

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.008.html

STAT5-ROS 信号通路介导 K562 细胞伊马替尼耐药的机制研究

郝英婵 徐修才

摘要 目的 探讨信号转导与转录因子 5-氧化物 (STAT5-ROS) 细胞信号转导通路在慢性髓细胞白血病细胞 (K562) 伊马替尼 (IM) 耐药中的作用机制。方法 以浓度递增的方法诱导 K562 对 IM 产生耐药, CCK-8 法检测其耐药性。RT-PCR 方法定量测定 K562/G 细胞中 STAT5A 和 STAT5B mRNA 表达。流式细胞术测定 ROS 和细胞凋亡水平。Western blot 法检测细胞中总 STAT5 和 p-STAT5 蛋白表达。结果 实验成功诱导 K562/G 耐药细胞, CCK-8 法测定耐药倍数为 80 倍。细胞生长曲线显示 20 $\mu\text{mol/L}$ IM 作用于 K562/G 细胞 48 h, 活细胞数量减半。0.1 $\mu\text{mol/L}$ IM 作用于 K562 细胞 24 h, 活细胞数量几乎为零。流式细胞检测 K562/G 细胞内 ROS 水平明显高于 K562 细胞 ($P=0.0001$)。相同浓度 IM 作用于两株细胞相同时间, K562/G 细胞凋亡比例低于 K562 ($P<0.05$)。RT-PCR 结果显示 K562/G 细胞中 STAT5A 和 STAT5B 水平均高于 K562 ($P=0.0001, 0.0170$)。Western blot 结果表明 K562/G 细胞中 STAT5 蛋白水平显著升高 ($P=0.0090$)。结论 STAT5 在慢性髓细胞白血病中高表达, STAT5-ROS 通路的活化与 K562 细胞 IM 耐药密切相关。
关键词 K562 细胞; 伊马替尼耐药; STAT5-ROS 信号通路
中图分类号 R 446.11
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0979-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.008

目前, 酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKIs) 伊马替尼 (imatinib, IM) 已成为慢性髓细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 慢性期一线治疗方案, 但随着临床应用范围的扩大, 有 15%~25% 的患者在服用伊马替尼期间产生耐药^[1]。发生耐药的机制很多, 40%~90% 是因为 bcr/abl 发生突变, 其他有转运蛋白 ATP 依赖性蛋白 (ABC1) 的表达增加、信号转导的异常等, 均会导致 CML 细胞发生耐药。被 bcr/abl 激活的信号转导途径包括: RAS/RAF/MEK/ERK、PI3k/mTOR 和 JAK-STAT 途

径。信号转导和转录激活因子 5 (STAT5) 在 CML 的发病和疾病进展中有重要作用, 主要表现在 4 个方面: 促进细胞增殖、通过上调抗凋亡基因增强细胞活性、拮抗 TKI 诱导的细胞死亡、增加 bcr/abl 获得性突变的可能性^[2-3]。该文主要研究信号转导与转录因子 5-氧化物 (STAT5-ROS) 信号通路在 CML 细胞株 (K562) IM 耐药中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株与培养 人 CML 细胞株 K562 购自上海中科院细胞库, 耐药细胞株 K562/G 将 K562 细胞采用逐步增加 IM 浓度的方法培养获得的耐受高于 50 倍的细胞。IM 药物起始浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 每 14 d 浓度递增 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。当 IM 浓度至 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 后, 每 14 d 药物浓度递增 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 使 K562 细胞产生 IM 耐药。两种细胞株均用 RPMI-1640 培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 该培养液需含 10% 胎牛血清、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素。

1.2 细胞增殖抑制实验的测定 常规 96 孔板 CCK-8 法分别测定不同浓度伊马替尼作用 48 h 对 K562 及 K562/G 的抑制率。K562 细胞伊马替尼作用浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.5 及 1.0 $\mu\text{mol/L}$, K562/G 细胞伊马替尼浓度为 0、4、8、10、20 及 40 $\mu\text{mol/L}$, 各浓度组均设 3 复孔。用酶标仪在 450 nm 处测定每孔的吸光度 (A_{450}) 值, 计算细胞抑制率。

1.3 细胞生长曲线的检测 分别收集 K562 和 K562/G 细胞置于 24 孔板培养。K562 细胞个数为 1×10^5 , K562/G 细胞个数为 7×10^4 , IM 浓度梯度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 K562 细胞, 作用于 K562/G 细胞的 IM 浓度梯度为 4、8、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$, 各浓度组重复 3 次。培养 0~120 h 后台盼蓝染色, 进行活细胞计数, 绘制生长曲线图^[4]。

1.4 流式细胞术检测 ROS 及细胞凋亡水平 按照试剂盒 (上海碧云天生物技术公司) 说明书进行操作, 分别收集 K562、K562/G 各 1×10^5 个细胞, 加入终浓度分别为 0.1、1、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 的 IM, 作用

2017-03-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171605)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院中心实验室, 合肥 230001

作者简介: 郝英婵, 女, 硕士研究生;

徐修才, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: xuxiucail972@163.com

24 h 后收集细胞,使用 PBS 洗涤 3 次,细胞重悬于 195 μl 结合液中,加入 5 μl 异硫氰酸荧光素标记的 Annexin-V 和取 5 μl PI,室温避光 15 min,上机检测早期凋亡和晚期凋亡细胞;ROS 检测分 3 组:K562、K562/G、K562/G+5 $\mu\text{mol/L}$ NAC (NAC 为 ROS 的抑制剂),将 3 组细胞置于 6 孔板培养 24 h 后,按试剂盒说明操作。实验均重复进行 12 次。

1.5 细胞总 RNA 提取与 RT-PCR 提取 RNA 的试剂 TRIzol 以及逆转录系统反转录试剂和 PCR 反应 TaqDNA 聚合酶试剂盒均购自美国 Invitrogen Life Technologies 公司;PCR 引物由上海康成生物公司合成。收集 K562、K562/G、K562/G+5 $\mu\text{mol/L}$ NAC 3 组细胞 10^7 个细胞进行总 RNA 提取,取 3 μg RNA 经 MMLV 逆转录酶逆转成 cDNA 后行 RT-PCR 检测(表 1)。

表 1 PCR 引物及反应条件

基因	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
STAT5A	F: GCAGACTCCGTGACAGAGG R: CCACAGGTAGGGACAGAGTCT	106	
STAT5B	F: CAGAACACGTATGACCGCTG R: CTGGAGAGCTACCATTGTTGG	106	55
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCCTCCAAAAT R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	197	

1.6 Western blot 法检测 STAT5 水平 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,取 100 μg 蛋白质进行 10% SDS-PAGE 电泳,然后 2 h 转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶室温封闭 1 h,分别加入相应一抗 1 :1 000 (美国 Abcam 公司) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗 3 次,每次 10 min;加入相应的由 HRP 标记二抗 1 :30 000 (北京中杉金桥公司) 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min;ECL 化学发光显色系统显色。 β -actin 作为内参。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理数据。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用独立样本 t 检验,多组均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞抑制率 0.1、0.3 $\mu\text{mol/L}$ IM 对 K562 的抑制率分别为 (38.0 \pm 7.0)% 和 (56.0 \pm 8.5)% ,接近 50%。5、15 $\mu\text{mol/L}$ IM 对 K562/G 细胞的抑制率分别为 (15.0 \pm 2.0)% 和 (50.2 \pm 0.5)% ,15 $\mu\text{mol/L}$ 以上浓度对 K562/G 细胞生长明显抑制。K562 和

K562/G 两者的 IC_{50} 值分别为 0.15 和 12.76 $\mu\text{mol/ml}$,得出耐药倍数为 80 倍,说明耐药细胞模型建立成功。

2.2 细胞生长率 不同浓度梯度的 IM (0、0.05、0.1、0.2、0.5、1 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 K562 细胞,在 0.01、12、24、48 h 时使用台盼兰染色测定活细胞数,经过细胞计数显示此浓度梯度的 IM 均可抑制 K562 细胞的生长,24 h 细胞活力减低很明显,甚至为零,而浓度为 0 组细胞数量增长明显。同样的方法,不同浓度梯度 IM (4、8、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 K562/G 细胞,于 0.01、24、48、72、96、120 h 进行台盼兰染色,并测定活细胞数,显示 IM 浓度低于 10 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞生长良好,在 96 h 时活细胞数量与 0 h 活细胞数量差别不显著。从高于 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度起,随 IM 浓度递增,活细胞数量递减。在 IM 浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48 h 时,活细胞数量减少一半,96 h 时几乎为零,该结果同时也说明 K562/G 细胞对 IM 有明显的耐药性(图 1)。

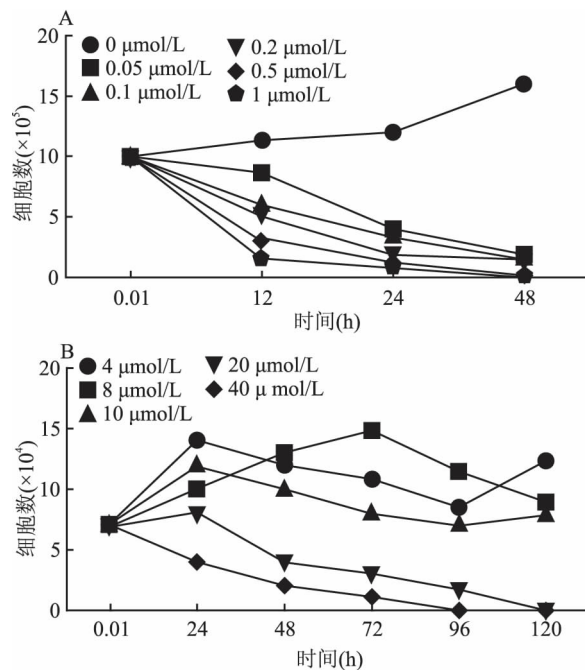


图 1 不同浓度 IM 作用下 K562 和 K562/G 细胞生长曲线
A: K562; B: K562/G

2.3 细胞内 ROS 水平结果 常规 6 孔板培养 K562、K562/G 及 K562/G+NAC 3 组细胞 24 h 后,流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平,结果显示:K562/G 细胞的基础 ROS 水平比 K562 高 2 倍以上 ($t = 41.02$, $P < 0.0001$),而经过 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 NAC 处理

表2 不同浓度梯度 IM 作用于 K562 和 K562/G 细胞的细胞凋亡水平 (% $n=12 \bar{x}\pm s$)

分组	早期凋亡	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	晚期凋亡	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
K562+0.1 $\mu\text{mol/L}$ IM	7.6 \pm 0.2	2.852	0.009 3	11.9 \pm 9.3	2.682	0.014 0
K562/G+0.1 $\mu\text{mol/L}$ IM	14.6 \pm 8.5			4.5 \pm 2.2		
K562+1 $\mu\text{mol/L}$ IM	20.8 \pm 7.2	2.307	0.030 0	28.1 \pm 9.3	3.475	0.002 0
K562/G+1 $\mu\text{mol/L}$ IM	27.0 \pm 5.9			16.3 \pm 7.2		
K562+5 $\mu\text{mol/L}$ IM	18.8 \pm 6.6	7.940	0.000 1	18.8 \pm 8.9	6.383	0.000 1
K562/G+5 $\mu\text{mol/L}$ IM	3.5 \pm 1.0			2.2 \pm 1.4		
K562+10 $\mu\text{mol/L}$ IM	10.2 \pm 4.8	3.306	0.003 0	7.7 \pm 4.2	2.690	0.013 4
K562/G+10 $\mu\text{mol/L}$ IM	5.2 \pm 2.1			3.6 \pm 3.2		
K562+15 $\mu\text{mol/L}$ IM	13.0 \pm 4.2	2.503	0.020 0	14.2 \pm 10.7	2.307	0.030 0
K562/G+15 $\mu\text{mol/L}$ IM	8.5 \pm 4.6			6.8 \pm 3.0		

后 ROS 水平显著降低(图 2、3)。

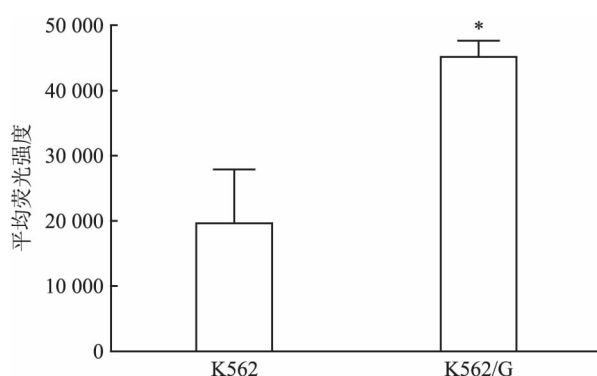


图2 两组细胞内 ROS 平均荧光水平分析与 K562 比较: * $P<0.05$

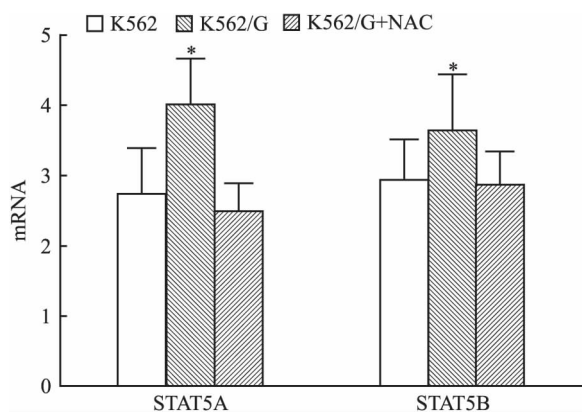


图3 RT-PCR 法检测两株细胞 STAT5A、STAT5B mRNA 水平结果与 K562 比较: * $P<0.05$

2.4 不同浓度 IM 诱导 K562、K562/G 细胞凋亡结果 两组细胞经不同浓度 IM 处理 24 h 后, Annexin V/PI 染色显示凋亡细胞明显增高, 同一浓度不同细胞间早期凋亡和晚期凋亡率均有显著差异 ($P<0.05$) (表 2)。从流式细胞图中也可以很明显的看出相同浓度的 IM 作用相同的时间细胞凋亡比例差异显著, 表明 K562/G 具有明显的耐药性。

2.5 RT-PCR 和 Western blot 法检测 STAT5A、STAT5B 水平结果 RT-PCR 结果表明: K562 细胞 STAT5A 表达水平为 (2.74 ± 0.64), STAT5B 为 (2.93 ± 0.58); K562/G 细胞 STAT5A 表达水平为 (4.01 ± 0.65), STAT5B 则为 (3.65 ± 0.78), 经过两独立样本 *t* 检验分析两细胞株 STAT5A 和 STAT5B 表达差异显著, 有明显统计学意义 ($t = 4.823, P = 0.000 1$; $t = 2.566, P = 0.017 0$), K562/G+NAC 组细胞内 STAT5A 表达水平为 (2.50 ± 0.39), STAT5B 表达为 (2.87 ± 0.48), 表达水平明显下降, 与 K562 比较差异无统计学意义 (图 3)。细胞内蛋白结果显示: 耐药细胞株 K562/G 中总 STAT5 和 p-STAT5 表达水平均明显高于 K562 细胞, 经过灰度值比较, 两者差异显著 ($P = 0.008 9$) (图 4)。

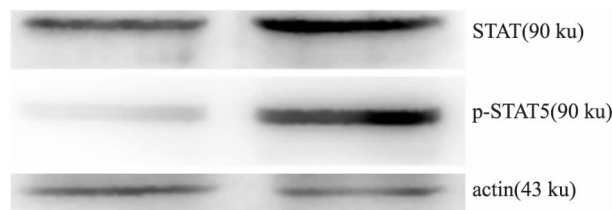


图4 K562 和 K562/G 细胞蛋白水平比较

3 讨论

CML 是一种累及造血干细胞的恶性克隆性疾病, 以骨髓/外周血中髓系细胞增殖、Ph 染色体和/或 bcr/abl 融合基因阳性为主要特征^[5]。CML 的治疗手段主要包括羟基尿、干扰素、TKIs 和干细胞移植等。IM 是一种高度特异的酪氨酸激酶抑制剂, 是针对 CML 致病基因产物 P210bcr-abl 和 P190bcr-abl 的靶向药物。然而近几年显示约 20% 的 CML 患者在治疗过程中发生耐药^[6], 因此对于 TKIs 耐药机制的研究成为当下至关重要急迫的任务。

生理状态下一定水平的活性氧对于保持细胞的增殖与信号转导是非常重要的,然而 ROS 过多积聚会导致细胞损伤,DNA 的氧化损伤等^[7]。研究^[8]表明在造血干细胞中 ROS 的升高通过激活一系列信号通路导致细胞周期的紊乱,用抗氧化剂 NAC 治疗的结果是造血干细胞周期恢复正常。此外,ROS 氧化物质使磷酸酶活性受到抑制,进而受磷酸酶调节的蛋白酶活性也受到抑制,如 JAK-STAT 信号转导通路^[9-10]。因此本研究主要阐述 STAT5-ROS 通路在 CML 的 IM 耐药中的作用机制,为探索多靶点治疗提供科学依据。

本实验采用 IM 浓度递增的方法以 K562 细胞作为母体成功诱导出对其耐药的 K562/G 细胞,使 K562/G 细胞能长期维持在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度左右。本研究结果表明,耐药细胞株 K562/G 细胞内 ROS 和 STAT5 水平均明显高于 K562 组,使用 NAC 抑制 ROS,结果显示 STAT5 水平下降,甚至低于 K562 组,同时 STAT5 蛋白检测也表明 K562 细胞明显低于耐药细胞株。Casetti et al^[11] 研究发现 STAT5A 和 STAT5B 同时下调会促进 CML 细胞死亡,本研究结果与该结论一致。CML 患者的 STAT5 通常处于高度激活状态。STAT5 激活是 bcr/abl 下游重要的抗凋亡通路之一,也是 bcr/abl 癌基因转换所必须的^[12]。本研究显示 STAT5 是 bcr/abl 关键下游信号分子,其增高提示 CML 疾病可能出现进展;是 CML 祖细胞对 TKIs 敏感性的重要决定因素,也是治疗发生耐药的重要机制之一^[13]。bcr/abl 直接作用于 STAT5^[14],诱导高水平的 ROS 产生,导致 DNA 慢性氧化损伤,增加细胞突变,通过凋亡或其他机制导致细胞死亡^[15]。本研究不足之处是患者标本难收集,下一步拟进一步收集病例,从体内实验进行验证,并结合 STAT5 上游相关实验室指标进行研究。

综上所述,白血病细胞发生耐药已经成为治疗失败、复发和转移的根源,氧化应激在多种肿瘤疾病发生发展中作用也十分明确,本研究显示 STAT5 在慢性髓细胞白血病中高表达,STAT5 活性增强导致 ROS 水平处于较高状态,使 DNA 损伤和基因组不稳定,引起基因突变,发生 IM 耐药。因此 STAT5-ROS 通路可能作为新的治疗靶点,阻断慢性髓细胞白血病患者发生耐药,为白血病的治疗带来新的希望。

参考文献

[1] Kantarjian H, Shah N P, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus ima-

- tinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(24): 2260-70.
- [2] Roy S, Tenniswood M. Site-specific acetylation of p53 directs selective transcription complex assembly [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4765-71.
- [3] Chomel J C, Bonnet M L, Sorel N, et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease [J]. *Blood*, 2011, 118(13): 3657-60.
- [4] Fan Y, Lu H, An L, et al. Effect of active fraction of *Eriocaulon sieboldianum* on human leukemia K562 cells *via* proliferation inhibition, cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 43: 13-20.
- [5] 中华医学会血液学分会, 中国慢性髓性白血病诊断与治疗指南(2013年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(5): 464-70.
- [6] Koptyra M, Falinski R, Nowicki M O, et al. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis *via* reactive oxygen species to encode imatinib resistance [J]. *Blood*, 2006, 108(1): 319-27.
- [7] Maghzal G J, Krause K H, Stocker R, et al. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases [J]. *Free Radic Biol Med* 2012, 53(10): 1903-18.
- [8] Ihan Ç, Suyani E, Sucak G T, et al. Inflammatory markers, oxidative stress, and antioxidant capacity in healthy allo-hsct donors during hematopoietic stem cell mobilization [J]. *J Clin Apher*, 2015, 30(4): 197-203.
- [9] Schafranek L, Nievergall E, Powell J A, et al. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2015, 29(1): 76-85.
- [10] Valent P. Targeting the JAK2-STAT5 pathway in CML [J]. *Blood*, 2014, 124(9): 1386-8.
- [11] Casetti L, Martin-Lannerée S, Najjar I, et al. Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2052-8.
- [12] Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2011, 117(12): 3409-20.
- [13] Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34⁺ cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Blood*, 2014, 124(9): 1492-501.
- [14] Warsch W, Walz C, Sexl V, et al. JAK of all trades: JAK2-STAT5 as novel therapeutic targets in BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2013, 122(13): 2167-75.
- [15] Pawlowska E, Blasiak J. DNA repair—a double-edged sword in the genomic stability of cancer cells—the case of chronic myeloid leukemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 27535-49.

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.009.html>

富血小板纤维蛋白在治疗糖尿病兔皮肤溃疡中的实验研究

汪新伟 荣洁琳 蒋思静 马莉 贾大平 吴亮亮 赵宇

摘要 目的 观察富血小板纤维蛋白(PRF)对糖尿病动物模型皮肤创面的治疗作用及疗效。方法 将20只大白兔随机分为空白对照组(4只)、糖尿病模型组(4只)、重组人表皮生长因子凝胶(rhEGF)组(4只)、PRF组(8只),将糖尿病模型组、rhEGF组、PRF组建立糖尿病动物创面模型。A组动物创面分别予以1%碘伏清创、1%碘伏清创、rhEGF外敷、PRF外敷。观察各组创面面积及容积变化情况,标本予以HE染色观察创面组织生长情况,免疫组化标记血管内皮生长因子(VEGF)蛋白,计算VEGF平均光密度。结果 干预后3、7 d显示,rhEGF组、PRF组创面面积和容积缩小的速度高于空白对照组及糖尿病模型组($P < 0.05$)。第2、3周末大体病理观察 rhEGF组、PRF组创面组织表皮覆盖完全,真

皮结构致密,皮肤结构基本恢复正常,有大量毛细血管存在。第2、3周末标本 VEGF 平均光密度蛋白含量,rhEGF组、PRF组显著高于空白对照组、糖尿病模型组($P < 0.05$)。结论 PRF可显著促进糖尿病兔皮肤创面的愈合。

关键词 PRF;富血小板纤维蛋白;糖尿病溃疡;难治性溃疡
中图分类号 R 622

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0983-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.009

难治性溃疡又称为慢性溃疡,是一种临床常见疾病,以糖尿病溃疡较为多见,其病程缠绵,经久不愈。其中糖尿病病足是导致患者截肢致残、死亡及生活能力丧失的重要原因。目前,对于治疗难治性溃疡有很多方法,包括生长因子产品、真空负压伤口引流、蛆虫疗法、光疗、超声治疗、电疗、生物工程组织或皮肤替代品、高压氧治疗^[1]。自体来源的生物材料应用是难治性溃疡最有前景的治疗方法之一,富血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP)治疗已首

2017-03-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171829)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院整形外科,合肥 230022

作者简介:汪新伟,男,硕士研究生;

赵宇,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhaoyuzj@aliyun.com

The mechanism of STAT5-ROS signal pathway to mediated imatinib resistance of K562 cells

Hao Yingchan, Xu Xiucui

(Central Laboratory, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the mechanism of STAT5-ROS pathway to mediate IM resistance of K562 cells. K562 cells were cultured with imatinib at gradually increased concentrations to generate resistance cell line.

Methods CCK-8 assay was used to clarify the resistance ratio. The STAT5A and STAT5B mRNA levels were detected by RT-PCR. Flow cytometry assay was used to detect the level of ROS and cell apoptosis. The expression of STAT5 protein was detected by Western blot. **Results** Imatinib resistance cell line K562/G was successfully induced by gradually increasing concentrations of IM. The IC_{50} of K562/G was eighty times higher than K562 by CCK-8. Cell growth curve showed that K562/G was not inhibited in 20 $\mu\text{mol/L}$ imatinib, whereas the K562 cell was significantly inhibited by up to 0.1 $\mu\text{mol/L}$ imatinib. Intracellular level of ROS in K562/G was obviously higher than that of K562 cells ($P = 0.0001$). The apoptosis ratio of K562 was lower than that of K562/G when the same concentration of IM react on the two cell lines for the same time ($P < 0.05$). The expression of STAT5A and STAT5B mRNA in K562/G was higher than in K562 ($P = 0.0001$, $P = 0.0170$). Then the level of STAT5 proteins in K562/G cells was significantly increased ($P = 0.0090$). **Conclusion** The STAT5 is highly expressed in CML. STAT5-ROS is closely related to the formation of imatinib resistance of chronic myeloid leukemia.

Key words chronic myeloid leukemia; imatinib resistance; STAT5-ROS signal pathway