(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 9 月 29 日 (29.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/199632 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 35/34 (2015.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/082558

(22) 国际申请日: 2022 年 3 月 23 日 (23.03.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110309657.6 2021年3月23日 (23.03.2021) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市十梓街 1 号, Jiangsu 215006 (CN)。

(72) 发明人: 时玉舫(SHI, Yufang); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 侯蓬勃(HOU, Pengbo); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈永井(CHEN, Yongjing); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU&PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** STEM CELL DRUG FOR TREATING ATHEROSCLEROSIS

(54) **发明名称**: 一种治疗动脉粥样硬化的干细胞药物

(57) **Abstract:** Provided in the present invention is the use of a muscle stem cell in the prevention, alleviation and treatment of cardiovascular diseases. Experiments have shown that intravenous injection of muscle stem cells at the tail vein of a mouse with atherosclerosis can significantly delay the process of atherosclerosis in the mouse, effectively reduce the area of plaque at the branches of the aortic arch and carotid artery, reduce white adipose tissue in vivo, reduce inflammatory response of the mouse body, etc. In addition, further provided in the present invention is a method for preventing and treating atherosclerosis by means of using the muscle stem cells.

(57) **摘要**: 本发明提供了一种肌肉干细胞在预防、缓解和治疗心血管疾病中的用途。实验表明，在动脉粥样硬化小鼠尾静脉注射肌肉干细胞能显著延缓小鼠的动脉粥样硬化进程，有效减少主动脉弓及颈动脉分支处斑块面积，减少体内白色脂肪组织，降低小鼠机体炎症反应等。此外，本发明还提供一种肌肉干细胞对于动脉粥样硬化的预防和治疗方法。

WO 2022/199632 A1

一种治疗动脉粥样硬化的干细胞药物

技术领域

本发明涉及生物医学技术领域，具体地，涉及一种肌肉干细胞在制备治疗动脉粥样硬化药物中的应用。

背景技术

心血管疾病是严重危害人类健康的“头号杀手”，具有较高的发病率、致残率和致死率，而动脉粥样硬化是其主要的病理基础及潜在病因。近年来，我国心血管病患病率呈上升趋势，全国每年约有350万人死于心血管病，心血管病已成为中国居民死亡的首要原因。动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应，更具体地说是由低密度脂蛋白在动脉内皮下层发生聚集及氧化修饰，导致内皮细胞的激活和巨噬细胞的活化，分泌各种细胞因子、趋化因子和黏附因子，从而招募更多的免疫细胞趋化到损伤部位，加速动脉粥样硬化的进程。

骨骼肌是人体最大的组织器官，除了为个体运动提供所必需的能量，同时还通过产生多种免疫分子，参与机体的稳态和生理功能的调控。运动性肌肉释放的炎症细胞因子白介素-6（IL-6）能够钝化内毒素诱导的炎症反应。骨骼肌产生的类流星蛋白（MTRNL）可诱导白色脂肪组织的“褐变”，并诱导IL-4诱导的抗炎型巨噬细胞的极化。肌肉来源的白介素-15（IL-15）能够促进幼稚T细胞的增殖，增强自然杀伤细胞的发育和细胞毒性，以减少脂质沉积，预防内脏器官脂肪病变。然而，骨骼肌肌肉干细胞作为骨骼肌的核心细胞成分，除了参与着骨骼肌的损伤修复，是否也参与了免疫细胞的功能调控，国内外尚无报道。

随着经济社会的发展、人们生活方式的改变（不健康饮食和缺乏运动）及人口老龄化，动脉粥样硬化性心血管疾病的发病率日益升高，不仅对居民健康有着重大影响，而且经济负担也相当沉重，因此，本领域亟待开发针对动脉粥样硬化的有效药物。

发明内容

本发明的目的在于提供一种肌肉干细胞在制备预防、缓解和/或治疗心血管疾病（例如动脉粥样硬化）的药物组合物中的用途。

在本发明的第一方面，提供了一种肌肉干细胞的用途，所述肌肉干细胞用于

制备药物组合物，所述药物组合物用于选自下组的一种或多种应用：

(a)延缓动脉粥样硬化进程

(b)减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

(c)减少主动脉瓣膜处脂质的沉积；

(d)减少主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集；

(e)减少外周血中促炎型单核细胞的数量和比例；

(f)减少外周血中巨噬细胞的数量和比例；

(g)减少白色脂肪组织重量；

(h)缓解机体炎症反应；

(i)降低血清中IL-6和CCL2的水平；

(j)差异性调节斑块中巨噬细胞内促抗炎基因的表达水平；

(k)提高抗炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(l)降低促炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(m)预防、缓解和/或治疗动脉粥样硬化；

(n)预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

在另一优选例中，所述促炎型单核细胞为促炎型$Ly6C^{hi}$单核细胞。

在另一优选例中，所述药物用于人或动物。

在另一优选例中，所述抗炎型巨噬细胞的相关基因选自下组：*Arg1*。

在另一优选例中，所述促炎型巨噬细胞的相关基因选自下组：*Il1β*、*Ccl2*。

在另一优选例中，所述白色脂肪组织包括附睾脂肪组织。

在另一优选例中，所述肌肉干细胞选自下组：鼠源性肌肉干细胞、人源性肌肉干细胞、猴源性肌肉干细胞、狗源性肌肉干细胞、猫源性肌肉干细胞、马源性肌肉干细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述人源性肌肉干细胞为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

在另一优选例中，所述肌肉干细胞为可分化为肌纤维的干细胞。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞可以是自体的，也可以是同种异体的，或异种的。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞获自选自下组的部位：四肢骨骼肌、躯干骨骼肌。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型选自下组：新鲜培养的肌肉干细

胞注射剂，或来自于冷冻储存的解冻肌肉干细胞注射剂。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞是从机体肌肉中提取并通过细胞分选、扩增所获得。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞是从机体四肢或躯干肌肉中提取并通过细胞分选所获得。

在另一优选例中，所述肌肉干细胞为肌肉来源的可分化为肌纤维的干细胞。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型为注射剂。

在另一优选例中，所述药物组合物用于预防、缓解和/或治疗心血管疾病，较佳地，所述心血管疾病选自下组：动脉粥样硬化、心肌梗死、脑梗死、主动脉瘤。

在另一优选例中，所述肌肉干细胞选自下组：鼠源性肌肉干细胞、人源性肌肉干细胞、猴源性肌肉干细胞、狗源性肌肉干细胞、猫源性肌肉干细胞、马源性肌肉干细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述心血管疾病选自下组：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、颈动脉和脑动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肾动脉粥样硬化和四肢动脉粥样硬化。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞可以是自体的，也可以是同种异体的，或异种的。

在另一优选例中，所述的肌肉干细胞是从机体四肢或躯干肌肉中提取并通过细胞分选所获得。

在本发明的第二方面，提供了一种用于人或动物的药物组合物，所述药物组合物含有：

(i)肌肉干细胞作为第一活性成分；和

(ii)药学上可接受的载体；

所述药物组合物用于选自下组的一种或多种应用：

(a)延缓动脉粥样硬化进程

(b)减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

(c)减少主动脉瓣膜处脂质的沉积；

(d)减少主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集；

(e)减少外周血中促炎型单核细胞的数量和比例；

(f)减少外周血中巨噬细胞的数量和比例；

(g)减少白色脂肪组织重量；

(h)缓解机体炎症反应；

(i)降低血清中IL-6和CCL2的水平；

(j)差异性调节斑块中巨噬细胞内促抗炎基因的表达水平；

(k)提高抗炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(l)降低促炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(m)预防、缓解和/或治疗动脉粥样硬化；

(n)预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

在另一优选例中，所述促炎型单核细胞为促炎型$Ly6C^{hi}$单核细胞。

在另一优选例中，所述的药物组合物还含有调节脂代谢的第二活性成分，较佳地，所述的第二活性成分选自下组：

他汀类药物、PCSK9抑制剂、贝特类药物、抗凝血类药物或溶栓类药物。

在另一优选例中，所述肌肉干细胞，较佳地为人源性肌肉干细胞，为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

在另一优选例中，所述药物组合物为抗动脉粥样硬化的药物。

在另一优选例中，所述药物组合物为降低主动脉弓及其分支处斑块面积的药物。

在另一优选例中，所述药物组合物为减轻机体炎症环境的药物。

在另一优选例中，所述药物组合物的剂型选自下组：注射剂、冻干剂。

在另一优选例中，所述药物组合物为预防、缓解和/或治疗心血管疾病的药物，所述心血管疾病包括：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、颈动脉和脑动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肾动脉粥样硬化和四肢动脉粥样硬化。

在本发明的第三方面，提供了一种预防、缓解和/或治疗心血管疾病的方法，所述方法包括：给需要的对象施用肌肉干细胞、如本发明的第二方面所述的药物组合物、或包含所述肌肉干细胞或药物组合物的制剂、或其组合。

在另一优选例中，所述心血管疾病包括：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、颈动脉和脑动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肾动脉粥样硬化和四肢动脉粥样硬化。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图1显示了A.人源性肌肉干细胞表达的表面标志流式鉴定。使用抗人的流式抗体CD31-PE，CD34-PE，CD45-PE，CD29-APC，CD56-BV421，EGFR-BV421对分离的肌肉干细胞进行表面标志物染色，并使用流式细胞分析仪分析；B.人源性肌肉干细胞表达的特异性核因子PAX7的流式鉴定。细胞经破膜固定后，使用PAX7蛋白抗体对肌肉干细胞进行染色，使用激发光波长为647 nm的荧光二抗染色，流式细胞分析仪进行细胞分析。C.人源性肌肉干细胞特异性分化表达成熟肌纤维标志肌球蛋白重链（MyHC）的免疫荧光染色鉴定，红色为肌球蛋白重链，蓝色为细胞核。比例尺（Scale bar）=25 μm；其中，MyHC为肌球蛋白重链染色，Hoechst为细胞核染色；Merge为叠加图，Isotype为阴性对照，Specific Ab为特异性的流式抗体，PAX7-APC为用荧光二抗（在APC通道被检测到荧光）偶联PAX7蛋白抗体。

图2显示了A. ApoE$^{-/-}$小鼠（12-14周）动脉粥样硬化模型建立、人源干细胞移植方案和实施的检测指标；B.对小鼠主动脉弓及其分支处斑块原位直观比较（PBS组与hMuSC组）；C. 对主动脉进行油红O染色，剖开血管并拍照，直观的比较斑块的面积大小，并对着色区域进行量化，从而比较主动脉斑块面积和面积占比；D.对主动脉根进行冰冻切片后进行油红O染色并拍照，比较主动脉根瓣膜处脂质沉积程度。比例尺（Scale bar）=500 μm；E.比较不同距离主动脉根瓣膜处斑块面积；F.对小鼠的附睾脂肪指数进行统计和比较，附睾脂肪指数=附睾脂肪的质量/小鼠体重；G.对小鼠血清中炎症因子IL-6含量的检测。其中，PBS为模型组，使用40% Kcal的高脂饲料喂养6周，并在第三周经尾静脉注射200 μL PBS，每周一次，共四次；hMuSC为治疗组，使用40% Kcal的高脂饲料喂养6周，并在第三周每只鼠经尾静脉注射5×10^5个人源性肌肉细胞，每周一次，共四次。

图3显示了A.LDLR$^{-/-}$小鼠（12-14周）动脉粥样硬化模型建立、人源干细胞移植方案和实施的检测指标；B.对小鼠主动脉弓及其分支处斑块原位直观比较；C. 对主动脉根进行冰冻切片后进行油红O染色并拍照，比较主动脉根瓣膜处脂质沉积程度。比例尺（Scale bar）=500 μm；D.比较不同距离主动脉根瓣膜处斑

块面积；E.对主动脉进行油红O染色，剖开血管并拍照，直观的比较斑块的面积大小，并对着色区域进行量化，从而比较主动脉斑块面积和面积占比；F.对小鼠的附睾脂肪指数进行统计和比较，附睾脂肪指数=附睾脂肪的质量/小鼠体重； G. 对小鼠血清中炎症因子IL-6含量的检测。

其中，PBS为模型组，使用40% Kcal的高脂饲料喂养8周，并在第5周经尾静脉注射200 μL PBS，每周一次，共四次；hMuSC为治疗组，使用40% Kcal的高脂饲料喂养8周，并在第5周每只鼠经尾静脉注射5×10^5个人源性肌肉细胞，每周一次，共四次。

图4显示了A.利用Mac-3免疫荧光染色，比较主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集情况，Mac-3可做为巨噬细胞的marker。其中，Hoechst为细胞核染色；B.利用流式细胞技术比较外周血中巨噬细胞（$CD11b^+F4/80^+$）的数量及其所占免疫细胞（$CD45^+$）的比例；C. 利用流式细胞技术比较外周血中促炎型单核细胞（$Ly6C^{hi}CD11b^+$）的数量及其所占免疫细胞（$CD45^+$）的比例；D.对小鼠血清中趋化因子CCL2含量的测定；E.对小鼠主动脉中促抗炎型巨噬细胞相关基因*Arg1*、*Ccl2*及*Il1b*的表达检测。

图5显示了A. $ApoE^{-/-}$（6-8周）小鼠分为对照组（Normal chow）、模型组（PBS）、治疗组（hMuSC），分别给予正常饮食、40% Kcal高脂饮食，40% Kcal高脂饮食，共连续喂养10周。在第六周结束后，分别从对照组（Normal chow）取出两只小鼠、模型组（PBS）取出三只小鼠，安乐死后剥离主动脉判断小鼠动脉粥样硬化的程度。在第七周，分别给与对照组、模型组和治疗组尾静脉注射200 μL PBS、200 μL PBS、5×10^5个肌肉干细胞。每周注射一次，共四次。B.从左到右，依次是6周正常饮食小鼠、6周高脂饮食、10周正常饮食+PBS、10周高脂饮食+PBS、10周高脂饮食+hMuSC治疗的主动脉弓原位图片（箭头指示分支斑块的位置）；C.从左到右，依次是6周正常饮食小鼠、6周高脂饮食、10周正常饮食+PBS、10周高脂饮食+PBS、10周高脂饮食+hMuSC治疗的主动脉油红O染色图片；D.对小鼠的附睾脂肪指数进行统计和比较，附睾脂肪指数=附睾脂肪的质量/小鼠体重；E.对主动脉斑块面积所占主动脉面积的比例进行统计。

在以上所有结果中，$*P<0.05$；$**P<0.01$；$***P<0.001$。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，首次发现激活的骨骼肌肌肉干细胞对于高脂饮食引起的慢性炎症反应有抑制作用，降低了炎症水平，可显著减少主动

脉斑块面积，减少白色脂肪组织重量，对动脉粥样硬化有缓解和治疗作用。具体地，本发明选取高脂饲料诱导的动脉粥样硬化小鼠模型，研究出了基于人源性肌肉干细胞在制备预防、缓解和/或治疗心血管疾病（例如动脉粥样硬化）的药物组合物中的用途。特别地，人源性细胞注射进入小鼠体内，可在短期内被机体清除，排除了细胞在受体体内定植、增殖和分化的可能性。在此基础上完成本发明。

具体地，本发明中对高脂饲料喂养诱导形成的动脉粥样硬化小鼠进行尾静脉注射肌肉干细胞，实验结果表明，与模型组相比，治疗组能显著延缓动脉粥样硬化斑块进程，减少小鼠的主动脉弓及其分支处斑块面积，减少主动脉瓣膜处脂质沉积，减少附睾脂肪组织，缓解小鼠机体炎症环境等。特别地，本发明的hMuSC降低了小鼠血清中CCL2和IL-6的水平，并且显著地降低了巨噬细胞和促炎型单核细胞的数量和百分比，从而进一步说明本发明的hMuSC通过降低机体炎症水平发挥抗动脉粥样硬化的作用。

术语

除非另外定义，否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。如本文所用，在提到具体列举的数值中使用时，术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如，如本文所用，表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如，99.1、99.2、99.3、99.4等)。

虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料，本文在此处列举优选的方法和材料。

如本文所用，“斑块面积”中“斑块”指发生于主动脉内膜的炎症病变，富含大量脂质性物质（可被油红O染料染成红色），故“斑块面积”在一定程度上代表主动脉内膜炎症病变的大小。

如本文所用，“主动脉瓣膜处”为主动脉根瓣膜处，主动脉根瓣膜处的斑块面积在一定程度上表明了脂质沉积程度大小。

如本文所用，“本发明的人源性肌肉干细胞”、“hMuSC”、“本发明的肌肉干细胞”可以互换使用，均指本发明的高表达干细胞标志物CD29和CD56、表皮生

长因子受体EGFR、和高表达肌肉干细胞标志物PAX7的分离的细胞群，即为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

肌肉干细胞

Mauro等人于1961年首次提出在蛙骨骼肌中发现了肌卫星细胞，即肌肉干细胞前体细胞。随后，越来越多的研究证明在成年哺乳类动物骨骼肌中也有少量肌肉干细胞，其数目随年龄的增长而逐渐下降。肌卫星细胞是位于骨骼肌基膜与肌纤维细胞膜之间的肌源性干细胞，在生理状态下，肌卫星细胞以静止未分化状态存在，在受到损伤或炎症刺激后被激活分裂为纺锤形的肌肉干细胞，并随着不断分化相互融合为多核肌管，最后发育形成新生肌纤维或者融入受损肌组织，在骨骼肌的生长、损伤修复、功能维持以及组织再生过程中有着重要作用。

在本发明的一个优选例中，所述肌肉干细胞选自下组：小鼠肌肉干细胞、人源性肌肉干细胞、猴源性肌肉干细胞、狗源性肌肉干细胞、猫源性肌肉干细胞、马源性肌肉干细胞等。

在本发明的一个优选例中，所述人源性肌肉干细胞为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

在本发明的一个优选例中，所述肌肉干细胞为肌肉来源的、可分化为肌纤维的干细胞。

在本发明的一个优选例中，所述的肌肉干细胞可以是自体的，也可以是同种异体的，或异种的。

在本发明的一个优选例中，所述的肌肉干细胞获自选自下组的部位：四肢骨骼肌、躯干骨骼肌。

在本发明的一个优选例中，所述的肌肉干细胞是从机体肌肉中提取并通过流式细胞术分选、扩增所获得。

在本发明的另一个优选例中，所述的肌肉干细胞是从机体四肢或躯干肌肉中提取并通过流式细胞术分选所得到。

肌肉来源的间充质干细胞

骨骼肌与平滑肌中都存在间充质干细胞。肌肉损伤修复再生的主角是肌肉干细胞，但是一些其他类群的细胞，例如炎症细胞，血管内皮细胞和肌肉来源的间充质干细胞在整个肌肉损伤修复再生过程中，发挥着精细调节配合的作用。例如成纤维脂肪祖细胞是肌肉间质内的一类间充质干细胞，其作用是支持肌肉干细胞的分化，促进肌肉组织的修复再生。而在血管内的平滑肌来源的平滑肌祖细胞，主要作用是替代平滑肌细胞，从而填充血管病变或损伤区域。

药物组合物

本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的肌肉干细胞，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：口服、呼吸道、瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于治疗（例如动脉粥样硬化的治疗），此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量（如0.001-99 wt%,较佳地0.01-90 wt%，更佳地0.1-80wt%）的本发明上述的肌肉干细胞以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括（但并不限于）：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约1 μg/Kg体重-约10 mg/Kg体重。此外，本发明的肌肉干细胞还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的肌肉干细胞施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约10 μg/Kg体重，而且在大多数情况下不超过约8 mg/Kg体重，较佳地该剂量是约10 μg/Kg体重-约1 mg/Kg体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

在本发明的一个优选例中，所述药物组合物含有：

(i)肌肉干细胞作为活性成分；和

(ii)药学上可接受的载体；

所述药物组合物用于选自下组的一种或多种应用：

(a)延缓动脉粥样硬化进程

(b)减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

(c)减少主动脉瓣膜处脂质的沉积；

(d)减少主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集；

(e)减少外周血中促炎型$Ly6C^{hi}$单核细胞的数量和比例；

(f)减少外周血中巨噬细胞的数量和比例；

(g)减少白色脂肪组织重量；

(h)缓解机体炎症反应；

(i)降低血清中IL-6和CCL2的水平；

(j)差异性调节斑块中巨噬细胞内促抗炎基因的表达水平；

(k)提高抗炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(l)降低促炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(m)预防、缓解和/或治疗动脉粥样硬化；

(n)预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

在另一优选例中，所述人源性肌肉干细胞为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX\ 7^+$的细胞。

在本发明的一个优选例中，所述药物组合物为抗动脉粥样硬化药物。

在本发明的一个优选例中，所述药物组合物为降低主动脉弓及其分支处斑块面积的药物。

在本发明的一个优选例中，所述药物组合物为减轻机体炎症环境的药物。

在本发明的一个优选例中，所述药物组合物的剂型选自下组：注射剂、冻干剂。

在本发明的一个优选例中，所述的动脉粥样硬化的剂型为新鲜培养的肌肉干细胞注射剂，或来自于冷冻储存的解冻肌肉干细胞注射剂。

在本发明的一个优选例中，所述的抗动脉粥样硬化药物能够明显延缓小鼠

的动脉粥样硬化，减少主动脉弓及其分支处的斑块面积。

在本发明的一个优选例中，所述的抗动脉粥样硬化药物能够减轻白色脂肪组织重量。

在本发明的一个优选例中，所述的抗动脉粥样硬化药物能够降低小鼠机体炎症水平。

本发明的主要优点包括

(1) 本发明通过给高脂饲料诱导的动脉粥样硬化小鼠尾静脉注射肌肉干细胞，充分研究了肌肉干细胞在心血管疾病治疗方面的效果；

(2) 本发明重点发现了肌肉干细胞具备下列功能：

①延缓小鼠动脉粥样硬化进程；

②减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

③减少白色脂肪组织重量；

④降低机体炎症水平；

⑤改善机体各项生理机能；

⑥降低了巨噬细胞和促炎型单核细胞的数量和百分比。

(3)本发明能够通过有限次数的肌肉干细胞注射达到相对长久的治疗效果，从而产生以下优点：

①细胞注射次数少，减少机体遭受疼痛的次数，提高机体生存质量；

②少次肌肉干细胞注射就能起到长效作用，具有省时、省力的优势。

下面结合具体实施例，进一步陈述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

通用方法

（一）原位主动脉弓及分支处斑块面积观察

1、在处死小鼠后，通过心脏灌流预冷的PBS冲出血管内残留的血液。

2、在体式显微镜下，利用显微器械仔细剥离出主动脉及其分支，除去粘连的脂肪。

3、在主动脉下放置黑色纸片作为背景，相机聚焦于主动脉弓处并拍照。

（二）主动脉的油红O染色

1、油红O染液母液的配制：取0.5 g油红O粉末溶于100 mL的异丙醇（浓度为100%）中，37℃水浴使其充分溶解，室温避光保存，备用。

2、油红O工作液的配制：按油红O染液母液：ddH_2O=3:2比例混匀,0.22 μm有机系滤头过滤后使用，现用现配。

3、将剥离出主动脉，放入盛有2 mL浓度为60%异丙醇的EP管中，媒染10 min，有利于油红O染料的着色。

4、再将其转移至盛有2 mL油红O工作液的EP管中，染色30 min后，再用浓度为60%的异丙醇洗去残余的油红O浮色。

5、在体式显微镜下，剔除血管外粘连的脂肪（已被染成红色），利用维纳斯剪剪开血管，并将其置于洁净的双面胶上，迅速展开血管，防止主动脉干燥。

6、相机拍照后，利用图像分析软件ImageJ进行分析处理，计算斑块面积所占整个血管的比例。

（三）主动脉根的冰冻切片及油红O染色

1、取小鼠心脏，切除心尖后，OCT包埋后，置于-80℃冰箱过夜。

2、采用连续切片的方式，收集从0 μm-400 μm的切片，厚度为5 μm。

3、将冰冻切片置于含4%多聚甲醛的PBS溶液中固定10 min，经ddH_2O清洗后，置于盛有浓度为60%异丙醇的染缸中媒染，5 min。

4、再转移至含油红O工作液的染缸中，染色15 min。

5、用浓度为60%异丙醇洗去多余的浮色，晾干后拍照，并用图像分析软件ImageJ分析处理。

实施例1 人源性肌肉干细胞提取、扩增、鉴定及分化

（一）人源性肌肉干细胞的提取

1、配制试剂：洗涤液（含20%胎牛血清+1%双抗的DMEM LOW培养基）；粗消化液（将Ⅱ型胶原酶加入洗涤液中，使Ⅱ型胶原酶的终浓度为750 U/mL）；精消化液（将Ⅱ型胶原酶和分散酶依次加入洗涤液，使其终浓度分别为1000 U/mL、11 U/mL）；肌肉干细胞生长完全培养基（20%胎牛血清+40% DMEM LOW+40% MCDB 131+胰岛素转铁蛋白硒（Insulin-transferrin-X）+1%双抗+10 μmol p38抑制剂）。

2、经伦理审批，从医院获取人来源的肌肉组织块，放入10 cm培养皿中，滴加2 mL粗消化液，剪碎形成组织原浆液，再用13 mL粗消化液充分冲洗培养皿，所有组织碎片均转移至50 mL离心管中。

3、离心管水平放置在恒温摇床上，37℃孵育60 min，转速为70 rpm。

4、孵育消化结束后，用洗涤液中和，加至50 mL，上下颠倒混匀，500g离心5 min，吸去上清。

5、向沉淀的细胞团块中加入15 ml的精消化液，充分混匀后，再次放入恒温摇床中，37℃孵育60 min，转速为70 rpm。

6、孵育结束后，加入15 mL洗涤液进行中和，并用70 μm的细胞筛网进行过滤。

7、过滤后，将所得液体500 g离心5 min，吸去上清，获得细胞沉淀。

8、用500 μL完全培养基重悬细胞沉淀，用于流式分选。

9、吸取出10 μL细胞悬液至含有190 μL完全培养基的流式管中作阴性对照使用。

10、将剩余细胞悬液进行流式分选抗体染色，标记抗体分别为CD31-PE，CD34-PE，CD45-PE，CD29-APC，CD56-BV421,EGFR-BV421染色40 min，每20 min摇一次,四度存放。染色完成后，完全培养基清洗离心，并最终使用200 μL完全培养基进行细胞重悬。

11、上机，进行流式分选。

(二)人源性肌肉干细胞的体外扩增培养

1、待全部细胞悬液分选完毕后，800 rpm离心5 min，去除洗涤培养基上清，加入完全培养基重悬后，转移至细胞外基质预包被过的培养皿中（Extra Cellular Matrix，ECM包被24小时）进行培养扩增。

2、每两天更换一次新鲜培养基直至细胞融合度达到60～70%。

3、使用胰蛋白酶对肌肉干细胞进行传代，随后将子代细胞种植于新的ECM包被的培养皿中继续培养扩增。

(三)人源性肌肉干细胞的鉴定

1、细胞生长至融合度达70%，可用胰酶消化获取所需细胞。

2、分别对人肌肉干细胞表面表达的标志蛋白进行流式鉴定、人肌肉干细胞特异性核因子PAX7的流式表达鉴定。

(四)人源性肌肉干细胞肌分化能力鉴定

1、将肌肉干细胞培养于胶原包被的培养板至细胞完全融合。

2、用无血清DMEM培养基洗涤细胞三次，而后换成肌肉干细胞分化培养基（DMEM培养基+2%马血清）继续培养。分化培养第1天，细胞开始伸长并发生细胞间的融合。第2～3天细胞融合达到峰值，大部分细胞已经完成向肌管的分化过程。此时进行免疫荧光染色人肌肉干细胞特异性分化成熟蛋白肌球蛋白重链（MyHC），从而鉴定实验以确定分离的细胞具有干细胞的分化特性。

结果如图1所示。

图1表明：本发明分离的细胞高表达肌肉干细胞标志物PAX7。分离的细胞为内皮细胞标志物CD31阴性的细胞，是造血干细胞标志物CD34阴性的细胞，是白细胞标志物CD45阴性的细胞。该分离的细胞高表达干细胞标志物CD29和CD56，且表达比率为100%。且该细胞高表达表皮生长因子受体EGFR达90%。所以该分离出的细胞为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的肌肉干细胞。体外培养扩增的肌肉干细胞能够很好地维持干细胞表面标志以及核内特异性因子PAX7的表达，且能分化为成熟且具有功能性的肌纤维结构，说明以上体系所培养的肌肉干细胞具有优良的干性和肌纤维生成能力。

目前，$ApoE^{-/-}$小鼠和$LDLR^{-/-}$小鼠是动脉粥样硬化中较常用的两种动物模型。故本实施例中，采用了上述的两种小鼠构建动脉粥样硬化模型。

实施例2　人源性肌肉干细胞对$ApoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化进程的延缓作用

（一）小鼠模型建立

随机选取12-14周龄雄性$ApoE^{-/-}$小鼠进行分组，分为模型组（高脂饮食组，

PBS）和治疗组（人源性肌肉干细胞注射的高脂饮食小鼠组，hMuSC），均投喂含量40%Kal脂肪含量的高脂饮食，持续6周。（见图2的A图左侧）

（二）人源性肌肉干细胞体内移植及实施的检测指标

$ApoE^{-/-}$小鼠：在喂饲高脂饲料的第三周，采用尾静脉注射的方式，每周给予模型组注射无菌PBS，注射体系为200 μL。给予治疗组注射人源性肌肉干细胞（Human MuSC，即hMuSC），注射量为每只小鼠注射5×10^5个细胞，注射体系为200μL。注射周期为每周一次，共注射4次。在最后一次注射完成的第四天给予小鼠实施安乐死，进行解剖取材，并完成后续的血脂水平、血清中炎症因子、斑块大小或面积和组织病理学的检测指标（见图2的A图右侧）。

（三）原位主动脉弓及分支处斑块面积观察

实验结果如图2B，显示了对小鼠主动脉弓及其分支处斑块原位直观比较。

（四）主动脉的油红O染色

对主动脉进行油红O染色，打开血管后进行拍照，直观的比较斑块的面积大小，并利用imageJ对着色区域进行量化，计算斑块面积和斑块面积占整个主动脉面积的占比（见图2的C图）。

（五）主动脉根的冰冻切片及油红O染色

实验结果如图2的D图，对主动脉根进行冰冻切片后进行油红O染色并拍照，以及脂质沉积程度的比较。图2E显示了不同距离主动脉根瓣膜处斑块面积的比较图。

（六）小鼠附睾脂肪指数的检测

给小鼠称重后，处死小鼠并取小鼠的附睾脂肪，小鼠附睾脂肪指数=附睾脂肪的重量/小鼠的体重（见图2的F图）。

（七）小鼠体内炎症水平的检测

取得小鼠外周血，静置30 min后进行离心，离心条件设置为3000 rpm，30 min。离心后，吸取血清。根据ELISA试剂说明书检测血清中IL-6的含量（见图2的G图）。

结果如图2所示，本次实验在喂食高脂饮食的第三周即给予了肌肉干细胞治疗，故此，该实验可被视为肌肉干细胞对$ApoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化的预防作用。

结果表明，通过主动脉弓原位图片，主动脉根和主动脉的油红O染色，能够清楚的看到，6周的高脂饮食即可诱导ApoE$^{-/-}$小鼠产生严重的动脉粥样硬化，主要集中在主动脉弓处及其分支斑块的蓄积和主动脉根瓣膜处脂质的沉积。而经hMuSC的治疗后，小鼠的斑块面积有着明显的改善。除此之外，小鼠的附睾脂肪指数及血清中炎症因子白介素-6的水平也有明显下降。

为进一步明确肌肉干细胞的抗动脉粥样硬化作用，采用了LDLR$^{-/-}$小鼠作为诱导动脉粥样硬化的模型(PBS组和hMuSC组的血脂水平并无显著性差异，数据未展示)。

实施例3 人源性肌肉干细胞对LDLR$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化进程的延缓作用

（一）小鼠模型建立

随机选取12-14周龄雄性LDLR$^{-/-}$小鼠进行分组，分为模型组（高脂饮食组，PBS）和治疗组（人源性肌肉干细胞注射的高脂饮食小鼠组，hMuSC），均投喂含量40%Kal脂肪含量的高脂饮食，持续8周（见图3的A图上侧）。

（二）人源性肌肉干细胞体内移植及实施的检测指标

LDLR$^{-/-}$小鼠：在喂饲高脂饲料的第5周，采用尾静脉注射的方式，每周给予模型组注射无菌PBS，注射体系为200 μL。给予治疗组注射人源性肌肉干细胞(Human MuSC，即hMuSC)，注射量为每只小鼠注射5×10^{5}个细胞，注射体系为200 μL。注射周期为每周一次，共注射4次。在最后一次注射完成的第四天给予小鼠实施安乐死，进行解剖取材，并完成后续的斑块大小或面积、血清中炎症因子、组织病理学和外周血中髓系细胞（主要是巨噬细胞和促炎型Ly6C^{hi}单核细胞）的变化等检测指标（见图3的A图的下侧）。

（三）原位主动脉弓及分支处斑块面积观察

如图3B所示，对小鼠主动脉弓及其分支处斑块原位直观比较。

（四）主动脉根的冰冻切片及油红O染色

如图3的C图所示，对主动脉根进行冰冻切片后进行油红O染色并拍照，比较主动脉根瓣膜处脂质沉积程度。

如图3的D图所示，比较不同距离主动脉根瓣膜处斑块面积。

（五）主动脉的油红O染色

如图3的E图所示，对主动脉进行油红O染色，打开血管后进行拍照，直观的比较斑块的面积大小，并利用ImageJ对着色区域进行量化，计算斑块面积和斑块面积占整个主动脉面积的占比。

（六）小鼠附睾脂肪指数的检测

给小鼠称重后，处死小鼠并取小鼠的附睾脂肪，小鼠附睾脂肪指数=附睾脂肪的重量/小鼠的体重（见图3的F图）。

（七）血清中白介素-6含量检测（见图3的G图）

以上结果表明，通过主动脉弓原位图片，主动脉根和主动脉的油红O染色，能够清楚的看到，6周的高脂饮食即可诱导$LDLR^{-/-}$小鼠产生严重的动脉粥样硬化，主要集中在主动脉弓处及其分支斑块的蓄积和主动脉根瓣膜处脂质的沉积。而经hMuSC的治疗后，小鼠的斑块面积有着明显的改善。除此之外，小鼠的附睾脂肪指数及血清中炎症因子白介素-6的水平也有明显下降。

（八）主动脉根瓣膜处中巨噬细胞积累情况检测 （采用免疫荧光法检测Mac-3的表达程度，从而衡量巨噬细胞的积累情况）

1. 对主动脉根进行冰冻切片，将切片置于4%多聚甲醛溶液固定10 min，PBS清洗两次（放置在摇床），5 min/次。

2. 在室温条件下，对切片进行封闭破膜处理1 h。封闭破膜液配制：0.06 g BSA溶于含6 mL的PBS中，再加入0.1 mL的Triton-100 。

3. PBS清洗2次，5 min/次。

4. 孵育一抗（Mac-3的抗体，稀释比例为1:100），4℃过夜。

5. PBS清洗3次，5 min/次，室温孵育荧光二抗1 h。

6. PBS清洗3次, Hochest染色10 min（稀释比例为1:2000）

7. PBS清洗3次后，滴加抗荧光淬灭剂后封片，激光共聚焦显微镜拍照，ImageJ分析图片（见图4的A图）。

该结果表明：与PBS组相比， hMuSC治疗显著的降低了主动脉根瓣膜处斑块中的Mac-3的表达，也反映了hMuSC治疗显著抑制了巨噬细胞在血管壁的积累。

（九）外周血中巨噬细胞和促炎性单核细胞的检测（流式细胞技术检测）

1. 经眼缘静脉采取小鼠外周血（300 uL），置于抗凝管，加入五倍体积的

裂红液裂红8 min后，加入5 mL含2%FBS的PBS中和，4℃条件下，500 g离心5 min。

2. 弃上清（根据沉淀的颜色判断裂红是否完全，若呈红色需再次裂红），每个样品加入50 uL提前混合好的流式抗体（CD45-FITC、CD11b-PE-Cy7、Ly6C-BV421、F4/80-APC-Cy7， 用含2% FBS的PBS稀释，稀释比例为1:200），充分混匀，4℃避光孵育30 min。

3. 加200 uL含2% FBS的PBS，混匀后，4℃条件下，500 g离心。

4. 弃上清，加200 uL含2% FBS的PBS，混匀后上机检测，统计出巨噬细胞和促炎性单核细胞的数量和百分比。（在$CD45^+$的群中圈出的$CD11b^+F4/80^+$为巨噬细胞，$Ly6C^{hi}CD11b^+$为促炎性的单核细胞，见图4的B和C）

该结果表明：hMuSC治疗显著地降低了巨噬细胞和促炎型单核细胞的数量和百分比，从而进一步的降低疾病小鼠的机体炎症水平。由于已有大量的文献报道高脂饮食所有诱导的动脉粥样硬化小鼠，往往伴随着髓系细胞的增多（主要是巨噬细胞和促炎性的单核细胞），因此本发明的hMuSC治疗通过抑制髓系细胞的增多能够延缓该疾病的进程。

（十）小鼠血清中趋化因子CCL2含量的检测 （见图4的D图）

图4的D图的结果表明，hMuSC治疗显著降低了小鼠血清中CCL2的表达。

由于CCL2不仅可以衡量机体的炎症水平，还可以诱导免疫细胞的招募（尤其是单核-巨噬细胞的招募）。因此，hMuSC治疗显著降低了小鼠血清中CCL2水平的实验结果，更加佐证了hMuSC通过降低机体炎症水平发挥抗动脉粥样硬化的作用。

（十一）主动脉中抗炎型巨噬细胞和促炎性巨噬细胞相关基因的表达水平

1. 取小鼠主动脉，仔细剥离附着的脂肪，然后置于EP管中，加入1mL Trizol。

2.使用组织匀浆机研磨组织块，并在研磨彻底后，将EP管直接放入-80℃冰箱，冻存。

3.将冻存的EP管取出，刮去上层白色脂肪块，待Trizol解冻后，提取样品中的RNA。

4.利用反转录试剂盒将收集的RNA进行反转录，并将目的基因进行QPCR并进行比较分析。

对小鼠主动脉中促炎的巨噬细胞*Ccl2*和*Il1b*表达的检测及抗炎的巨噬细胞

*Arg1*表达的检测，如图4的E图所示。

实验结果表明，与模型组相比，注射肌肉干细胞提高了主动脉中抗炎型巨噬细胞*Arg1*，降低了促炎型巨噬细胞*Il1b*的表达，使巨噬细胞向抗炎型的巨噬细胞极化。

综上所述，尾静脉注射人来源的肌肉干细胞（hMuSC）能够显著延缓高脂饲料喂养的$LDLR^{-/-}$小鼠的动脉粥样硬化的进程。这一结果与实施例2中的结果是一致的，即人源性肌肉干细胞对小鼠动脉粥样硬化的进程有很好的延缓作用。

实施例4　人源性肌肉干细胞对$ApoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化进程的治疗作用

（一）小鼠模型建立

随机选取6-8周龄雄性$ApoE^{-/-}$小鼠进行分组，分为对照组（正常饮食），模型组（高脂饮食组）和治疗组（人源性肌肉干细胞注射的高脂饮食小鼠组）均投喂含量40%Kal脂肪含量的高脂饮食，持续10周（见图5的A图）。

（二）人源性肌肉干细胞体内移植

$ApoE^{-/-}$小鼠：在喂饲高脂饲料的第7周，采用尾静脉注射的方式，每周给予对照组和模型组注射无菌PBS，注射体系为200 μL。给予治疗组注射人源性肌肉干细胞(Human MuSC，即hMuSC)，注射量为每只小鼠注射5×10^5个细胞，注射体系为200μL。注射周期为每周一次，共注射4次，本次实验可作为肌肉干细胞对于动脉粥样硬化的治疗作用。

（三）原位主动脉弓及分支处斑块面积观察

观察6周正常饮食小鼠、6周高脂饮食、10周正常饮食+PBS、10周高脂饮食+PBS、10周高脂饮食+hMuSC治疗的主动脉弓原位图片（见图5的B图）。

（四）主动脉的油红O染色

观察6周正常饮食小鼠、6周高脂饮食、10周正常饮食+PBS、10周高脂饮食+PBS、10周高脂饮食+hMuSC治疗的主动脉油红O染色图片（见图5的C图）；

对主动脉斑块面积所占主动脉面积的比例进行统计（见图5的E图）。

（五）主动脉根的冰冻切片及油红O染色

（六）小鼠附睾脂肪指数的检测

给与小鼠称重后，处死小鼠并取小鼠的附睾脂肪，小鼠附睾脂肪指数=附

睾脂肪的重量/小鼠的体重（见图5的D图）。

如图5所示，结果表明：6周正常饮食组则无明显的斑块出现，而6周高脂饮食即可诱导较为严重的动脉粥样硬化。本次实验在第7周才给予hMuSC治疗，并且经过四次的hMuSC输注，显著减小了主动脉弓及其分支的斑块面积，而模型组则发生了更为严重的病情。与正常组相比，高脂饮食显著增加了附睾脂肪指数，经hMuSC治疗后，其附睾脂肪指数与正常饮食组相当。

综上所述，肌肉干细胞对于动脉粥样硬化的治疗也具有良好的作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种肌肉干细胞的用途，其特征在于，所述肌肉干细胞用于制备药物组合物，所述药物组合物用于选自下组的一种或多种应用：

(a)延缓动脉粥样硬化进程

(b)减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

(c)减少主动脉瓣膜处脂质的沉积；

(d) 减少主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集；

(e) 减少外周血中促炎型单核细胞的数量和比例；

(f) 减少外周血中巨噬细胞的数量和比例；

(g)减少白色脂肪组织重量；

(h)缓解机体炎症反应；

(i)降低血清中IL-6和CCL2的水平；

(j)差异性调节斑块中巨噬细胞内促抗炎基因的表达水平；

(k)提高抗炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(l)降低促炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(m)预防、缓解和/或治疗动脉粥样硬化；

(n)预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

2. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述药物组合物用于预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

3. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述心血管疾病选自下组：动脉粥样硬化、心肌梗死、脑梗死、主动脉瘤。

4. 如权利要求2所述的用途，其特征在于，所述心血管疾病选自下组：主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病、颈动脉和脑动脉粥样硬化、肾动脉粥样硬化和四肢动脉粥样硬化。

5. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述肌肉干细胞选自下组：鼠源性肌肉干细胞、人源性肌肉干细胞、猴源性肌肉干细胞、狗源性肌肉干细胞、猫源性肌肉干细胞、马源性肌肉干细胞、或其组合。

6. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述人源性肌肉干细胞为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

7. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的肌肉干细胞可以是自体的，

也可以是同种异体的，或异种的。

8. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述的肌肉干细胞是从机体四肢或躯干肌肉中提取并通过细胞分选所获得。

9. 一种用于人或动物的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(i)肌肉干细胞作为第一活性成分；

(ii)调节脂代谢的第二活性成分；和

(iii)药学上可接受的载体；其中，所述肌肉干细胞为人源性肌肉干细胞，较佳地为$CD31^-$，$CD34^-$，$CD45^-$，$CD29^+$，$CD56^+$，$EGFR^+$和$PAX7^+$的细胞。

10. 如权利要求9所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物用于选自下组的一种或多种应用：

(a)延缓动脉粥样硬化进程

(b)减少主动脉弓及其分支处斑块面积；

(c)减少主动脉瓣膜处脂质的沉积；

(d) 减少主动脉瓣膜处巨噬细胞的聚集；

(e) 减少外周血中促炎型单核细胞的数量和比例；

(f) 减少外周血中巨噬细胞的数量和比例；

(g)减少白色脂肪组织重量；

(h)缓解机体炎症反应；

(i)降低血清中IL-6和CCL2的水平；

(j)差异性调节斑块中巨噬细胞内促抗炎基因的表达水平；

(k)提高抗炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(l)降低促炎型巨噬细胞相关基因的表达水平；

(m)预防、缓解和/或治疗动脉粥样硬化；

(n)预防、缓解和/或治疗心血管疾病。

11. 如权利要求9所述的药物组合物，其特征在于，所述的第二活性成分选自下组：他汀类药物、PCSK9抑制剂、贝特类药物、抗凝血类药物或溶栓类药物。

12. 如权利要求9所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物为预防、缓解和/或治疗主动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化、颈动脉和脑动脉粥样硬化、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肾动脉粥样硬化和四肢动脉粥样硬化的药物。

13. 如权利要求9所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物的剂型选

自下组：注射剂、冻干剂。

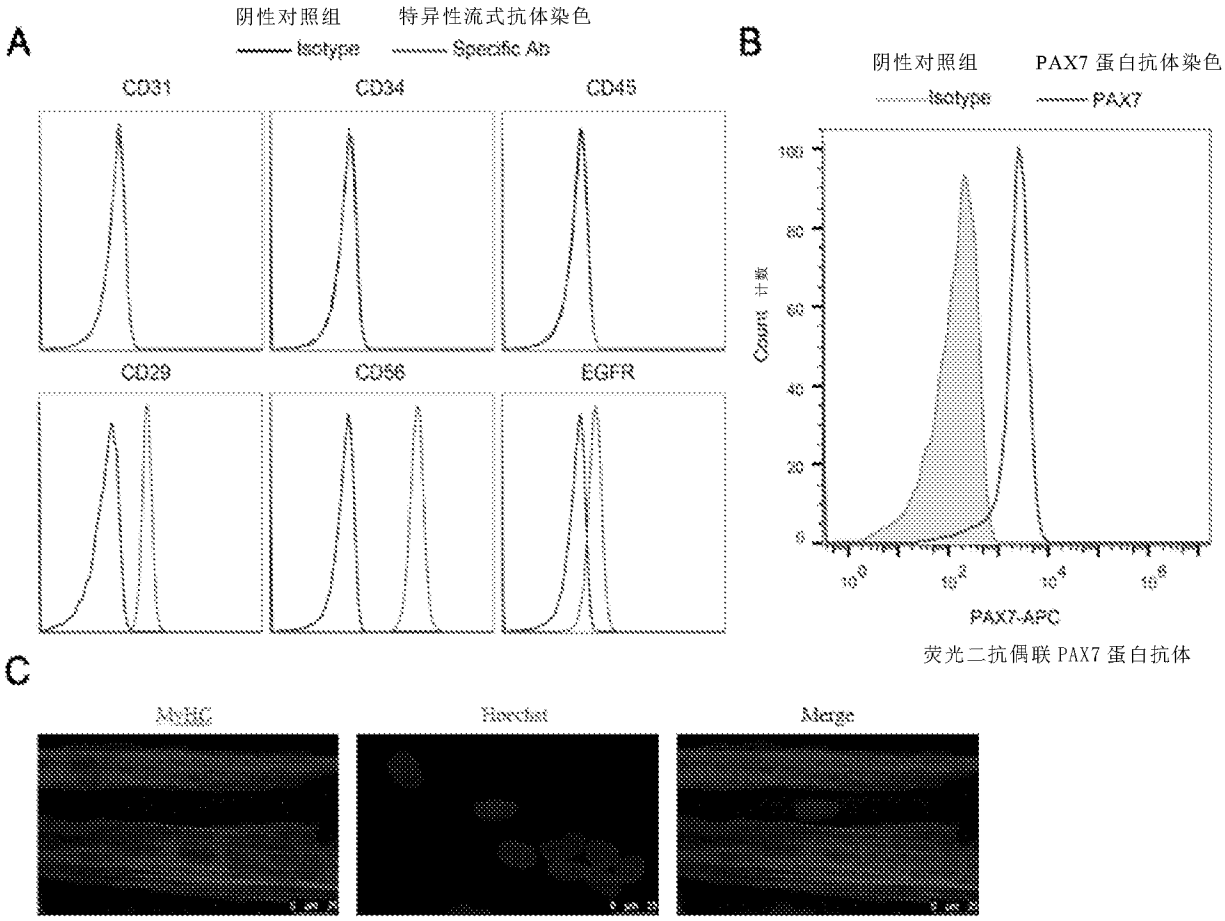
A
阴性对照组
特异性流式抗体染色
Isotype
Specific Ab
CD31
CD34
CD45
CD29
CD56
EGFR
B
阴性对照组
PAX7 蛋白抗体染色
Isotype
PAX7
Count 计数
PAX7-APC
荧光二抗偶联 PAX7 蛋白抗体
C
MyHC
Hoechst
Merge

图 1

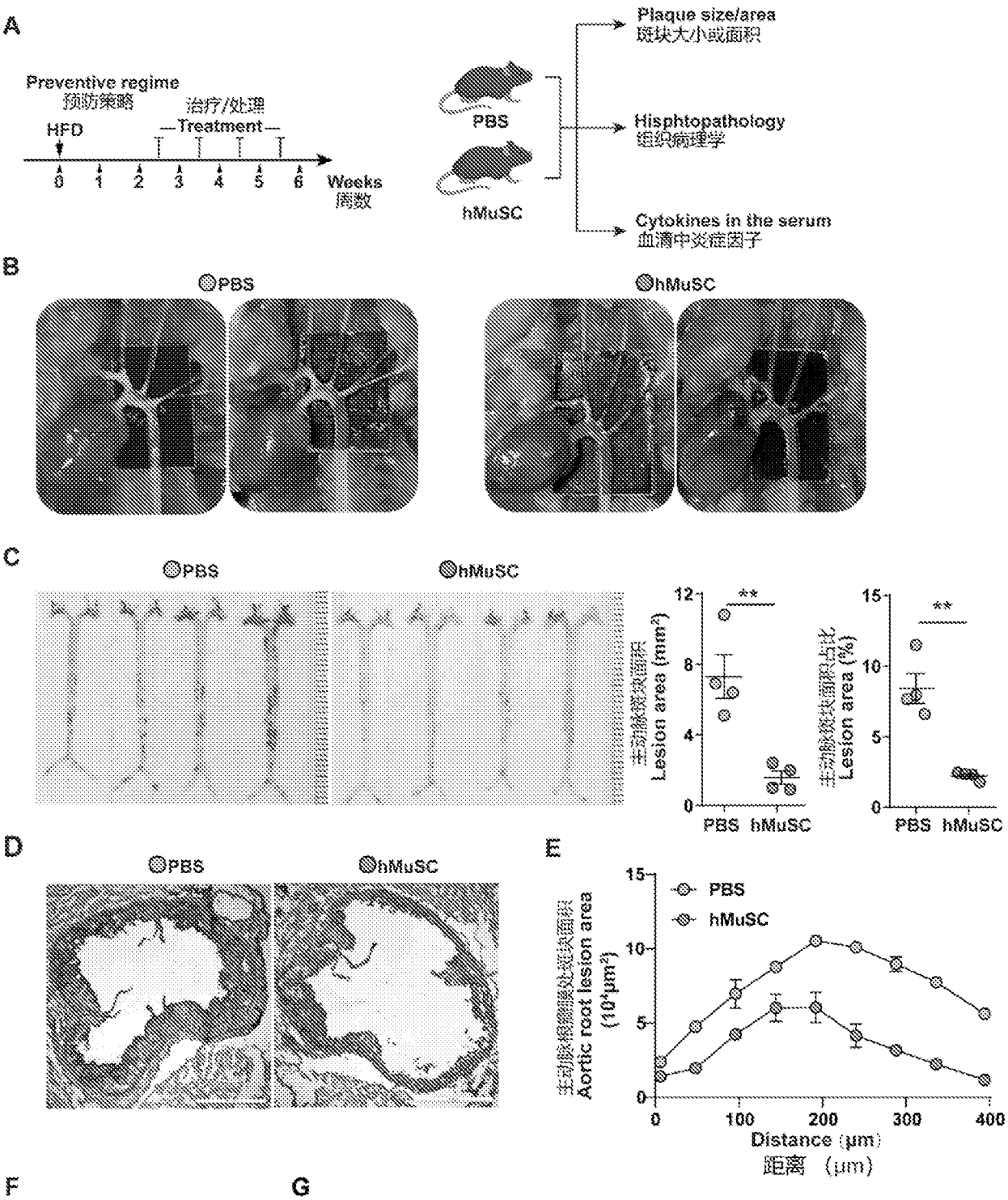
A
Preventive regime
预防策略
HFD
治疗/处理
Treatment
0 1 2 3 4 5 6
Weeks
周数
PBS
hMuSC
Plaque size/area
斑块大小或面积
Hisphtopathology
组织病理学
Cytokines in the serum
血清中炎症因子
B
PBS
hMuSC
C
PBS
hMuSC
主动脉斑块面积
Lesion area (mm²)
主动脉斑块面积占比
Lesion area (%)
**
PBS hMuSC
D
PBS
hMuSC
E
主动脉根部膜处斑块面积
Aortic root lesion area
(10⁴μm²)
PBS
hMuSC
Distance (μm)
距离 (μm)
F
附睾脂肪指数
(附睾脂肪重量/体重)
Epididymal fat index (10²)
**
PBS hMuSC
G
血清中白介素-6含量
IL-6 (pg/mL)
**
PBS hMuSC

图 2

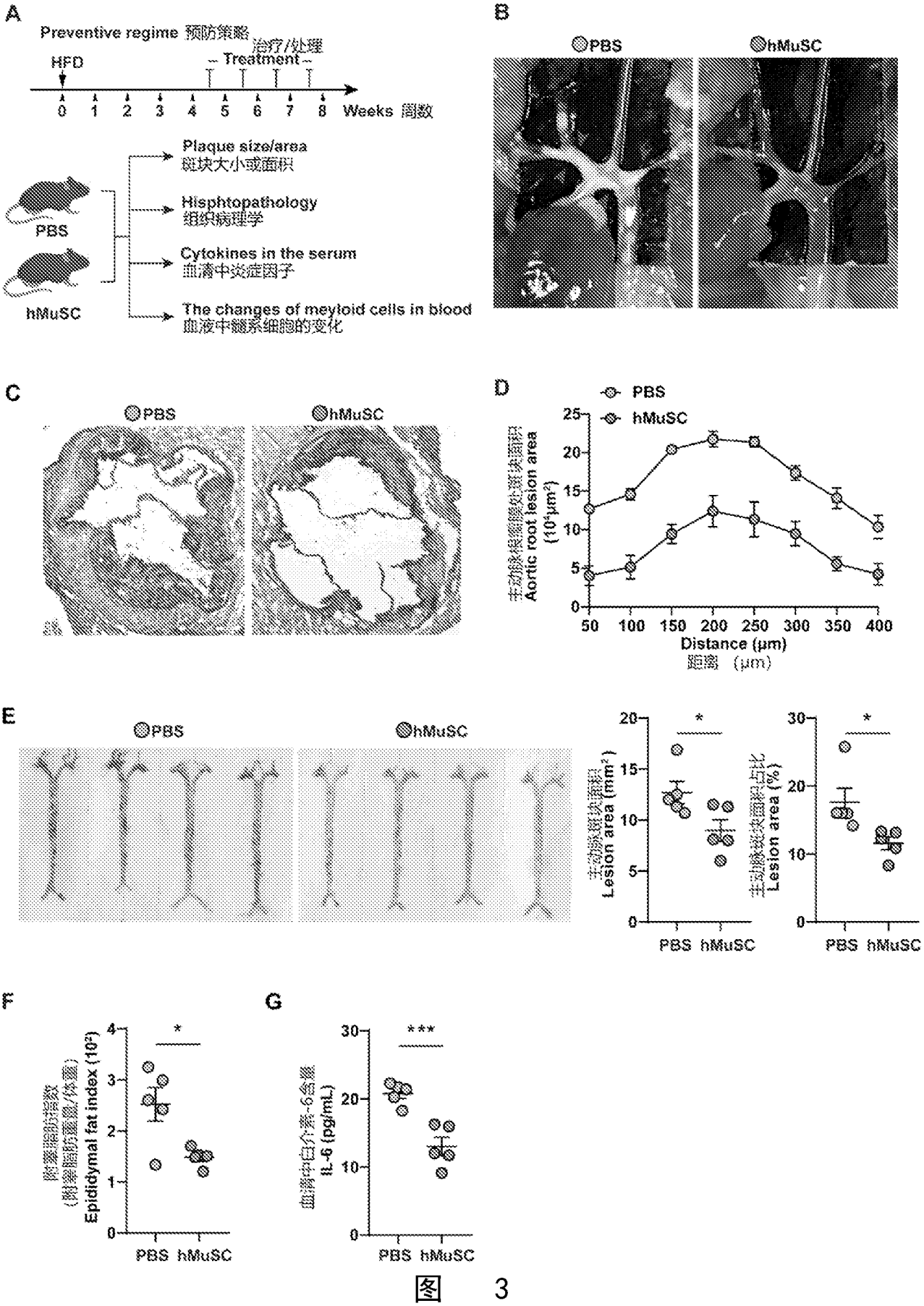
A
Preventive regime 预防策略
HFD
Treatment
治疗/处理
0 1 2 3 4 5 6 7 8 Weeks 周数
PBS
hMuSC
Plaque size/area
斑块大小或面积
Hisphtopathology
组织病理学
Cytokines in the serum
血清中炎症因子
The changes of meytoid cells in blood
血液中髓系细胞的变化
B
PBS
hMuSC
C
PBS
hMuSC
D
PBS
hMuSC
主动脉根细胞处斑块面积
Aortic root lesion area
(10⁴μm²)
Distance (μm)
距离 (μm)
E
PBS
hMuSC
主动脉斑块面积
Lesion area (mm²)
主动脉斑块面积占比
Lesion area (%)
PBS hMuSC
F
附睾脂肪指数
(附睾脂肪重量/体重)
Epididymal fat index (10²)
PBS hMuSC
G
血清中白介素-6含量
IL-6 (pg/mL)
PBS hMuSC

图 3

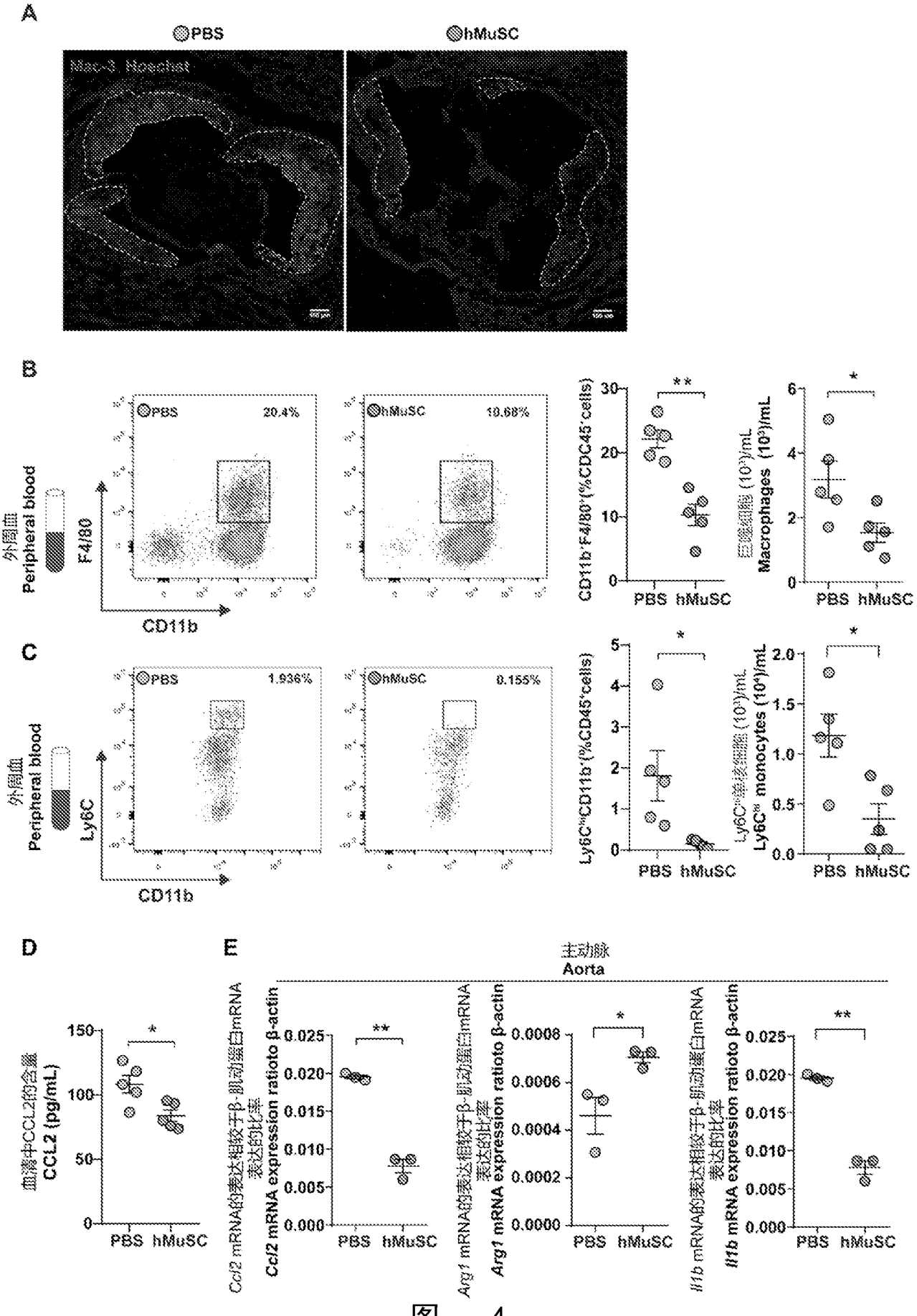
A
PBS
hMuSC
Mac-3 Hoechst
B
外周血
Peripheral blood
PBS
20.4%
hMuSC
10.68%
F4/80
CD11b
CD11b+F4/80+(%CDC45+cells)
巨噬细胞 (10³)/mL
Macrophages (10³)/mL
PBS hMuSC
C
外周血
Peripheral blood
PBS
1.936%
hMuSC
0.155%
Ly6C
CD11b
Ly6C^hiCD11b+(%CD45+cells)
Ly6C^hi单核细胞 (10³)/mL
Ly6C^hi monocytes (10³)/mL
PBS hMuSC
D
血清中CCL2的含量
CCL2 (pg/mL)
PBS hMuSC
E
出动脉
Aorta
Ccl2 mRNA的表达相较于β-肌动蛋白mRNA表达的比率
Ccl2 mRNA expression ratioto β-actin
Arg1 mRNA的表达相较于β-肌动蛋白mRNA表达的比率
Arg1 mRNA expression ratioto β-actin
Il1b mRNA的表达相较于β-肌动蛋白mRNA表达的比率
Il1b mRNA expression ratioto β-actin
PBS hMuSC

图 4

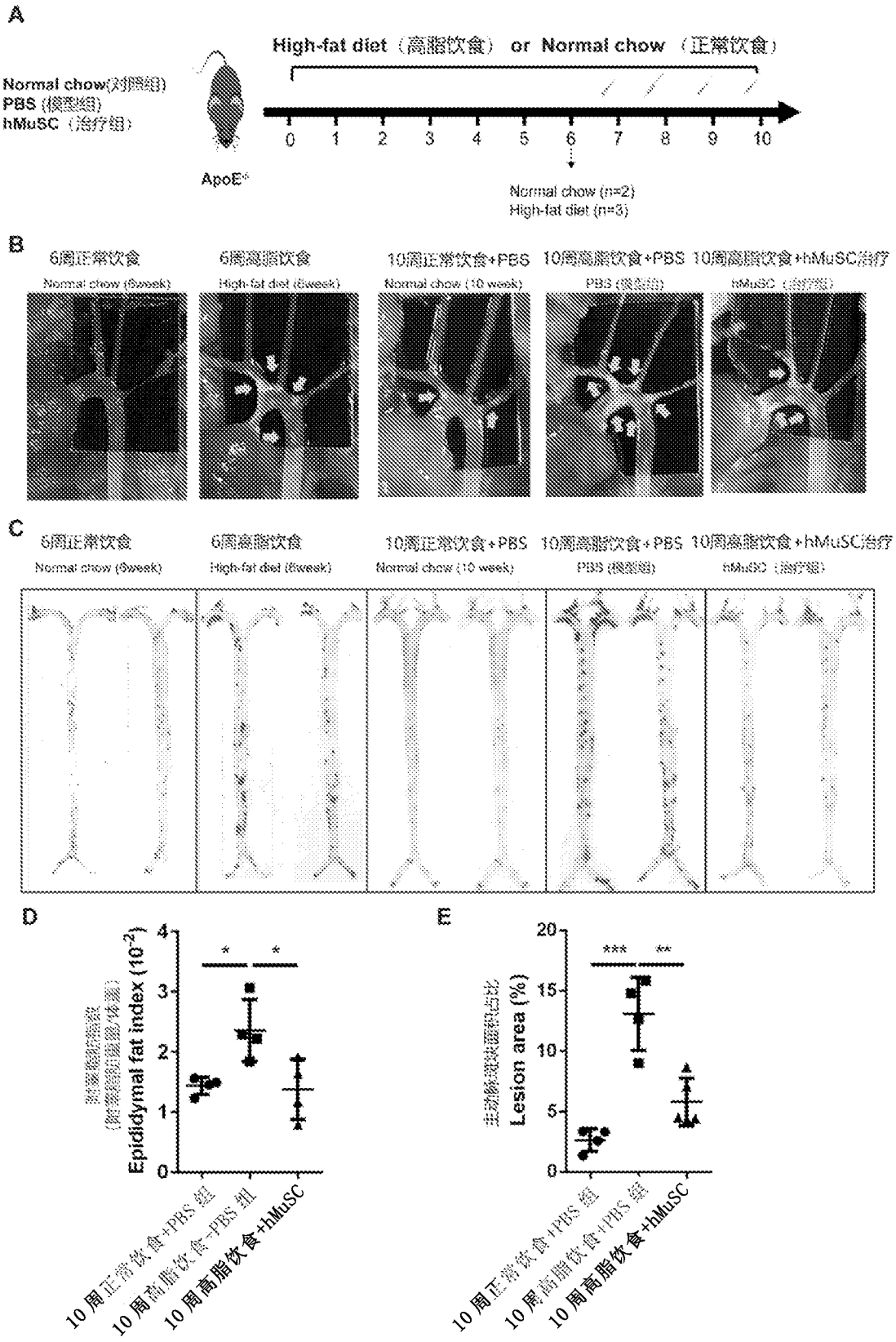
A
Normal chow(对照组)
PBS (模型组)
hMuSC（治疗组）
ApoE-/-
High-fat diet（高脂饮食） or Normal chow （正常饮食）
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Normal chow (n=2)
High-fat diet (n=3)
B
6周正常饮食
6周高脂饮食
10周正常饮食+PBS
10周高脂饮食+PBS
10周高脂饮食+hMuSC治疗
Normal chow (6week)
High-fat diet (6week)
Normal chow (10 week)
PBS (模型组)
hMuSC（治疗组）
C
6周正常饮食
6周高脂饮食
10周正常饮食+PBS
10周高脂饮食+PBS
10周高脂饮食+hMuSC治疗
Normal chow (6week)
High-fat diet (6week)
Normal chow (10 week)
PBS (模型组)
hMuSC（治疗组）
D
Epididymal fat index (10-2)
*
*
10周正常饮食+PBS组
10周高脂饮食+PBS组
10周高脂饮食+hMuSC
E
Lesion area (%)
***
**
10周正常饮食+PBS组
10周高脂饮食+PBS组
10周高脂饮食+hMuSC

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/082558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/34(2015.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, CNTXT, WPABSC, ENTXT, OETXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI-WEB OF SCIENCE: hMuSC, Muscle stem cells, MuSCs, plaque, inflammation, high-fat, fat, atherosclerosis, macrophages, cardiovascular diseases, 肌肉干细胞, 斑块, 炎症, 动脉粥样硬化, 脂肪, 巨噬细胞, 心血管疾病

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113559125 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 29 October 2021 (2021-10-29) see claims 1-9	1, 3, 5-8
X	CN 110917217 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 27 March 2020 (2020-03-27) see claims 1, 4-6 and 8, and embodiments 1-2	1, 3, 5-8
PX	房建凯 (FANG, Jiankai). "肌肉干细胞的免疫调节性作用及机制研究 (The Immunomodulatory Role and Mechanism of Muscle Stem Cells)" *中国优秀博硕士学位论文全文数据库(博士)基础科学辑 (Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database, Basic Science),* No. 6, 15 June 2021 (2021-06-15), see abstract	1, 3, 5-8
X	FANG, Jiankai et al. "Skeletal Muscle Stem Cells Confer Maturing Macrophages Anti-inflammatory Properties through IGF-2" *Stem Cells Transl Med,* Vol. 9, No. 7, 31 July 2020 (2020-07-31), see abstract	1, 3, 5-8
X	ZHANG, Shengchao et al. "Inflammatory Cytokines-stimulated Human Muscle Stem Cells Ameliorate Ulcerative Colitis Via the IDO-TSG6 Axis" *Stem Cell Res Ther,* Vol. 12, No. 1, 09 January 2021 (2021-01-09), see abstract	1, 3, 5-8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 June 2022	**24 June 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/082558

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAN, Huize et al. "Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human" *Circulation.*, Vol. 142, No. 21, 24 November 2020 (2020-11-24), see abstract	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/082558

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 113559125 A	29 October 2021	None	
CN 110917217 A	27 March 2020	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/082558

A. 主题的分类

A61K 35/34(2015.01)i; A61P 9/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：DWPI,CNTXT,WPABSC,ENTXT,OETXT,CNKI,PubMed, Elsevier Science,ISI-WEB OF SCIENCE; 检索词：hMuSC, Muscle stem cells, MuSCs,plaque,inflammation，high-fat，fat，atherosclerosis,macrophages，cardiovascular diseases，肌肉干细胞，斑块，炎症，动脉粥样硬化，脂肪，巨噬细胞，心血管疾病

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113559125 A (苏州大学) 2021年10月29日 (2021-10-29) 参见权利要求1-9	1、3、5-8
X	CN 110917217 A (苏州大学) 2020年3月27日 (2020-03-27) 参见权利要求1、4-6、8、实施例1-2	1、3、5-8
PX	房建凯. "肌肉干细胞的免疫调节性作用及机制研究" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(博士)基础科学辑, 第6期，2021年6月15日 (2021-06-15), 参见摘要	1、3、5-8
X	Jiankai Fang等. "Skeletal Muscle Stem Cells Confer Maturing Macrophages Anti-inflammatory Properties through IGF-2" Stem Cells Transl Med, 第9卷，第7期，2020年7月31日 (2020-07-31), 参见摘要	1、3、5-8
X	Shengchao Zhang等. "Inflammatory cytokines-stimulated human muscle stem cells ameliorate ulcerative colitis via the IDO-TSG6 axis" Stem Cell Res Ther, 第12卷，第1期，2021年1月9日 (2021-01-09), 参见摘要	1、3、5-8

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年6月12日	2022年6月24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 邵旭倩 电话号码 010-62411298

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Huize Pan等. "Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human" Circulation., 第142卷，第21期，2020年11月24日 (2020-11-24), 参见摘要	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/082558

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 113559125 A	2021年10月29日	无	
CN 110917217 A	2020年3月27日	无	