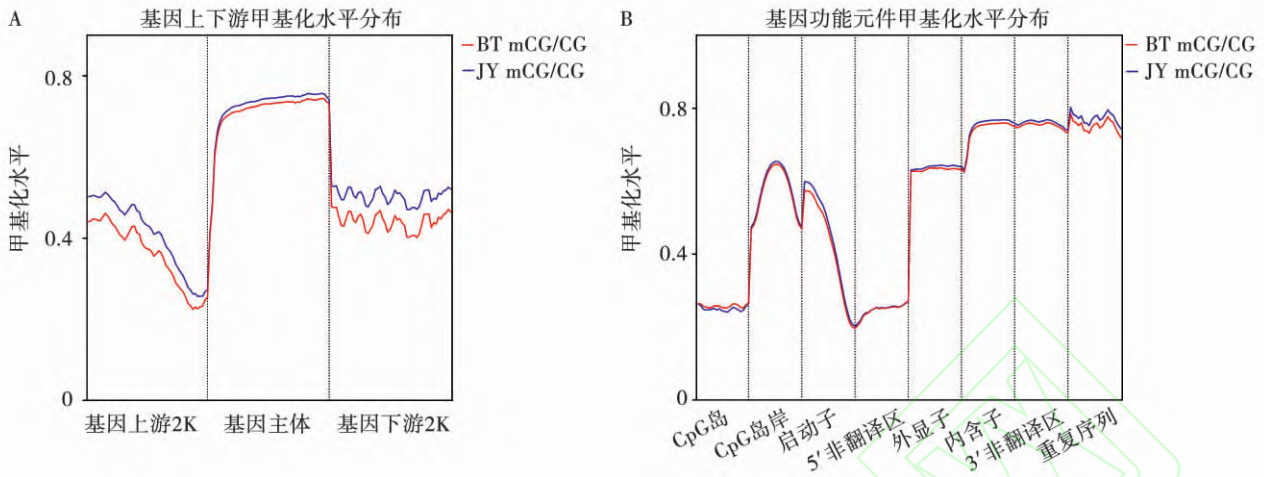


图3 功能区域甲基化水平分布

注解: A: 样本间基因上下游甲基化水平分布图; B 为样本间基因功能元件甲基化水平分布图。

Fig.3 Distribution of methylation level in functional regions

Note: A: The distribution map of upstream and downstream methylation levels of genes between samples; B: The distribution map of methylation level of gene functional elements between samples.

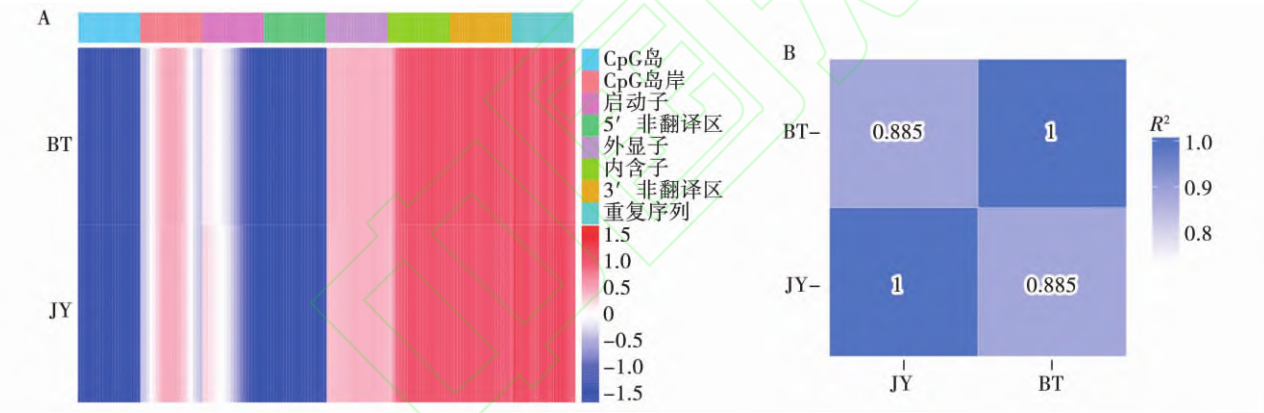


图4 样本相关性热图

注解: A 为样本甲基化水平聚类热图,基因功能区域用不同颜色表示,甲基化水平按功能区域排布,由蓝转白到红依次表示甲基化水平由低到高。B 为样本相关系数热图, R^2 为 pearson 相关系数的平方,由白到蓝表示相关系数由低到高。

Fig.4 Sample correlation thermogram

Note: A is the cluster thermogram of methylation level of samples, and the functional regions of genes are represented by different colors. The methylation level is arranged according to functional regions, and from blue to white to red, the methylation level is from low to high in turn. B is the heat map of the sample correlation coefficient, R^2 is the square of pearson correlation coefficient, and white to blue indicates that the correlation coefficient is from low to high.

2.3 样本间相关性

两组样本相关性分析显示(图 4) ,聚类热图显示的甲基化水平分布程度一致,组间相关系数为 0.885,表明两种细胞的甲基化模式相似程度极高,全基因组层面无明显差异。

2.4 差异甲基化分析

通过 DSS 分析软件鉴定 BT 组和 JY 组的 DMR,

共检测到 21 536 个 DMR,其中高甲基化、低甲基化 DMR 分别为 11 162 个、10 374 个。DMR 甲基化水平聚类结果显示,BT 组甲基化水平高于 JY 组的 DMR 更多(图 5B) 。区域分布分析表明,BT 组 DNA 序列在内含子、重复序列区域甲基化更高,而余下区域多为低甲基化(图 5A) 。该结果表明,BT 组在基因内部的甲基化更活跃,转录活性更高^[11] 。

表 1 全基因组甲基化位点统计

Tab. 1 Genome – wide methylation site statistics

	全基因组 mC 位点数目	全基因组 mC 位点 占 C 位点百分比/%	mCG 位点占 mC 位 点百分比/%	mCHG 位点占 mC 位点百分比/%	mCHH 位点占 mC 位点百分比/%
BT1	39337104	3. 26	99. 10	0. 23	0. 67
BT2	39096372	3. 24	99. 71	0. 23	0. 68
BT3	39705798	3. 29	98. 17	0. 23	0. 67
JY1	41748890	3. 46	99. 04	0. 24	0. 72
JY2	42034913	3. 49	98. 37	0. 24	0. 71
JY3	41575174	3. 45	99. 45	0. 24	0. 72

注解: mC 为甲基化 C 位点,mCG 为 CG 背景下甲基化 C 位点,mCHG 为 CHG 背景下甲基化 C 位点,mCHH 为 CHH 背景下甲基化 C 位点,H 对应 A、T 或 C。

Note: mC is methylation C site,mCG is methylation C site in CG background,mCHG is methylation C site in CHG background,mCHH is methylation C site in CHH background,and H corresponds to A,T or C.

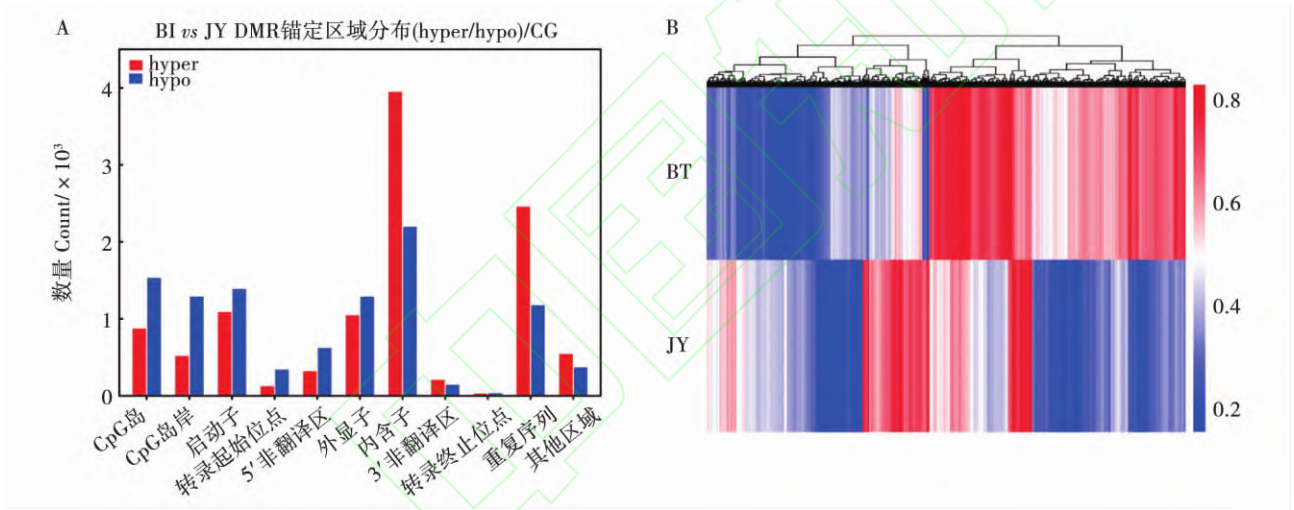


图 5 BT 组与 JY 组差异甲基化区域

注解: A 为 DMR 锚定区域分布图,横坐标为基因组不同区域,纵坐标为 DMR 数量,单位为千个,红色表示高甲基化 DMR,蓝色表示低甲基化 DMR。B 为 DMR 甲基化水平聚类热图,纵坐标代表比较组合组别,横坐标为 DMR 聚类结果,由蓝到红表示甲基化水平由低到高。

Fig. 5 Differential methylation regions between BT group and JY group

Note: A: The distribution map of DMR anchoring regions,the abscissa is different regions of the genome,and the ordinate is the number of DMR,with units of thousand,red representing hypermethylated DMR and blue representing hypomethylated DMR. B: The cluster heat map of DMR methylation level,the ordinate represents the comparative combination group,and the abscissa represents the cluster result of DMR,and the blue to red indicates that the methylation level is from low to high.

2.5 DMR 相关基因功能富集分析

对 DMR 相关差异表达基因(Differential Expression Genes,DEG) 的基因主体和启动子区域进行 GO 富集,按显著性排序取前 30 个条目。结果显示,仅基因主体高甲基化区域的“蛋白质结合”条目(415 个) 具有显著性($q - value < 0.05$),其余条目均不显著($q - value > 0.2$) (图 6) 。提示 BT 组与 JY 组的 DMR 中仅“蛋白质结合” 功能富集显著,且该功能

与基因主体中的高甲基化相关,意味着 BT 组在蛋白质结合能力上优于 JY 组。

对基因主体和启动子区域的 DMR 相关 DEG 进行 KEEG 富集,按显著性排序取前 20 个条目(图 7) 。结果显示,不同基因功能区域中,无论甲基化水平高低,富集程度最高的均为自噬、线粒体自噬,提示两组细胞在分解代谢、维持营养和能量的动态平衡方面存在较大差异^[12]。此外,基因主体高甲基化

区域还富集到 Rap1 信号通路、代谢途径、PI3K/Akt 信号通路、紧密连接、肌动蛋白细胞骨架调节、MAPK 信号通路、内吞、血小板活化等条目,均涉及细胞因子分泌和信号传导,表明 BT 组在蛋白质信传导方面

转录活性较高。启动子区域低甲基化条目富集到 NF- κ B 信号通路,表明 BT 组可能在炎症调节中发挥作用^[13]。

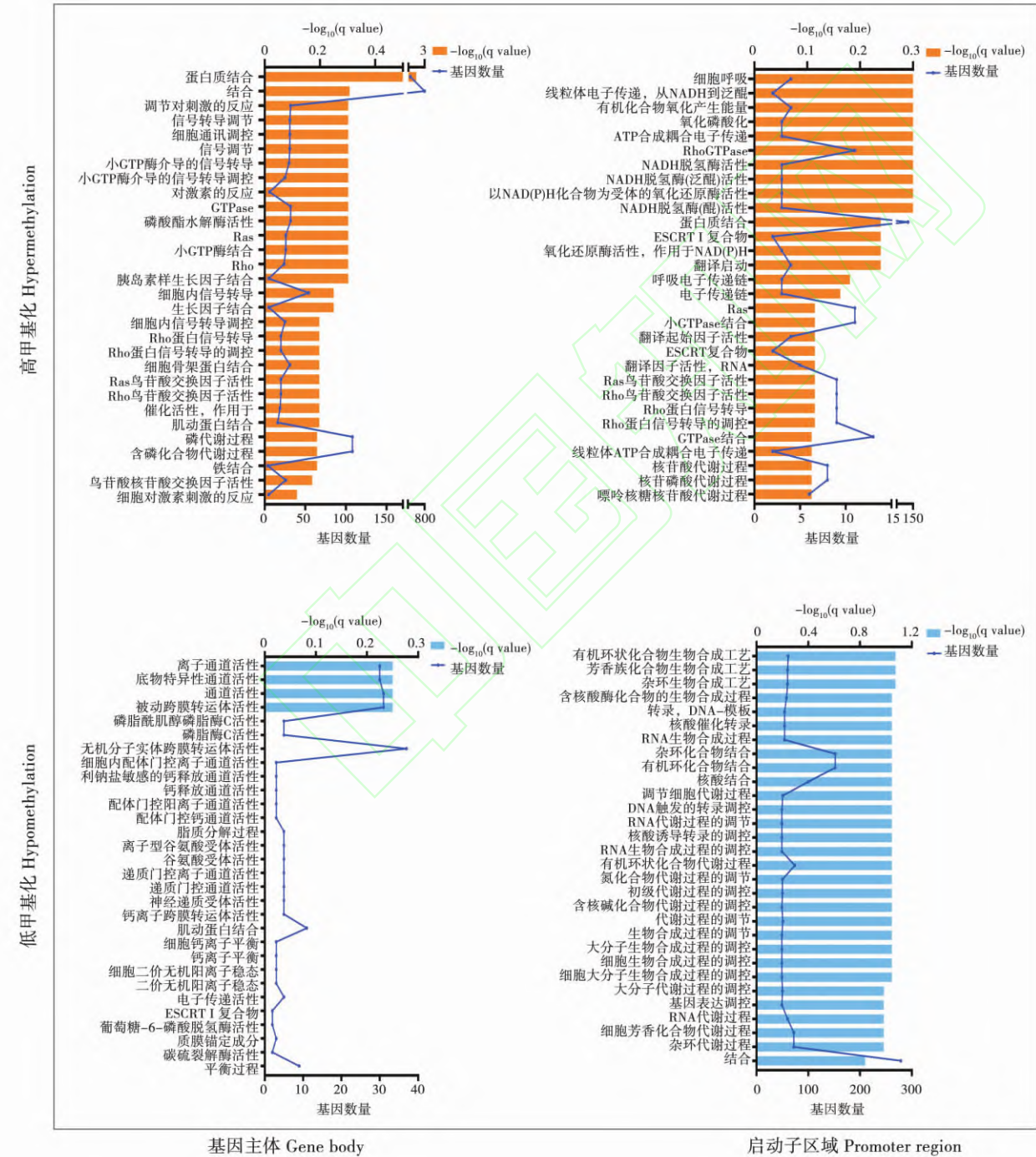


图6 BT组与JY组DMR相关基因GO富集

注解: 横坐标代表基因组不同区域,纵坐标代表甲基化水平。

Fig.6 Enrichment of DMR related gene GO in BT group and JY group

Note: The abscissa represents different regions of genome,and the ordinate represents methylation level.

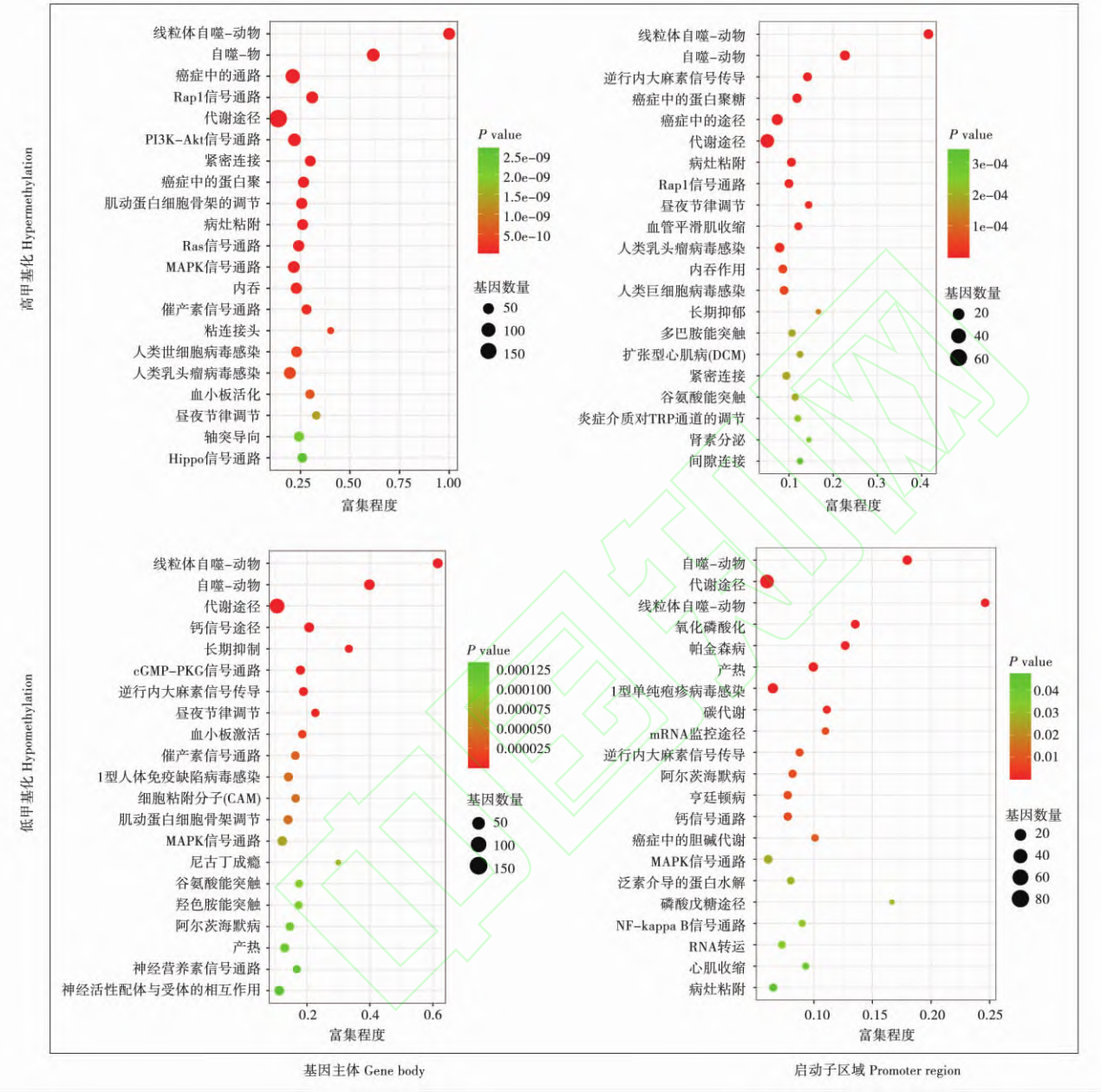


图7 BT组和JY组DMR相关基因KEGG富集

注解: 横坐标代表基因组不同区域,纵坐标代表甲基化水平。

Fig. 7 KEGG enrichment of DMR related genes in BT group and JY group

Note: The abscissa represents different regions of genome,and the ordinate represents methylation level.

3 讨论

将间充质干细胞、GLP-1和FGF21三者联合用于治疗糖尿病可发挥“君臣佐使”协同效应^[14-16]。前期研究已从细胞和动物水平证实GLP-1/FGF21双因子高表达脂肪间充质干细胞相较于普通脂肪间充质干细胞的改变,但在分子水平上,尤其是全基因组甲基化水平的机制尚未明确。甲基化

测序结果显示,两组细胞全基因组甲基化C位点(mC)数目均约4000万,甲基化水平分布趋势一致,样本间相关系数达0.885,甲基化模式极为相似。这表明基因修饰并未影响细胞全基因组甲基化水平,可能与甲基化模式的高度保守性有关。最新人类细胞DNA甲基化图谱证明,甲基化模式主要与细胞分化相关,其他因素难以引起甲基化模式的改变^[17]。但二者仍存在差异,双因子组全基因组甲基

化水平在基因内部的内含子、重复序列区域甲基化水平更高,启动子区域甲基化水平更低。由于不同区域 DNA 甲基化对基因表达的调控模式不一致,启动子区域甲基化与基因表达负相关^[2],基因内部甲基化与转录活性正相关^[18-20],提示双因子组在转录表达方面活性更高。

在 DMR 相关基因的 GO 富集分析中,仅基因主体交叠的 DMR 高甲基化相关基因富集到显著条目“蛋白质结合”,这与其启动子区域低甲基化,内含子、重复序列高甲基化的结果一致。KEGG 富集分析显示,基因主体交叠的 DMR 高甲基化相关基因显著富集于 Ra1 信号通路、PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路等通过蛋白转运调控信号传导的通路,进一步说明了双因子脂肪间充质干细胞的蛋白转录活性更高。研究发现 FGF21 和 GLP-1 参与多种蛋白信号通路,例如均可通过 PI3K/Akt 信号通路发挥降糖作用^[14-15]。其中,GLP-1 作为胰岛素分泌信号通路“开关”,调控该通路下游多种细胞因子的表达^[15]。FGF21 作为糖脂代谢调控分子,与 FGF 受体、 β -Klotho 形成复合物参与多种信号通路转导^[21]。双因子高表达脂肪间充质干细胞除高表达 GLP-1/FGF21 外,其下游信号通路也会被激活,可能分泌更多相关细胞因子,使之在蛋白质结合方面与普通脂肪间充质干细胞有了显著差异。启动子区域的低甲基化 KEGG 富集中,9 个 DMR 聚集于 NF- κ B 通路(经典的炎症刺激与免疫调节通路)^[13],提示双因子高表达脂肪间充质干细胞可能在炎症环境中发挥更强的免疫调节作用。这可能与 GLP-1、FGF21、间充质干细胞在糖尿病治疗中均具备抗炎作用有关^[14-16],三者联合可发挥协同作用。

此外,DMR 相关基因 KEGG 富集结果显示,最显著的通路为自噬和线粒体自噬,提示两组细胞在分解代谢、维持营养和能量的动态平衡方面有较大差异^[12],说明细胞状态是两者的核心差异。本文已尽可能统一细胞代次和培养条件,但不同细胞状态仍不可避免存在差异,其营养需求、活性氧(ROS)水平、DNA 损伤等各有不同,为维持细胞稳态,自噬水平自然不一^[22]。因此,针对本文细胞因不同应力产生的甲基化差异,需进一步优化培养条件、建立标准化规程,避免细胞状态不一带来的干扰。

4 结论

GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞与普通脂肪间充质干细胞整体甲基化水平相似,二者存在 21536 个 DMR。GO 富集结果显示,仅基因主体区域高甲基化的蛋白质结合功能条目显著,含 415 个 DMR。此外,启动子区域低甲基化中,9 个 DMR 富集在 NF- κ B 通路。以上结果提示,GLP-1/FGF21 双因子高表达脂肪间充质干细胞在蛋白质信号传导中更活跃,与 GLP-1/FGF21 高表达结果相符。同时,高表达组干细胞抑制基因在 NF- κ B 通路中表达较低,说明其在炎症与免疫调节方面可能发挥更多作用。

参考文献

[1] SIGURPALSDOTTIR B D,STEFANSSON O A,HOLLEY G,et al. A comparison of methods for detecting DNA methylation from long-read sequencing of human genomes [J]. *Genome Biology*,2024,25(1): 69-69.

[2] NEWELL-PRICE J,CLARK A J,KING P. DNA methylation and silencing of gene expression [J]. *Trends Endocrinol Metab*,2000,11(4): 142-148.

[3] PARK Y,WU H. Differential methylation analysis for BS-seq data under general experimental design [J]. *Bioinformatics*,2016,32(10): 1446-1453.

[4] SMITH Z D,Hetzel S,Meissner A. DNA methylation in mammalian development and disease [J]. *Nature Reviews Genetics*,2025,26(1): 7-30.

[5] MOSALLAEI M,SIMONIAN M,EHTESHAM N,et al. Genetically engineered mesenchymal stem cells: targeted delivery of immunomodulatory agents for tumor eradication [J]. *Cancer Gene Ther*,2020,27(12): 854-868.

[6] KANAYA N,KITAMURA Y,VAZQUEZ M L,et al. Gene-edited and -engineered stem cell platform drives immunotherapy for brain metastatic melanomas [J]. *Science Translational Medicine*,2023,15(698): eade8732.

[7] XUE B,XIAO X,YU T,et al. Mesenchymal stem cells modified by FGF21 and GLP1 ameliorate lipid metabolism while reducing blood glucose in type 2 diabetic mice [J]. *Stem Cell Res Ther*,2021,12(1): 133-133.

[8] ZHU M,XU R,YUAN J,et al. Tracking-seq reveals the heterogeneity of off-target effects in CRISPR-Cas9-mediated genome editing [J]. *Nat Biotechnol*,2024,(prepublish): 1-12.

[9] QIAN J,LIU S X. CRISPR/dCas9-Tet1-Mediated DNA methylation editing [J]. *Bio Protoc*,2024,14(8): e4976.

[10] LI J,LIANG W,HE X Q,et al. DNA damage triggers heritable alterations in DNA methylation patterns in Arabidopsis [J]. Mol Plant,2025,18(3) : 501 – 512.

[11] JONES P A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [J]. Nat Rev Genet,2012,13(7) : 484 – 492.

[12] YU L,CHEN Y,TOOZE S A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms [J]. Autophagy, 2018, 14 (2) : 207 – 215.

[13] GULDENPFENNIG C,TEIXEIRO E, DANIELS M. NF – kB ´s contribution to B cell fate decisions [J]. Front Immunol,2023, 14,(1) : 1214095 – 1214095.

[14] LI S,SONG Z,FAN C,et al. Potential of FGF21 in type 2 diabetes mellitus treatment based on untargeted metabolomics [J]. Biochem Pharmacol,2024,225(1) : 116306 – 116306.

[15] HE Y,XU B,ZHANG M,et al. Advances in GLP – 1 receptor agonists for pain treatment and their future potential [J]. J Headache Pain,2025,26(1) : 46 – 46.

[16] GAO S,ZHANG Y, LIANG K, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) : a novel therapy for type 2 diabetes [J]. Stem Cells Int, 2022,2022(1) : 8637493 – 8637493.

[17] LOYFER N,MAGENHEIM J,PERETZ A,et al. A DNA methylation atlas of normal human cell types [J]. Nature, 2023, 613 (7943) : 355 – 364.

[18] LEV M G,YEARIM A, AST G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation [J]. Trends Genet, 2015, 31 (5) : 274 – 280.

[19] XUE Q,XU Y,YANG H,et al. Methylation of a novel CpG island of intron 1 is associated with steroidogenic factor 1 expression in endometriotic stromal cells [J]. Reprod Sci,2014, 21 (3) : 395 – 400.

[20] UNOKI M,NAKAMURA Y. Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer – like activity [J]. FEBS Lett,2003, 554(1 – 2) : 67 – 72.

[21] WEDEMEYER S A,JONES N E,RAZA I G A,et al. ParacrineF–GF21 dynamically modulates mTOR signaling to regulate thymus function across the lifespan [J]. Nat Aging,2025,(prepublsh) : 1 – 9.

[22] GÓMEZ – VIRGILIO L,SILVA – LUCERO M D,FIORES – MORELOS D S,et al. Autophagy: a key regulator of homeostasis and disease: an overview of molecular mechanisms and modulators [J]. Cells,2022,11(15) : 2262 – 2262 .

DNA methylation analysis of adipose – derived mesenchymal stem cells with two – factor high expression of GLP – 1 /FGF21

WANG Yanchao¹,XU Xiaomeng²,YU Tingting²,CHEN Xin²,HU Kanghong^{1*},XUE Binghua^{2*}
(¹Sino – German Biomedical Center,National “111”Center for Cellular Regulation and Molecular Pharmaceutics, Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation (Ministry of Education of China & Hubei Province) , Hubei University of Technology,Wuhan 430068; ²Beijing Jiyuan Biotechnology Co. ,Ltd. ,Beijing 101300, China)

Abstract [Objective] To sequence the bisulfite methylation of human adipose – derived mesenchymal stem cells modified by *GLP – 1/FGF21* at the whole genome level and analyze their DNA methylation patterns. [Method] Adipose – derived mesenchymal stem cells with high expression of GLP – 1/FGF21 and common adipose – derived mesenchymal stem cells were cultured. Adipose mesenchymal stem cells with high expression of GLP – 1/FGF21 were set as high expression group and normal adipose mesenchymal stem cells were set as control group,and the whole genome methylation sequencing was performed. The differential methylation region (DMR) between the high expression group and the control group was found by the method of bioinformatics,and the obtained DMR was analyzed by GO enrichment and KEGG enrichment. [Result] There were 21536 DMRs in the high expression group and the control group. GO enrichment analysis showed that only protein binding was statistically significant (*P* < 0.05) ,and a total of 415 protein binding – related DMRs were hypermethylated in the main body of stem cell genes in the high expression group. In addition,KEGG enrichment results showed that nine DMR related to NF – kappa B pathway in stem cells of high expression group had lower methylation level in promoter region (*P* < 0.05) . [Conclusion] There are 415 DMR related to protein binding function in adipose – derived mesenchymal stem cells with high expression of GLP – 1 / FGF21,which suggests that they are more active in protein signal transduction,which may be related to the high expression of GLP – 1 / FGF21. However,the methylation level of nine NF – kappa B pathway – related DMR is lower in the promoter region, which indicates that it is more prominent in NF – kappa B pathway,suggesting that it can play a greater role in inflammation and immunity.

Keywords: GLP – /FGF21; adipose – derived mesenchymal stem cells; diabetes; gene modification; methylation sequencing; differential methylation region; protein combination; NF – kappa B; bioinformatics