

miR - 375 启动子甲基化在 MIN6 细胞中存在状况的研究

高 敏¹, 尹 亮², 况雪梅³, 常向云²

摘要 目的 该文旨在运用 MassARRAY 平台分析小鼠胰岛 β 细胞系(MIN6) 的 DNA 甲基化谱, 并应用 DNA 去甲基化药物 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-CdR) 处理 MIN6 细胞以探索甲基化模式的改变。方法 运用 MassARRAY 平台检测 MIN6 细胞系与小鼠胚胎成纤维细胞株(NIH3T3) 中 miR-375 基因 DNA 甲基化状态, 并检测不同浓度 5-Aza-CdR 溶液处理 MIN6 细胞系后 miR-375 基因甲基化状态, 评估其变化。应用噻唑蓝比色法(MTT) 检测 5-Aza-CdR 对 MIN6 细胞的生长增殖的影响。使用 qRT-PCR 检测 5-Aza-CdR 50 μmol/L 浓度组 miR-375 在 MIN6 细胞中和未处理的 NIH3T3 细胞中的表达。结果 5-Aza-CdR 能抑制 MIN6 细胞的生长。用 5-Aza-CdR 处理 24、48、72 h 后 2 μmol/L 浓度组与其他各组比较, OD 值均不同(*P* < 0. 05), 且不同时间点之间进行比较差异有统计学意义(*P* < 0. 05)。经 24、48、72 h 用不同浓度的 5-Aza-CdR 处理 MIN6 细胞后, 各组 mmu-miR-375 的 DNA 均高度甲基化, 50 μmol/L 组 miR-375 DNA 的平均甲基化率均低于其他组。检测出 50 μmol/L 组 5-Aza-CdR 处理的 MIN6 细胞经 24、48、72 h 后, mmu-miR-375 的表达高于 0 μmol/L 组, 差异有统计学意义(*P* < 0. 05)。MIN6 细胞 mmu-miR-375 基因的 DNA 表达低于 NIH3T3 细胞, 差异有统计学意义(*P* < 0. 05)。结论 该研究首次运用 MassARRAY 平台分析 mmu-miR-375 启动子甲基化水平, 并发现在 MIN6 细胞中存在 mmu-miR-375 DNA 广泛甲基化修饰。

关键词 2 型糖尿病; miR-375; DNA 去甲基化; 基质辅助激光解析电离时间飞行质谱仪

中图分类号 R 587. 1

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2020) 01 - 0060 - 05
doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2020. 01. 013

研究^[1]显示, miR-375 基因在调节胰腺生长发育、胰岛 β 细胞增殖和胰岛素分泌中起重要作用。表观遗传学可能会影响正常糖耐量者(normal glucose tolerance, NGT) 对 2 型糖尿病的易感性。越来

越多的研究表明, 异常的 DNA 甲基化模式可作为 T2DM 的关键表观遗传学标志^[3-6]。然而, 没有研究能确定已建立的胰腺 β 细胞系中存在 miR-375 启动子甲基化模式。且目前在糖尿病研究中, 对 miR-375 受 DNA 去甲基化的调控作用少见报道。该研究用 5-Aza-CdR 处理 MIN6 细胞, 以明确 DNA 甲基化的调节是否可以影响 miR-375 的表达, 并通过 MassARRAY 平台分析 MIN6 细胞的 DNA 甲基化谱。

1 材料与方法

1.1 材料 小鼠胰岛 β 细胞株由川北医学院机能实验中心提供。从中国科学院上海细胞库采购小鼠胚胎成纤维细胞株; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-deoxycytidine, 5-Aza-CdR) 购自美国 Sigma 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、琼脂糖和高糖型 DMEM 培养基购自新疆赛默飞生物工程技术有限公司; 噻唑蓝溴化四唑(MTT)、青链霉素液购自北京索莱宝科技有限公司; QIAamp DNA Mini Kits 50 (QIAGEN51304)、miRNeasy Mini Kit 50 (QIAGEN 217004) 及 miScript II RT Kit 50 (QIAGEN218161) 试剂盒购自北京雅安达生物科技有限公司; EZ DNA 甲基化试剂盒(The EZ DNA Methylation Kit) 购自美国 Zymo Research 生物公司; MassARRAY 质谱仪、MassCLEAVE 试剂盒及 PCR 试剂盒购自美国 Sequenom 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与处理 NIH3T3 细胞作为空白对照组; PBS 组作为溶剂对照组。5-Aza-CdR 处理 MIN6 细胞组作为实验组。设定 6 种 5-Aza-CdR 浓度梯度(0、0. 08、0. 4、2、10 及 50 μmol/L) 处理 MIN6 细胞后共分为三大组, 即: 24 h 组、48 h 组、72 h 组。

1.2.2 MIN6 及 NIH3T3 细胞培养 用高糖 DMEM 培养基, 其中含有 10% FBS、青霉素 100 U/L 及链霉素 100 mg/L, 另向 MIN6 细胞株培养基中加入 β-巯基乙醇 0. 1 mmol/L, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 MTT 检测 MIN6 细胞的活力 取指数生长

2019 - 09 - 30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81560137、81860149)

作者单位: ¹石河子大学医学院, 石河子 832000

石河子大学医学院第一附属医院² 内分泌代谢科、³ 呼吸内科, 石河子 832000

作者简介: 高 敏, 女, 硕士研究生;

常向云, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: cxyshzdx@126. com

期 MIN6 细胞制成细胞悬液,按 1×10^4 个/ml 接种到 96 孔板,每孔 100 μ l 培养 24 h; 细胞贴壁后弃上清液,每组加入 100 μ l 含不同浓度 5-Aza-CdR 的培养基,阴性对照为空白对照;置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中孵育;各孔加入 MTT 20 μ l (5 mg/ml),继续培养 4 h;弃上清液并每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜(DMSO),低速震荡 10 min;酶标仪 490 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.2.4 引物合成 用 EpiDesigner 设计 PCR 引物, miR-375 引物序列:上游 5'-AGGAAGAGAGGTT-TAGAGTTTGAGGGTAGGGTAGG-3',下游 5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAAAACTCATCCACCAAACACC-3',由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.5 基因组 DNA 提取 根据 QIAamp DNA Mini Kits 50(QIAGEN51304)试剂盒要求提取 DNA,将提取的 DNA 样品储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中。

1.2.6 亚硫酸氢盐处理 DNA 根据 EZ DNA Methylation Kit 的说明进行亚硫酸氢盐修饰,洗脱并纯化 DNA。终体积为 30 μ l, -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

1.2.7 PCR 扩增 使用 PCR 试剂盒,PCR 预混合物 2 μ l 和引物 1 μ l 到 384 孔 PCR 板,将经亚硫酸氢盐处理的 DNA 1.5 μ l 加入到 PCR 板中,并以 5 000 r/min 离心 1 min。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C、4 min;然后 94 $^{\circ}$ C、20 s,56 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、1 min,总共 45 个循环。最后在 72 $^{\circ}$ C 下 3 min,将 PCR 扩增产物置于 4 $^{\circ}$ C 下储存。

1.2.8 虾碱性磷酸酶(SAP)处理 取 SAP 混合物(SAP 0.3 μ l + 无核糖核酸酶 1.7 μ l) 2 μ l 加入到 5 μ l PCR 产物中,混匀并离心 384 孔板,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min,85 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,4 $^{\circ}$ C 存储;孵育后置于 -20 $^{\circ}$ C 过夜储存。

1.2.9 体外转录 依据 MassCLEAVE 试剂盒说明书配置转录混合物,取其 5 μ l 与 2 μ l PCR 产物到 384 孔板,封膜,5 000 r/min 离心 1 min,37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,4 $^{\circ}$ C 存储。

1.2.10 样品纯化 向微孔板各孔中加入 6 mg CLEAN Resin,放置 10 min;向 384 孔板的各孔中加入 20 μ l 双蒸水;将 CLEAN Resin 转移至 384 孔板;封膜并快速离心微孔板 5 000 r/min、1 min,旋转 10 min,3 000 r/min 离心 5 min 后备用。

1.2.11 MassARRAY 技术进行定量 DNA 甲基化分析 利用 MassARRAY Nanodispenser 从 384 孔板裂解反应溶液中分别取出 15 μ l 裂解所得产物转移到

基质芯片中,并应用 MassARRAY 质谱仪(Bruker-Sequenom)收集质谱图,用 EpiTYPER v1.0.5 软件进行甲基化数据分析。

1.2.12 细胞 RNA 提取 根据 miRNeasy Mini Kit 50(QIAGEN217004)试剂盒要求提取 RNA,样本置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

1.2.13 总 RNA 逆转录成 cDNA、RT-PCR 反应 根据 miScript II RT Kit 50(QIAGEN218161)试剂盒要求将总 RNA 逆转录成 cDNA,运用 qRT-PCR 检测 miR-375 基因表达。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C、15 min;然后 94 $^{\circ}$ C、15 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,70 $^{\circ}$ C、30 s,总共 40 个循环。

1.2.14 荧光实时定量 PCR 数据处理 运用 ABI PRISM 7300 HT 软件分析所得实验数据,应用 $2^{-\Delta Ct}$ 方程式: $\Delta Ct = Ct(\text{miR-375}) - Ct(\text{U6})$ 计算实验组 miR-375 与对照组的比值,其中 U6 用作内源对照,用校正后的 Ct 值($2^{-\Delta Ct}$)来对各组间 miR-375 的表达差异进行对比。

1.3 统计学处理 运用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时用 SNK 法,两组间 miR-375 平均甲基化水平的比较采用两独立样本 Wilcoxon 秩和检验。相关性回归用于两个变量之间的相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 5-Aza-CdR 对 MIN6 细胞增殖的影响 结果表明,在一定浓度范围内,随着 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza-CdR 浓度和时间的增加,对 MIN6 细胞增殖的抑制作用逐渐增强,当其浓度为 50 μ mol/L 时,抑制作用逐渐减弱。2 μ mol/L 组的 5-Aza-CdR 溶液分别作用 MIN6 细胞 24、48、72 h 后与其余各浓度组比较,OD 值不同,差异有统计学意义($P < 0.05$),且各时间点之间进行比较后发现差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 miR-375 在各组中甲基化聚类分析 如图 2 所示,相对于 MIN6 细胞和 NIH3T3 细胞中 mmu-miR-375 的转录起始位点,甲基化研究区域位于 +199 bp ~ +491 bp 之间。经分类分析后发现这些组的定量甲基化水平进行比较,差异有统计意义($P < 0.05$)。在这些组中分析了在 mmu-miR-375 的特定启动子区域上覆盖 18 个 CpG 单元(293 bp,包含总

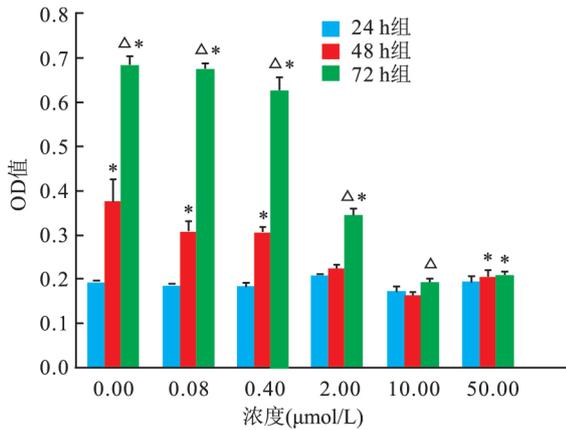


图1 5-Aza-CdR对MIN6细胞增殖的影响

5-Aza-CdR与MIN6细胞增殖的关系:与24h组相比: * $P < 0.05$; 与48h组相比: $\Delta P < 0.05$

共29个CpG位点,在所有分析的样品中总共551个CpG位点)。而在NIH3T3细胞中,未检测出miR-375异常DNA甲基化。

2.3 miR-375甲基化质谱数据分析 用不同浓度5-Aza-CdR分别处理MIN6细胞24、48、72h后,检测到miR-375基因DNA在每组细胞中均高度甲基化(图3),其中50 μmol/L组miR-375平均甲基化

率最低。

2.4 mmu-miR-375表达水平与其启动子区甲基化的相关性分析 分析mmu-miR-375启动子的CpG甲基化程度与miR-375的相对表达水平之间的相关性后,发现在MIN6细胞中,DNA甲基化水平与miR-375的相对表达水平之间负相关($r = -0.71, F = 4.114, P = 0.01$)。见表1。

2.5 MIN6细胞和NIH3T3细胞间的mmu-miR-375表达水平比较 通过qRT-PCR检测MIN6细胞和NIH3T3细胞中mmu-miR-375的相对表达水平,结果显示,经5-Aza-CdR处理的MIN6细胞中mmu-miR-375的相对表达低于未经处理的NIH3T3细胞($P < 0.05$,图4)。

3 讨论

近年来,有关表观遗传学机制在糖尿病的发生和发展过程中起至关重要的作用的研究越来越多^[2]。染色质的结构以及基因的表达水平受甲基化修饰的影响,使之成为表观遗传学修饰的重要机制之一。目前部分研究是在全基因组DNA的甲基化修饰水平上检测扫描与糖尿病相关基因的差异脱

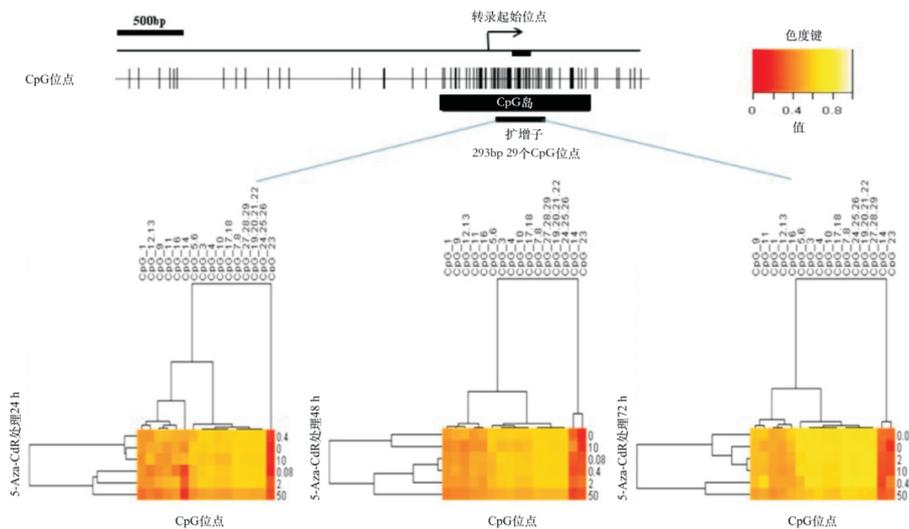


图2 miR-375在各组中甲基化聚类分析结果

箭头:转录起始位点(transcription start site, TSS);垂直条:双核苷酸(CpG)位点;灰色填充框:CGI;黑色填充条:MassARRAY检测区域;黑色条下方显示了扩增子特征;bp表示碱基对;每行代表用5-Aza-CdR处理24、48和72h样品;每列代表CpG单元,其是单个CpG位点或CpG位点的组合;不同的颜色编码反映不同的甲基化程度,黄色为100%红色为0%

表1 mmu-miR-375基因的表达水平与其启动子区域中的甲基化之间的相关性($\bar{x} \pm s$)

| 组别(MIN6) | miR-375表达量 | miR-375平均甲基化率 | F值 | P值 | r值 |
|------------------|-------------------|-------------------|-------|-------|--------|
| 0 μmol/L | 0.760 8 ± 0.084 2 | 0.859 3 ± 0.189 6 | | | |
| 50 μmol/L(24 h组) | 1.003 4 ± 0.101 8 | 0.667 5 ± 0.147 3 | 4.114 | 0.010 | -0.710 |
| 50 μmol/L(48 h组) | 1.003 5 ± 0.101 8 | 0.730 0 ± 0.152 2 | | | |
| 50 μmol/L(72 h组) | 1.003 5 ± 0.104 9 | 0.751 9 ± 0.150 9 | | | |

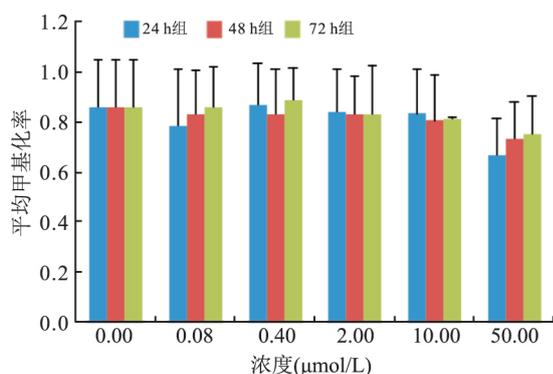
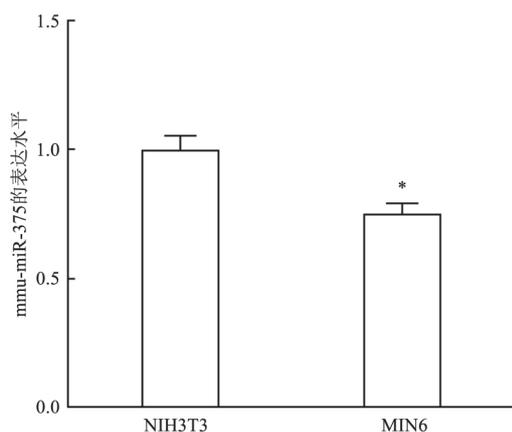


图3 各组中平均甲基化率的比较

图4 mmu-miR-375 在 MIN6 细胞和 NIH3T3 细胞中表达的比较
与 NIH3T3 比较: * $P < 0.05$

氧核糖核酸甲基化, 比如 Hall et al 发现人胰岛中标注为 PDX1 的 CpG 位点在暴露于高糖环境 48 h 后, 其 DNA 甲基化增加^[3]。还有研究是针对糖尿病功能已知的相关基因, 使用特定的引物检测差异脱氧核糖核酸甲基化, 比如 Dayeh et al 研究表明 40 个 2 型糖尿病相关核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) 中的 19 个 (48%) 引入或移除了 CpG 位点^[4]。故从表观遗传学角度来探讨并揭示 T2DM 的发病机制及筛选个体化治疗分子靶点具有重要意义。

胰腺发育、胰岛素分泌以及胰腺细胞的生长和增殖受 miR-375 基因调控。胰腺中 miR-375 基因表达的减少在糖尿病的发病机制起重要作用^[1]。课题组前期研究表明 T2DM 患者外周血白细胞中 miR-375 启动子区甲基化水平低于 NGT 人群, 且其甲基化程度与血浆中 miR-375 基因的表达水平具有负相关性^[5]。也有研究显示, miR-375 基因的表达可能受 DNA 低甲基化水平的调控, 且这种 DNA 低甲基化水平与 T2DM 的发病机制有直接或间接的关

系^[6]。5-Aza-CdR 作为常用的去甲基化药物之一, 其作用原理是在细胞周期的 DNA 合成期, 通过抑制 DNA 甲基转移酶来终止甲基化反应, 使得基因 DNA 呈去甲基化状态, 从而使抑癌基因再次得到表达。

近年来, 对 miRNA 的甲基化逐渐深入研究后发现, 肿瘤的发生和发展与其密不可分。Dong et al^[7] 研究显示肿瘤抑制基因高甲基化状态参与癌症发生发展。目前, 除了从临床工作中获取一定的组织标本之外, ANC-1、CFPAC-1、PANC-1、MiaPACA-2、BX-PC-3、ASPC-1、MIA、T3M4、SU86 等人胰腺癌细胞株也常常被用于人胰腺肿瘤的研究中。研究表明 5-Aza-CdR 抑制胰腺癌 PANC-1 细胞系的生长和凋亡, 其抑制结果主要是通过降低癌细胞中基质金属蛋白的表达来实现^[8]。有研究^[9]表明, 经不同浓度的 5-Aza-CdR 处理后的胰腺癌 MiaPACA-2 细胞, 与之相关的抑癌基因 RUNX3 的异常甲基化状态可恢复正常。本研究结果显示 5-Aza-CdR 在一定浓度范围内能抑制 MIN6 细胞系的生长和增殖, 随着 5-Aza-CdR 浓度和时间的增加, MIN6 细胞系受其抑制的作用逐渐增强, 与以前关于 5-Aza-CdR 药理作用研究结果是一致的^[8]。用不同浓度的 5-Aza-CdR 溶液处理 MIN6 细胞 24、48、72 h 后, 50 μmol/L 浓度组平均甲基化率低于其他浓度组。本研究中未发现 NIH3T3 细胞存在 miR-375 甲基化, 这可能与 miR-375 甲基化水平具有细胞特异性, 再有受限于甲基化检测区域有关, 后续可通过 DNA 甲基化高通量测序评估甲基化水平。

资料^[10-11]显示, 人胰腺癌旁正常组织的 miR-375 表达水平高于胰腺癌组织, 且胰腺癌细胞中 miR-375 基因的上调可使癌细胞凋亡加速, 同时使其周期发展受阻, 而 miR-375 的下调具有相反的作用。但目前, 尚未见有关 miR-375 在胰岛 β 细胞中甲基化程度及其表达水平的相关报道。

miR-375 基因在调节胰岛发育、胰岛素分泌和 β 细胞分化中起相应作用。Latreille et al^[12]曾对此进行相关研究, 发现敲除 miR-375 基因后的小鼠与未敲除时相比, 其胰岛 α 和 β 细胞的生长和增殖都受到一定影响, 此外, miR-375 基因在 α 和 β 细胞中起着完全相反的作用, 血浆中只有一小部分 miR-375 基因源自胰岛 β 细胞。数据显示 T2DM 患者外周血单个核细胞中 miR-375 基因甲基化水平低于对照组, 呈低甲基化状态, miR-375 基因的表达水平确是对照组的 171%^[13]。因此, 推断 miR-375 基因在正常人胰岛 β 细胞中呈高甲基化, MIN6 细胞不仅

能分泌胰岛素,而且有葡萄糖依赖性,因此为进行其相关功能的研究通常用 MIN6 细胞代替正常人胰岛 β 细胞。但 miR-375 基因在 MIN6 细胞中呈高甲基化状态,而表达水平较低,推测 NGT 人群胰岛 β 细胞中 miR-375 基因可能也呈高甲基化状态,而其表达呈现低水平,但尚需进一步研究证实。

参考文献

- [1] Eliasson L. The small RNA miR-375-a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 456: 95 - 101.
- [2] 洪陈亮,秦旭平. 糖尿病发病的表观遗传学机制[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(1): 12 - 7.
- [3] Hall E, Nitert M D, Volkov P, et al. The effects of high glucose exposure on global gene expression and DNA methylation in human pancreatic islets [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 472(9): 57 - 67.
- [4] Dayeh T A, Olsson A H, Volkov P, et al. Identification of CpG-SNPs associated with type 2 diabetes and differential DNA methylation in human pancreatic islets [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(5): 1036 - 46.
- [5] Sun K, Chang X, Yin L, et al. Expression and DNA methylation status of microRNA-375 in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 967 - 72.
- [6] Wang X, Chang X, Li J, et al. DNA methylation of microRNA-375 in impaired glucose tolerance [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 775 - 80.
- [7] Dong Y, Wang A. Aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma tumor suppression (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(3): 963 - 8.
- [8] 王蒙. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胰腺癌细胞株 Panc-1 细胞生物学行为的影响及机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.
- [9] 韩旭,谭志军,郭仁德,等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对人胰腺癌细胞系 MiaPaca2 生长和 RUNX3 基因甲基化的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2013, 35(1): 17 - 21.
- [10] Zhou J, Song S, He S, et al. MicroRNA-375 targets PDK1 in pancreatic carcinoma and suppresses cell growth through the Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(4): 950 - 6.
- [11] 宋世铎. miR-375 在胰腺导管腺癌中的表达及功能的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [12] Latreille M, Herrmanns K, Renwick N, et al. MiR-375 gene dosage in pancreatic β -cells: implications for regulation of β -cell mass and biomarker development [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(10): 1159 - 69.
- [13] Sun K, Chang X, Yin L, et al. Expression and DNA methylation status of microRNA-375 in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 967 - 72.

Methylation of miR - 375 promoter in MIN6 cells

Gao Min¹, Yin Liang², Kuang Xuemei³, et al

(¹Medical College of Shihezi University, ²Dept of Endocrine and Metabolic Diseases,

³Dept of Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000)

Abstract Objective To analyze the DNA methylation spectrum of mouse islet β cell line (MIN6) using MassARRAY platform, and to explore the changes of methylation model by treating MIN6 cells with DNA demethylation drug 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR). **Methods** The methylation status of miR-375 gene DNA in MIN6 cell line and mouse embryonic fibroblast cell line (NIH3T3) were detected by MassARRAY platform. The changes of miR-375 gene methylation status were evaluated after treatment with different concentrations of 5-Aza-CdR. The effect of 5-Aza-CdR on the growth and proliferation of MIN6 cells was detected by Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT). The expression of miR-375 in MIN6 cells and untreated NIH3T3 cells was detected by qRT-PCR. **Results** 5-Aza-CdR could inhibit the growth of MIN6 cells. After treated with 5-Aza-CdR for 24, 48, 72 h, the OD value of 2 μ mol/L concentration group was different from that of other groups ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant at different time points ($P < 0.05$). After MIN6 cells were treated with different concentrations of 5-Aza-CdR for 24, 48, 72 h, the DNA of mmu-miR-375 in each group was highly methylated, and the average methylation rate of miR-375 DNA in 50 μ mol/L group was lower than that in other groups. The expression of mmu-miR-375 in MIN6 cells treated with 5-Aza-CdR in 50 μ mol/L group was significantly higher than that in 0 μ mol/L group after 24, 48, 72 h ($P < 0.05$). The DNA expression of mmu-miR-375 gene in MIN6 cells was significantly lower than that in NIH3T3 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** These results indicate that promoter hypermethylation of the mmu-miR-375 is a common event in MIN6 cells.

Key words Type 2 diabetes; miR-375; DNA demethylation; MassARRAY platform