

说明书

发明名称: 一种新型微肽HMBJ及其应用

技术领域

[0001] 本申请属于生物医药领域，具体涉及一种新型微肽HMBJ、编码新型微肽HMBJ的lncRNA和/或ORF，及其在诊断或辅助诊断、治疗或辅助治疗多种器官纤维化中的应用。

背景技术

[0002] 长链非编码RNA(long non coding RNA, lncRNA)是指由一段长度大于200个核苷酸组成且被认为不能翻译为蛋白质的功能性RNA分子。已有相关研究表明，lncRNA在表观遗传调控、细胞周期和分化调控中发挥重要作用，参与了人类重大健康疾病包括癌症、退行性神经疾病等。随着分子生物学、计算生物学和深度测序技术的飞速发展，大量之前未被注释、隐藏在长链非编码RNA中的非经典短开放阅读框(open reading frames, ORF)实际具有编码功能蛋白的作用。微肽(Micropeptide)即是一类由短开放阅读框(short open reading frames, sORFs)编码产生，长度在2~100个密码子内的翻译产物。

[0003] 器官纤维化(Organ Fibrosis)是指可发生于多种器官的纤维化疾病，主要病理改变为器官组织内的纤维结缔组织增多和实质细胞减少，发生在脏器的持续纤维化病变可破坏器官结构和功能，进一步导致脏器衰竭引发恶性肿瘤，被认为是介于良恶之间的类肿瘤病变，严重威胁人类健康和生命。

[0004] 发现和研究器官纤维化相关微肽对开展新颖有效的疾病诊断和治疗具有重要意义，并可为探究新的应用领域提供重要的参考和开发价值。然而，目前尚未有关于器官纤维化研究领域的微肽报道。

[0005] 发明内容

[0006] 1.发明目的

[0007] 本申请的目的之一，是提供一种lncRNA及其核苷酸序列，该序列在器官纤维化细胞和/或组织中低表达。

- [0008] 本申请的目的之二，是提供一种ORF及其核苷酸序列，该ORF序列位于上述lncRNA中，可以编码得到新型微肽HMBJ。
- [0009] 本申请的目的之三，是提供一种新型微肽HMBJ及其氨基酸序列，该新型微肽HMBJ为首次发现的全新的人体内源性多肽。
- [0010] 本申请的目的之四，是提供上述一种lncRNA在制备诊断或辅助诊断器官纤维化试剂和/或制备治疗或辅助治疗器官纤维化药物中的应用。
- [0011] 本申请的目的之五，是提供上述一种lncRNA中的ORF序列在制备诊断或辅助诊断器官纤维化试剂和/或制备治疗或辅助治疗器官纤维化药物中的应用。
- [0012] 本申请的目的之六，是提供上述一种新型微肽HMBJ或编码所述新型微肽HMBJ的核苷酸在制备治疗或辅助治疗器官纤维化药物中的应用。
- [0013] 2.技术方案
- [0014] 为了达到上述发明目的，本申请所采用的技术方案如下：
- [0015] 本申请提供了一种lncRNA分子ENSG00000272654，其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示，申请人通过分析多个器官纤维化高通量测序数据，首次发现lncRNA分子ENSG00000272654与器官纤维化具有重要关系，具体为在多种器官纤维化细胞和/或组织中低表达，目前并未有相关研究报道。
- [0016] 本申请还提供了上述lncRNA分子ENSG00000272654的开放阅读框(open reading frames, ORF)，其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示，申请人通过分析lncRNA分子ENSG00000272654的开放阅读框的翻译特征，发现其具有编码功能性蛋白的潜力，并且通过使用包括基因编辑、免疫沉淀和LC-MS/MS等方法进行内源性编码验证，证实lncRNA分子ENSG00000272654具有编码序列(ORF)，且该序列尚未被任何报道。
- [0017] 本申请还提供了一种新型微肽HMBJ，其氨基酸序列含有如SEQ ID NO.3所示的序列，由人源lncRNA ENSG00000272654编码，为首次发现的全新的人体内源性多肽。
- [0018] 本申请还提供了一种核苷酸，该核苷酸编码上述一种新型微肽HMBJ，该核苷酸序列并不限于上述lncRNA分子ENSG00000272654或其含有的ORF，本领域技术人员知晓可以根据新型微肽HMBJ的氨基酸序列设计相应的核苷酸序列。

- [0019] 本申请还提供了一种重组载体，该重组载体包括上述编码新型微肽HMBJ的核苷酸序列，该重组载体可以是质粒、病毒载体等本领域技术人员知晓的载体。
- [0020] 本申请还提供了上述新型微肽HMBJ、编码新型微肽HMBJ的核苷酸、重组载体在制备治疗或辅助治疗器官纤维化药物中的应用，申请人通过验证发现，新型微肽HMBJ对器官纤维化细胞模型具有显著的抑制作用，可以用于治疗或辅助治疗器官纤维化。
- [0021] 进一步地，上述器官纤维化包括肝纤维化、肾纤维化和/或肺纤维化等。
- [0022] 本申请还提供了上述lncRNA分子ENSG00000272654和/或其含有的ORF在制备诊断或辅助诊断器官纤维化试剂中的应用。
- [0023] 进一步地，上述诊断或辅助诊断器官纤维化试剂包括特异性扩增lncRNA分子ENSG00000272654或其含有的ORF的引物。
- [0024] 进一步地，上述特异性引物对含有以下核苷酸序列：
- [0025] F: CAAGGGATGGAGGCGAAACT；
- [0026] R: CCACAGTGCTGGTCAAGTCA。
- [0027] 进一步地，上述器官纤维化包括肝纤维化、肾纤维化和/或肺纤维化。
- [0028] 本申请还提供了一种治疗或辅助治疗器官纤维化的药物组合物，该药物组合物至少含有上述新型微肽HMBJ，或上述编码新型微肽HMBJ核苷酸，或上述重组载体，及药学上可接受的载体。
- [0029] 本申请还提供了一种诊断或辅助诊断器官纤维化的试剂盒，该试剂盒包括特异性扩增lncRNA分子ENSG00000272654或其含有的ORF的引物。
- [0030] 进一步地，上述特异性引物对含有以下核苷酸序列：
- [0031] F: CAAGGGATGGAGGCGAAACT；
- [0032] R: CCACAGTGCTGGTCAAGTCA。
- [0033] 3.有益效果
- [0034] 本申请与现有技术相比，其有益效果在于：
- [0035] (1)本申请提供了一种lncRNA及其核苷酸序列，通过分析多个器官纤维化测序数据，发现lncRNA分子ENSG00000272654在器官纤维化中低表达，通过文献检

索,未发现有相关研究报道,可用于诊断或辅助诊断、治疗或辅助治疗器官纤维化,或制备诊断或辅助诊断、治疗或辅助治疗的器官纤维化试剂。

[0036] (2)本申请提供了一种lncRNA的开放阅读框的核苷酸序列,所述核苷酸序列可以编码得到一种新型微肽HMBJ,经数据库(BLAST, UniProt)和文献资料检索,未发现与微肽HMBJ具有同源性序列的蛋白或多肽片段,可用于编码生成新型微肽HMBJ,或诊断或辅助诊断、治疗或辅助治疗器官纤维化,或制备诊断或辅助诊断、治疗或辅助治疗的器官纤维化试剂。

[0037] (3)本申请提供了一种具有全新氨基酸序列的新型微肽HMBJ,经数据库(BLAST, UniProt)和文献资料检索,未发现与微肽HMBJ具有同源性序列的蛋白或多肽片段。该新型微肽HMBJ由71个氨基酸组成,所述微肽HMBJ的合成肽在体外对人肝纤维化、肾纤维化和肺纤维化的关键指标包括I型胶原 $\alpha 1$ 链基因(Col1a1),转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)和结缔组织生长因子(CTGF)具有显著的抑制作用。新型微肽HMBJ也可以作为其他器官纤维化的治疗药物,极大扩展了该微肽的治疗谱,为器官纤维化药物的开发提供了新思路。

[0038] (4)本申请根据新型微肽HMBJ的氨基酸序列,利用固相合成法得到全新的微肽HMBJ的合成肽,所述方法主要包括多肽合成、多肽纯化、多肽纯度检测和质谱鉴定;通过构建3种器官纤维化细胞模型,例如分别在人肝星状细胞LX-2、人非小细胞肺癌细胞系A549和人肾近曲小管细胞HK2中加入10nmol的重组人TGF $\beta 1$ (Peprotech)刺激因子和不同浓度的微肽HMBJ的合成肽,共孵育24h后,使用TRIzol试剂提取收集细胞样本的总RNA,随后使用逆转录试剂对提取的总RNA进行逆转录后利用实时荧光定量PCR方法检测3种器官纤维化细胞模型中基因Col1a1, TGF $\beta 1$ 和CTGF的mRNA表达情况,结果表明微肽HMBJ的合成肽对3种器官纤维化细胞模型具有显著的抑制作用。

附图说明

[0039] 图1为使用差异分析法分析ENSG00000272654在器官纤维化中低表达火山图;

[0040] 图2为使用基因编辑方法对微肽HMBJ插入Flag标签单克隆细胞Sanger测序图;

[0041] 图3为使用免疫沉淀方法检测微肽HMBJ的目的条带表达情况;

[0042] 图4为使用LC-MS/MS方法检测微肽HMBJ的蛋白质谱图;

- [0043] 图5为使用qPCR方法对4个器官纤维化基因引物的特异性进行检测的融解曲线；
- [0044] 图6为使用qPCR方法对人肝纤维化细胞模型构建的基因指标检测；
- [0045] 图7为使用qPCR方法对人肾纤维化细胞模型构建的基因指标检测；
- [0046] 图8为使用qPCR方法对人肺纤维化细胞模型构建的基因指标检测；
- [0047] 图9为微肽HMBJ合成肽的液相结果图；
- [0048] 图10为微肽HMBJ合成肽的质谱结果图；
- [0049] 图11为使用qPCR方法检测微肽HMBJ在人肝纤维化细胞模型中的抑制作用；
- [0050] 图12为使用qPCR方法检测微肽HMBJ在人肾纤维化细胞模型中的抑制作用；
- [0051] 图13为使用qPCR方法检测微肽HMBJ在人肺纤维化细胞模型中的抑制作用。

具体实施方式

- [0052] 下面结合具体实施例对本申请进一步进行描述。
- [0053] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本申请的技术领域的技术人员通常理解的含义相同；本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。
- [0054] 实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商提供的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。
- [0055] 如本文所使用，术语“约”用于提供与给定术语、度量或值相关联的灵活性和不精确性。本领域技术人员可以容易地确定具体变量的灵活性程度。
- [0056] 如本文所使用，术语“.....中的至少一个”旨在与“.....中的一个或多个”同义。例如，“A、B和C中的至少一个”明确包括仅A、仅B、仅C以及它们各自的组合。
- [0057] 浓度、量和其他数值数据可以在本文中以范围格式呈现。应当理解，这样的范围格式仅是为了方便和简洁而使用，并且应当灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围极限的数值，而且还包括涵盖在所述范围内的所有单独的数值或子范围，就如同每个数值和子范围都被明确叙述一样。例如，约1至约4.5的数值范围应当被解释为不仅包括明确叙述的1至约4.5的极限值，而且还包括单独的数字(诸如2、3、4)和子范围(诸如1至3、2至4等)。相同的原理适用于仅叙述一个数值的

范围，诸如“小于约4.5”，应当将其解释为包括所有上述的值和范围。此外，无论所描述的范围或特征的广度如何，都应当适用这种解释。

- [0058] 在实施例中，用于微肽HMBJ内源性编码验证方法包括基因编辑、免疫沉淀和LC-MS/MS，具体包括：
- [0059] 使用基因编辑方法在微肽HMBJ的基因组位置正确插入Flag标签；
- [0060] 使用免疫沉淀方法结合化学发光观察目的条带的产生；
- [0061] 使用LC-MS/MS方法检测微肽HMBJ的蛋白质谱图。
- [0062] 在实施例中，使用实时荧光定量PCR方法对器官纤维化细胞模型进行基因指标检测，具体包括：
- [0063] 分别在人肝星状细胞LX-2、人非小细胞肺癌细胞系A549和人肾近曲小管细胞HK2进行细胞铺板并加入不同浓度的重组人TGF β 1(Peprotech)刺激因子；
- [0064] 分别持续刺激24h和48h后，使用实时荧光定量PCR方法分别检测基因Col1a1和 α -SMA的mRNA表达情况判断细胞模型是否构建成功。
- [0065] 在实施例中，利用固相合成法得到新型微肽HMBJ，并对合成肽进行质量检验，具体包括：
- [0066] 肽树脂合成包括使用六氢吡啶/N，N二甲基甲酰胺(DMF)脱帽液脱帽后，使用DMF洗涤树脂、随后加入缩合剂在反应釜中充分反应，最后使用DMF充分洗涤树脂，洗净副产物；
- [0067] 加入裂解液充分裂解多肽，用砂芯漏斗将树脂与多肽分离；
- [0068] 加入无水乙醚使多肽析出，离心倒掉清液，再用无水乙醚洗涤多肽，抽干得多肽粗品；
- [0069] 使用去离子水溶解多肽粗品、过滤，并通过半制备型高效液相色谱进行纯化；
- [0070] 通过分析型RP HPLC进行多肽纯度检测。
- [0071] 在实施例中，使用实时荧光定量PCR方法检测微肽HMBJ在纤维化细胞模型中的抑制作用的方法包括：
- [0072] 将人肝星状细胞LX-2、人非小细胞肺癌细胞系A549或人肾近曲小管细胞HK2进行细胞计数并铺板；

- [0073] 除空白组外，分别加入10nmol的重组人TGF β 1(Peprotech)刺激因子，持续刺激24h；
- [0074] 使用TRIzol试剂提取收集细胞样本的总RNA，使用逆转录试剂对提取的总RNA进行逆转录后，利用qPCR预混液进行qPCR反应；
- [0075] 使用实时荧光定量PCR仪器分别检测基因Col1a1，TGF β 1和CTGF的mRNA表达情况。
- [0076] 实施例1
- [0077] 本实施例中，对基因ENSG00000272654在多种器官纤维化中的表达水平进行分析。
- [0078] 以纤维化和智人为关键词在NCBI和ENA数据库中进行检索并使用Aspera命令批量下载多种器官纤维化相关的高通量测序数据，包括人肝纤维化和正常细胞数据(登录号：PRJNA638727)、人肝纤维化患者和健康组织数据(登录号：PRJEB27201)、人肾纤维化和正常细胞数据(登录号：GSE23338)、人肺纤维化患者和健康组织数据(登录号：PRJNA878759)。随后对下载的测序数据进行处理和分析，首先通过Fastp软件包(v0.18.0)过滤掉原始数据中包含接头序列的读段数和低质量的碱基，随后使用Bowtie软件包(v1.3.0)将该数据与人的tRNA和rRNA序列进行比对，将未比对成功的数据通过HISAT2软件包(v2.2.1)与人类参考基因组(GRCh38.Ensembl98)进行比对，最终将比对成功率大于90%的读段数作为后续的分析数据，随后通过StringTie软件包(v1.2.2)对数据中的基因和转录本进行组装和定量，再通过DESeq2软件包(v1.38.3)进行差异性基因表达分析，结果显示基因ENSG00000272654的显著性 $p_{adj} < 0.05$ 且差异倍数($\log_2\text{FoldChange}$) < -1 ，表明该基因在多种器官纤维化中处于低表达水平。表达差异如图1所示。
- [0079] 实施例2
- [0080] 本实施例中，对微肽HMBJ的编码能力进行内源性检测，包括基因编辑、免疫沉淀和LC-MS/MS。
- [0081] 通过Ensembl数据库下载ENSG00000272654的基因序列，并设计出相应的sgRNA质粒和含有Flag标签的供体片段，通过lipo3000脂质体转染试剂将上述的sgRNA质粒和供体片段导入293T细胞中，转染48h后观察荧光。通过胰酶消化收

集细胞，离心弃上清后使用基础培养基重悬细胞进行流式分选，将分选后的细胞计数后进行单克隆铺板和Sanger测序，筛选出正确插入Flag标签的单克隆细胞，如图2所示。

[0082] 使用PBS润洗细胞两次，并通过胰酶消化收集细胞，离心弃上清后使用RIPA裂解液重悬细胞沉淀，冰上裂解30min后，12000g离心15min收集上清，并加入Flag抗体和琼脂糖凝胶以形成蛋白-抗体-凝胶复合物。6000g离心1min去除凝胶后，加入1×SDS上样缓冲液，混匀后煮沸变性10min。通过12% SDS PAGE凝胶分离总蛋白后转移到PVDF膜上，然后加入5%脱脂奶粉室温封闭3h，TBST洗涤5次，每次10min。加入Flag第一抗体4℃孵育过夜后，TBST洗涤5次，每次10min。第二抗体室温孵育1h，TBST洗涤5次，每次10min。加入ECL特超敏化学发光液显影，经Tannon成像系统检测是否有目的条带产，结果如图3所示。

[0083] 为了进一步证明微肽HMBJ的编码能力，将上述步骤中含有目的蛋白的SDS PAGE凝胶进行考马斯亮蓝染色，并将肉眼可见的目的条带切胶并进行LC-MS/MS(液相色谱串联四极杆质谱联用仪)检测，得到目的微肽的质谱结果，如图4所示。

[0084] 经基因编辑，免疫沉淀和质谱检测发现在目的微肽的基因组序列插入Flag标签后，有微肽HMBJ的目的条带和质谱肽段出现，充分证明新型微肽HMBJ具有内源性编码的能力。

[0085] 实施例3

[0086] 本实施例中，使用实时荧光定量PCR方法对3个器官纤维化细胞模型进行基因指标检测。

[0087] (1)引物设计

[0088] 器官纤维化细胞模型的关键指标包括I型胶原 $\alpha 1$ 链基因(Col1a1)，转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)和结缔组织生长因子(CTGF)，采用Primer Premier 5.0设计相应引物，Col1a1上下游引物、TGF $\beta 1$ 上下游引物、CTGF上下游引物、 α -SMA上下游引物。按照Life Invitrogen公司的TRIzol试剂使用说明书要求提取收集细胞样本的总RNA，再用NanoDrop 2000超微量分光光度计定量所提取的RNA的纯度和浓度，琼脂糖质检确保提取RNA的完整性。使用逆转录试剂

HiScript®III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)对提取的总RNA进行逆转录后，利用qPCR预混液ChamQ SYBR qPCR Master Mix进行qPCR反应，反应体系如下表：

[0089] 表1 qPCR反应体系

试剂	使用量 (μl)
2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix	10.0
Primer F	0.4
Primer R	0.4
cDNA	1.0
ddH ₂ O	8.2
Total	20

[0090] 将上述组份混合均匀后按以下程序：95℃30s预变性，95℃10s、60℃30s，50个循环。qPCR反应结束后，采集各个样品孔的C_q值，并且样品的3个复孔间的C_q值最大误差≤0.5，以保证数据的准确性，并观察设计引物的融解曲线(Melting curve)是否为单峰以判断反应的特异性，如图5所示。

[0091] (2)模型构建

[0092] 分别将人肝星状细胞LX-2、人非小细胞肺癌细胞系A549和人肾近曲小管细胞HK2培养在在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养至细胞密度80%以上时，用胰酶消化收集细胞，离心弃上清后使用完全培养基重悬细胞并通过细胞计数仪进行计数，将细胞浓度调整为1.5 × 10⁵个/mL后，接种到六孔细胞培养板中，并放入37℃，5% CO₂的细胞培养箱中继续培养。细胞培养24h后吸去培养基，分别加入不同浓度的重组人TGFβ 1(Peprotech)刺激因子，并在持续刺激24h、48h后，使用qPCR方法分别检测基因Col1a1和α-SMA的mRNA表达情况，如图6、7、8所示。

[0093] 实施例4

[0094] 本实施例中，利用固相合成法得到微肽HMBJ，并对合成微肽进行质量检验。

[0095] 本实施例中，采用多肽固相合成法合成微肽HMBJ，采用制备型HPLC对合成的微肽HMBJ进行分离纯化，利用分析型RP HPLC测定微肽HMBJ的纯度。多肽固相合成法以Fmoc-Thr-wang resin为起始原料，然后用保护氨基酸依次偶联至目标序列的最后一个氨基酸为止，偶联工作完成后充分洗涤、裂解、后处理即

得多肽粗品。粗品溶解后，用制备型高效液相经过纯化、浓缩、冻干得多肽纯品。具体反应步骤如下：

- [0096] (1)肽树脂合成
- [0097] 称取1mmol Fmoc-Thr-wang resin，倒入玻璃砂芯反应柱中，加入20ml CH₂Cl₂使树脂充分膨胀。
- [0098] a.脱帽：加入20%六氢吡啶/N,N二甲基甲酰胺(DMF)的脱帽液20ml，反应一段时间后将脱帽液抽干，用DMF洗涤一次后，再加入一次脱帽液20ml反应，脱去Fmoc保护基；
- [0099] b.洗涤：将脱帽液抽干，用DMF洗涤树脂，充分洗净副产物；
- [0100] c.缩合：将用于偶联的保护氨基酸和激活剂溶于DMF和缩合剂中，并在反应釜中充分反应；
- [0101] d.洗涤：将反应液抽干，用DMF充分洗涤树脂，洗净副产物。
- [0102] (2)裂解
- [0103] 将抽干的树脂装入锥形瓶中，加入裂解液充分裂解合好的多肽，用砂芯漏斗将树脂与多肽分离，所述的裂解液的成分及各成分的体积组成为：三氟乙酸:苯酚:水:苯甲硫醚:EDT=90:3:3:2:2。
- [0104] (3)后处理
- [0105] 将裂解液加入冰浴后的无水乙醚中，缓慢搅拌使多肽析出，离心倒掉上清液后，用无水乙醚洗涤多肽，抽干得多肽粗品。
- [0106] (4)纯化
- [0107] a.溶解：使用去离子水溶解多肽粗品，并用孔径为0.45 μ m的滤膜进行过滤。
- [0108] b.制备：通过半制备型高效液相色谱进行纯化，流动相：A为0.1% TFA(乙腈)，B为0.1% TFA(水)，纯化体系如下表：

[0109] 表2多肽纯化体系

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%	波长 nm
0	10	15	85	220
50	10	50	50	220

- [0110] 收集紫外波长220nm处的溶液，经MS确认分子量与理论值一致，经HPLC分析该溶液纯度大于95%以上，将该合格溶液用旋转蒸发仪37℃减压浓缩，去除有机

溶剂，装入冻干盘中放置在-80℃结冰后，使用冷冻干燥机进行冷冻干燥得多肽纯品。

[0111] (5)纯度检测

[0112] 收集冻干后的纯化产物，通过分析型RP HPLC进行多肽纯度检测。分析条件为：流动相：0.1% TFA(乙腈)、0.1% TFA(水)；上样量：10 μL，具体反应体系如下表：

[0113] 表3纯度检测体系

时间 (min)	流速 (mL/min)	A%	B%	波长 nm
0.0	1	15	85	220
25.0	1	70	30	220
25.1	1	100	0	220
30.0	1	Stop		220

[0114] 合成的多肽经反向液相色谱分析进行纯度鉴定，结果表明制备的微肽HMBJ纯度达95.86%，大于95%，如图9，10所示，符合后续实验要求，具体信息如下表：

[0115] 表4纯度检测结果

名称	峰面积	纯度 (%)
微肽 HMBJ	8331005	95.86

[0116] 实施例5

[0117] 本实施例中，检测微肽HMBJ对人肝纤维化细胞模型的抑制作用。将人肝星状细胞LX-2培养在37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养至细胞密度80%以上时，用胰酶消化收集细胞，离心弃上清后使用完全培养基重悬细胞并通过细胞计数仪进行计数，将细胞浓度调整为1.5 × 10⁵个/mL后，接种到六孔细胞培养板中，并放入37℃，5% CO₂的细胞培养箱中继续培养。细胞培养24h后吸去培养基，分别加入2%DMSO溶剂作为阴性对照、20 μmol的羟尼酮(Hydronidone)作为阳性对照，其余各组加入等比例的40 μmol、10 μmol、2.5 μmol、625nmol和156nmol合成肽HMBJ作为给药组，半小时后，除空白对照外，其余各组分别加入10nmol的重组人TGF β 1(Peprotech)刺激因子，持续刺激24h后分别检测基因Col1a1，TGF β 1和CTGF的mRNA表达情况，如图11所示。

[0118] 实施例6

- [0119] 本实施例中，检测微肽HMBJ对人肾纤维化细胞模型的抑制作用。
- [0120] 将人肾近曲小管细胞HK2培养在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养至细胞密度80%以上时，用胰酶消化收集细胞，离心弃上清后使用完全培养基重悬细胞并通过细胞计数仪进行计数，将细胞浓度调整为 1.5×10^5 个/mL后，接种到六孔细胞培养板中，并放入37℃，5%CO₂的细胞培养箱中继续培养。细胞培养24h后吸去培养基，分别加入2%DMSO溶剂作为阴性对照、20 μmol的羟尼酮(Hydronidone)作为阳性对照，其余各组加入等比例的40 μmol、10 μmol、2.5 μmol、625nmol和156nmol合成肽HMBJ作为给药组，半小时后，除空白对照外，其余各组分别加入10nmol的重组人TGF β 1(Peprotech)刺激因子，持续刺激24h后分别检测基因Col1a1，TGF β 1和CTGF的mRNA表达情况，如图12所示。
- [0121] 实施例7
- [0122] 本实施例中，检测微肽HMBJ对人肺纤维化细胞模型的抑制作用。
- [0123] 将人非小细胞肺癌细胞系A549培养在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养至细胞密度80%以上时，用胰酶消化收集细胞，离心弃上清后使用完全培养基重悬细胞并通过细胞计数仪进行计数，将细胞浓度调整为 1.5×10^5 个/mL后，接种到六孔细胞培养板中，并放入37℃，5%CO₂的细胞培养箱中继续培养。细胞培养24h后吸去培养基，分别加入2%DMSO溶剂作为阴性对照、2 μmol的尼达尼布(Nintedanib)作为阳性对照，其余各组加入等比例的40 μmol、10 μmol、2.5 μmol、625nmol和156nmol合成肽HMBJ作为给药组，半小时后，除空白对照外，其余各组分别加入10nmol的重组人TGF β 1(Peprotech)刺激因子，持续刺激24h后分别检测基因Col1a1，TGF β 1和CTGF的mRNA表达情况，如图13所示。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种新型微肽HMBJ，其特征在于，所述新型微肽HMBJ含有如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。
- [权利要求 2] 一种核苷酸，其特征在于，所述核苷酸编码权利要求1所述的一种新型微肽HMBJ。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的一种核苷酸，其特征在于，所述核苷酸序列包括lncRNA分子ENSG00000272654和/或其含有的ORF，所述lncRNA分子ENSG00000272654的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示；所述lncRNA分子ENSG00000272654含有的ORF的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
- [权利要求 4] 权利要求3所述的一种核苷酸在制备诊断或辅助诊断器官纤维化试剂中的应用，所述器官纤维化包括肝纤维化、肾纤维化和/或肺纤维化。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述的一种核苷酸在制备诊断或辅助诊断器官纤维化试剂中的应用，其特征在于，所述诊断或辅助诊断器官纤维化试剂包括特异性扩增lncRNA分子ENSG00000272654或其含有的ORF的引物。
- [权利要求 6] 一种重组载体，其特征在于，所述重组载体含有权利要求2或3所述的核苷酸。
- [权利要求 7] 权利要求1所述的一种新型微肽HMBJ、权利要求2或3所述的一种核苷酸、或权利要求6所述的一种重组载体在制备治疗或辅助治疗器官纤维化药物中的应用，所述器官纤维化包括肝纤维化、肾纤维化和/或肺纤维化。
- [权利要求 8] 一种治疗或辅助治疗器官纤维化的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物至少含有权利要求1所述的新型微肽HMBJ，或权利要求2或3所述的核苷酸，或权利要求6所述的重组载体，及药学上可接受的载体。

- [权利要求 9] 一种诊断或辅助诊断器官纤维化的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有针对权利要求3所述的核苷酸序列的特异性引物对。
- [权利要求 10] 根据权利要求9所述的一种诊断或辅助诊断器官纤维化的试剂盒，其特征在于，所述特异性引物对含有以下核苷酸序列：
- F: CAAGGGATGGAGGCGAAACT;
- R: CCACAGTGCTGGTCAAGTCA。