

阿法替尼和吉非替尼分别联合培美曲塞对人肺腺癌细胞作用的研究

边 劲, 王 琳, 寻 琛, 黄 伟

摘要 目的 探讨阿法替尼(BIBW2992)和吉非替尼分别与培美曲塞联合对肺腺癌细胞 PC-9(突变敏感型)、H1975(T790M 耐药型)的增殖和凋亡的影响并阐述其可能机制。方法 MTT 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期变化,Western blot 法检测不同浓度 BIBW2992 和吉非替尼对细胞胸苷酸合成酶(TS)表达水平的影响。结果 BIBW2992、吉非替尼以及培美曲塞单独作用后,PC-9 和 H1975 细胞均明显凋亡,同时细胞增殖受到不同程度抑制。BIBW2992 与培美曲塞联合在 PC-9、H1975 细胞中对细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用较单药组均有明显提高($P < 0.05$),而吉非替尼与培美曲塞联合仅在 PC-9 细胞中提高单药对细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用($P < 0.05$)。BIBW2992 在 PC-9、H1975 细胞中均显著降低 TS 表达,而吉非替尼在 H1975 细胞中无显著抑制作用。结论 BIBW2992 可以克服 T790M 突变耐药,并且与培美曲塞联合

对 PC-9、H1975 细胞呈协同增效作用;吉非替尼与培美曲塞联合仅对 PC-9 细胞具有协同增效作用,可能主要与下调 TS 表达作用有关。

关键词 BIBW2992; 吉非替尼; 肺癌; 细胞周期; 细胞凋亡
中图分类号 R 734.2; R 329.25; R 979.19

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0772-05

表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)的临床应用使晚期非小细胞肺癌的治疗获得了突破性进展。吉非替尼、厄罗替尼在临床上已经广泛应用,并且取得了很好的疗效,但是长期治疗几乎所有患者均会产生耐药。研究^[1-2]显示二代双重不可逆性酪氨酸激酶抑制剂阿法替尼(afatinib, BIBW2992)能够克服肺癌治疗中的获得性耐药。同时,目前关于 EGFR-TKIs 和化疗药物的联合应用一直是研究的热点。该实验旨在探讨 BIBW2992、吉非替尼分别与培美曲塞联合对吉非替尼敏感和耐药型肺腺癌细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用,为临床寻找克服第 1 代 EGFR-TKIs 耐药制定方案提供理论基础。

2013-12-20 接收

基金项目:南京军区医学科技创新课题项目(编号:ZD19)

作者单位:安徽医科大学解放军八一临床学院(中国人民解放军八一医院)肿瘤内科,南京 210002

作者简介:边 劲,男,硕士研究生;

王 琳,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: wanglin81yy@163.com

Effect of total glucosides of paeony on endoplasmic reticulum stress in the kidney from diabetic rats

Wu Xiaoxu, Zhang Chaoqun, Xu Kun, et al

(Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To study the effect of total glucosides of paeony (TGP) on endoplasmic reticulum stress in the kidney from experimental diabetic rats. **Methods** Rats were randomly divided into three groups: control group, model group and TGP treated groups. Diabetes rat model was induced with streptozotocin. In TGP group, TGP 50, 100, 200 mg/(kg·d) were orally administered once a day for 8 weeks. The expressions of GRP78, p-PERK and p-eIF2 α were determined by immunostaining in the kidney. **Results** The urinary albumin excretion rate (UAER) in model group was significantly higher than that in TGP treatment group. Analysis of the immunostaining showed the expression of GRP78, p-PERK and p-eIF2 α was significantly increased compared with control rats in the kidney. TGP treatment with 50, 100 and 200 mg/(kg·d) could markedly reduce GRP78 and p-PERK expression in the tubulointerstitium, p-eIF2 α expression in the glomeruli and tubulointerstitium. **Conclusion** The TGP protection of renal tissue in diabetic rats may be associated with inhibition of endoplasmic reticulum stress.

Key words diabetic nephropathy; endoplasmic reticulum stress; total glucosides of paeony

1 材料与方法

1.1 主要材料 人肺腺癌 H1975 细胞(EGFR 基因外显子 20 点突变,耐药型)、PC-9 细胞(EGFR 基因外显子 19 缺失,敏感型)由中国人民解放军第八一医院肿瘤中心实验科提供;胰蛋白酶、胎牛血清、RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基均购自美国 Thermo 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Amresco 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Sigma 公司;吉非替尼和 BIBW2992 分别购自英国阿斯利康和德国勃林格殷格翰公司;培美曲塞购自美国礼来公司;内参(β -actin)、抗细胞胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)单克隆抗体一抗购自美国 Zymed 公司;鼠源二抗购自美国 Cell Signaling 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 GE Healthcare 公司;BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司。

1.2 细胞培养 PC-9、H1975 细胞分别用含 10% 小牛血清的 DMEM、RPMI-1640 高糖培养液置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中常规培养。每 1~3 d 传代 1 次。

1.3 MTT 法检测药物对 PC-9、H1975 细胞生长作用影响 取生长良好的 PC-9、H1975 细胞制成 1×10^8 个/L 细胞悬液,分别接种于 96 孔板中,每孔接种 100 μ l,每组设置 6 个复孔。细胞培养 24 h 贴壁生长后,再按实验设计分别加入 100 μ l 含有不同浓度(0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10 μ mol/L) BIBW2992、吉非替尼、培美曲塞的培养基作用 72 h,每孔加入 MTT 20 μ l,温箱内孵育 4 h 弃上清液,加入 100 μ l 盐酸异丙醇,振荡仪处理 10 min 后,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 波长下各孔吸光值(A),计算出各单药作用 72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)。以 BIBW2992、吉非替尼、培美曲塞分别在 2 种细胞中的 IC₅₀ 作为固定浓度单药及联合作用于 PC-9、H1975 细胞。实验分组:① PBS 对照组(C);② 吉非替尼单独作用 72 h 组(G);③ BIBW2992 单独作用 72 h 组(B);④ 培美曲塞单独作用 72 h 组(P);⑤ 吉非替尼联合培美曲塞作用 72 h 组(G+P);⑥ BIBW2992 联合培美曲塞作用 72 h 组(B+P),实验重复 3 次。细胞增殖抑制率(%) = $1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测各组细胞周期分布及凋亡 取对数生长期细胞调整至 1×10^8 个/L,每孔 2 ml,

接种于 6 孔板,培养 24 h 后,以 BIBW2992、吉非替尼、培美曲塞分别在 2 种细胞中的 IC₅₀ 作为固定浓度单药及联合作用于 PC-9、H1975 细胞 72 h 后,收集细胞,在 -20℃ 保存过夜。将固定的细胞离心弃上清液, PBS 洗细胞 2 次,再次离心弃上清液加入 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞,根据说明书加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液,混匀、室温、避光,反应 10~15 min,用流式细胞仪测定 PI 荧光强度(激发波长 480 nm,吸收波长 630 nm),检测细胞周期分布,并计算凋亡百分比。

1.5 Western blot 法检测 BIBW2992、吉非替尼对细胞 TS 表达的影响 取对数生长期细胞调整至 1×10^8 个/L,每孔 2 ml,接种于 6 孔板,培养 24 h 后,按实验设计分组给药后收集细胞,细胞裂解液裂解细胞,收集细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,等量上样,将蛋白质样品进行 SDS-PAGE 电泳,转移至硝酸纤维素膜上,室温下 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h,加入一抗(1:800)摇床孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,每次约 10 min,二抗(1:2 000) 37℃ 摇床孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次,每次约 10 min,电化学发光显色系统显色,曝光,显影,凝胶分析系统分析蛋白的表达情况。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间比较采用单因素方差分析,两组之间互相比对采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 BIBW2992、吉非替尼单药及分别与培美曲塞联合对细胞增殖抑制作用 BIBW2992、吉非替尼单药或分别联合培美曲塞均能抑制 PC-9、H1975 细胞生长。BIBW2992 和吉非替尼单药作用 72 h 抑制 PC-9 细胞生长的 IC₅₀ 分别为 5.81×10^{-10} mol/L 和 4.54×10^{-8} mol/L, BIBW2992 和吉非替尼单药作用 72 h 抑制 H1975 细胞生长的 IC₅₀ 分别为 3.36×10^{-7} mol/L 和 1.18×10^{-5} mol/L。分别取 BIBW2992、吉非替尼和培美曲塞在 2 种细胞中的 IC₅₀ 作为固定浓度研究两药联合对 PC-9 和 H1975 细胞的生长抑制作用。结果显示,在 PC-9 细胞中(B+P)、(G+P) 组较之单药组生长抑制作用均明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 H1975 细胞中仅(B+P) 组对细胞生长抑制有协同增效作用,较单药组明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 BIBW2992 吉非替尼单药及分别与培美曲塞联合对细胞凋亡及周期的影响 培美曲塞单药作用

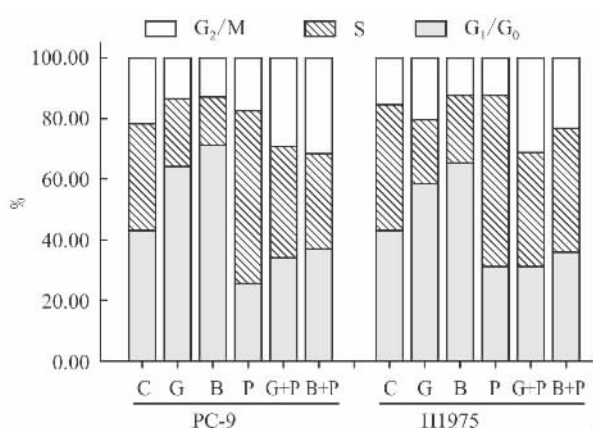


图1 BIBW2992和吉非替尼单药及分别与培美曲塞联合对PC-9、H1975细胞周期的影响

于2种细胞时主要将细胞阻滞在S期,分别为56.55%、55.98%。BIBW2992、吉非替尼单药作用于2种细胞时大部分细胞主要被阻滞在G₀/G₁期,在PC-9细胞中分别为68.33%、64.12%,在H1975细胞中分别为60.82%、63.77%。(B+P)、(G+P)组细胞杂乱的分布于各个周期见图1。(B+P)、(G+P)组在PC-9细胞中较之单药组均明显提高了凋亡作用,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在H1975细胞中,仅(B+P)组较单药组诱导凋亡作用明显提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图2。

2.3 BIBW2992、吉非替尼对PC-9、H1975细胞TS表达的影响 在PC-9细胞中BIBW2992和吉非替尼均可以显著降低TS,而在H1975细胞中随着药物浓度逐渐增加BIBW2992仍显著降低TS,而吉非替尼对TS表达无显著抑制作用,见图3。

表1 BIBW2992和吉非替尼分别与培美曲塞联合对PC-9、H1975细胞生长抑制及凋亡作用(% $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率		凋亡率	
	PC-9 细胞	H1975 细胞	PC-9 细胞	H1975 细胞
C	2.93 ± 1.14	3.23 ± 0.47	4.56 ± 0.34	5.76 ± 0.79
G	50.43 ± 0.75 **	49.52 ± 1.86	17.97 ± 1.48 **	13.41 ± 0.90
B	48.30 ± 2.06 ##	51.45 ± 2.02 ##	17.65 ± 0.99 ##	23.23 ± 1.12 ##
P	45.07 ± 2.56 ** ##	44.33 ± 1.03 ##	15.34 ± 2.16 ** ##	11.28 ± 0.63 ##
G+P	60.25 ± 2.05	47.80 ± 1.86	29.19 ± 1.91	13.14 ± 1.48
B+P	64.62 ± 1.32	59.32 ± 3.08	30.96 ± 2.55	33.28 ± 2.04

与G+P组比较: ** $P < 0.01$; 与B+P组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

EGFR-TKIs是较早应用于临床抗肿瘤的靶向药物之一。绝大部分EGFR突变的非小细胞肺癌患者都对可逆性的第1代EGFR-TKIs敏感。但随着治疗时间的延长最终都会产生获得性耐药,如EGFR790位点上的苏氨酸(threonine)被甲硫氨酸(methionine)取代(T790M突变)造成近50%的肿瘤患者产生获得性耐药^[3],然而新的不可逆性双重酪氨酸激酶抑制剂BIBW2992给患者带来新的希望。BIBW2992不可逆的与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和人表皮受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)酪氨酸激酶结合抑制其活性,进而阻断EGFR-HER2介导的肿瘤细胞信号传导途径,从而抑制肿瘤细胞的增殖与转移,诱导肿瘤细胞的凋亡。文献^[1-2]报道阿法替尼对既往接受过化疗及EGFR-TKIs治疗失败的晚期非小细胞肺癌患者在治疗上具有重要意义。文献^[4-5]报道在EGFR突变患者中一线应用

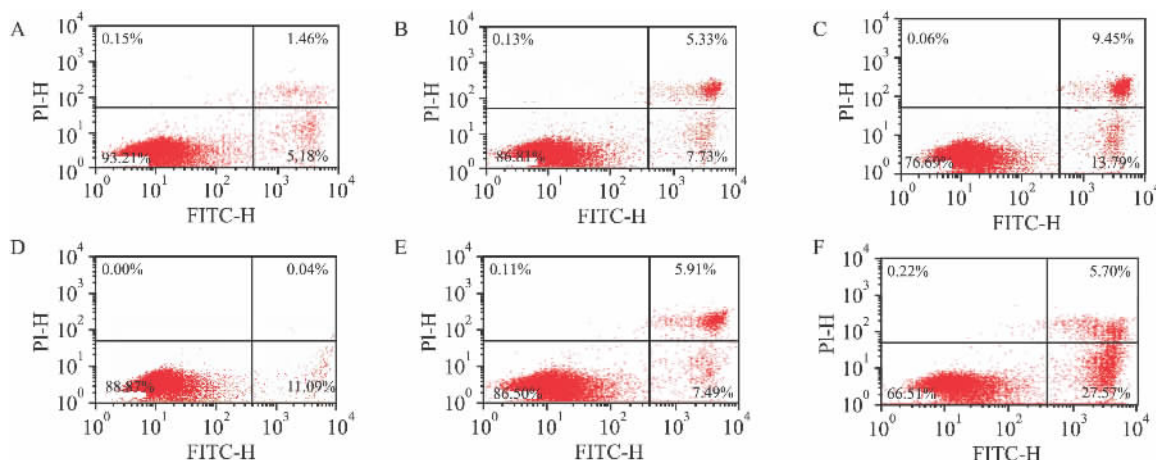


图2 BIBW2992和吉非替尼分别与培美曲塞联合对H1975细胞凋亡的影响

A: C组; B: G组; C: B组; D: P组; E: G+P组; F: B+P组

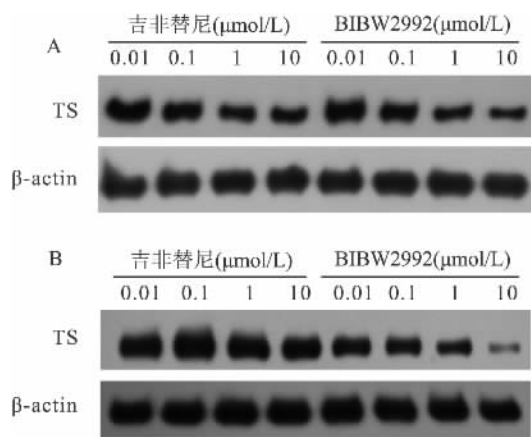


图3 BIBW2992、吉非替尼对 PC-9、H1975 细胞 TS 表达的影响
A: PC-9 细胞; B: H1975 细胞

BIBW2992 与吉非替尼的效果相当,并且较之化疗明显延长了患者的无疾病进展生存期。

研究^[6]显示 BIBW2992 虽然可以克服 T790M 获得性耐药,但是敏感性较之突变敏感型细胞降低。该实验中 BIBW2992 在 H1975 细胞中的 IC_{50} 约为 PC-9 细胞的 600 倍,但仍然是临床治疗中可以达到的血药浓度^[7],而吉非替尼在耐药细胞 H1975 中 IC_{50} 约为 PC-9 细胞的 300 倍,在临床治疗中无法获得。T790M 突变不仅影响 BIBW2992 对肺腺癌细胞的生长抑制作用,同样降低其他不可逆性 EGFR-TKIs (如 CL-387,785 和 PF00299804) 对肺腺癌细胞的敏感性^[8-9]。因而新型靶向药物在临床应用对于获得性耐药患者尽管有效,但是疗效可能会受到一定的限制。目前关于 EGFR-TKIs 联合化疗已经逐渐成为研究的热点。研究^[10]显示的一项多中心开放 II 期临床研究表明培美曲塞同步联合厄洛替尼能提高晚期肺癌患者的中位无疾病进展时间和中位总生存时间。Yoshimura et al^[11]研究中也发现 EGFR-TKIs 治疗耐药后运用培美曲塞序贯联合吉非替尼方案患者仍可以明显获益。这提示可以将 EGFR-TKIs 与培美曲塞联合以期达到协同增效作用从而更好的克服 EGFR-TKIs 耐药。因而本实验同时将吉非替尼、BIBW2992 分别与培美曲塞联合作用于 PC-9、H1975 细胞,探讨二者是否存在协同增效作用。

实验结果提示 BIBW2992 与培美曲塞联合对 PC-9、H1975 细胞的增殖抑制和诱导凋亡均存在协同增效作用,而吉非替尼与培美曲塞联合仅在 PC-9 细胞中起到协同增效作用,这与 Takezawa et al^[6]研究结果基本一致。通过观察细胞周期结果发现,培

美曲塞主要将细胞阻滞在 S 期,而 BIBW2992 和吉非替尼均将细胞主要阻滞在 G_0/G_1 期,二者联合将细胞杂乱阻滞在各周期,从细胞周期角度无法解释两药联合增效的机制。

研究^[12]显示吉非替尼和另一种针对 TS 靶点的药物 S-1 联合无论在野生型还是突变型细胞中均可以起到协同抗肿瘤作用,主要由于吉非替尼降低 TS 从而增强 S-1 对肺腺癌细胞的抑制作用有关。而在 T790M 突变的肺腺癌细胞中,吉非替尼无法显著降低 TS,因而无法起到协同增效作用^[13]。但有研究^[6]显示在吉非替尼耐药的肺腺癌细胞系中,BIBW2992 仍可以明显降低 EGFR 磷酸化以及下调 TS 蛋白水平。本实验将不同浓度的 BIBW2992 和吉非替尼分别作用于 PC-9、H1975 细胞后发现,BIBW2992 和吉非替尼均可以显著下调 PC-9 细胞 TS,而在 H1975 细胞中,BIBW2992 仍然可以显著降低 TS,而吉非替尼下调 TS 作用不明显。这可能是 BIBW2992 与培美曲塞联合在吉非替尼耐药细胞中仍然可以起到协同增效作用的主要机制。

本实验显示 BIBW2992 不仅可以克服吉非替尼耐药,且与针对 TS 靶点的药物培美曲塞联用时可以对耐药细胞 H1975 具有协同增效作用。但是本实验仅仅选择了一种 T790M 突变耐药细胞,一种突变敏感型细胞,因而还有待于在更多不同类型肺腺癌细胞以及与其他 TS 靶点药物(如 S-1、5-FU)联合加以证实,同时有待于在体内进行实验以期更好的指导临床方案的选择。目前,已经有研究^[14]表明除了 T790M 突变产生的获得性耐药,HER2 基因扩增在 EGFR-TKIs 以及西妥昔单抗的获得性耐药中同样存在重要作用,而由于 BIBW2992 的双靶点作用,BIBW2992 将在未来克服针对 EGFR 靶向药物的获得性耐药治疗中具有更加重大的意义。

参考文献

- [1] Miller V A, Hirsh V, Cadranel J, et al. Afatinib versus placebo for patient with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(5): 528-38.
- [2] Katakami N, Atagi S, Goto K, et al. Lux-Lung 4: a phase II trial of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed during prior treatment with erlotinib, gefitinib, or both [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(27): 3335-41.
- [3] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status [J]. Lung Cancer, 2010, 68(2): 198-

- 203.
- [4] Yang J C , Shih J Y , Su W C , et al. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2) : a phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol* , 2012 , 13(5) : 539 – 48.
- [5] Yang J C , Schuler M H , Yamamoto N , et al. LUX-Lung 3: A randomized , open-label , phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations [J]. *J Clin Oncol* , 2012 , 30(Suppl) : a LBA7500.
- [6] Takezawa K , Okamoto I , Tanizaki J , et al. Enhanced anticancer effect of the combination of BIBW2992 and thymidylate synthase-targeted agents in non-small cell lung cancer with the T790M mutation of epidermal growth factor receptor [J]. *Mol Cancer Ther* , 2010 , 9(6) : 1647 – 56.
- [7] Eskens F A , Mom C H , Planting A S , et al. A phase I dose escalation study of BIBW 2992 , an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on , 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours [J]. *Br J Cancer* , 2008 , 98(1) : 80 – 5.
- [8] Kobayashi S , Ji H , Yuza Y , et al. An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor [J]. *Cancer Res* , 2005 , 65(16) : 7096 – 101.
- [9] Engelman J A , Zejnullahu K , Gale C M , et al. PF00299804 , an irreversible pan-ERBB inhibitor , is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib [J]. *Cancer Res* , 2007 , 67(24) : 11924 – 32.
- [10] Von Pawel J , Papai-Szekely Z , Vinolas N , et al. A randomized phase II study of pemetrexed versus pemetrexed plus erlotinib in second-line treatment for locally advanced or metastatic , nonsquamous NSCLC [J]. *J Clin Oncol* , 2011 , 29 (Suppl) : a7526.
- [11] Yoshimura N , Okishio K , Mitsuoka S , et al. Prospective assessment of continuation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of pemetrexed [J]. *J Thorac Oncol* , 2013 , 8(1) : 96 – 101.
- [12] Okabe T , Okamoto I , Tsukioka S , et al. Synergistic antitumor effect of S-I and the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines: role of gefitinib-induced down-regulation of thymidylate synthase [J]. *Mol Cancer Ther* , 2008 , 7(3) : 599 – 606.
- [13] Okabe T , Okamoto I , Tsukioka S , et al. Addition of S-I to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification [J]. *Clin Cancer Res* , 2009 , 15(3) : 907 – 13.
- [14] Takezawa K , Pirazzoli V , Arcila M E , et al. HER2 amplification: a potential mechanism of acquired resistance to EGFR inhibition in EGFR-mutant lung cancers that lack the second-site EGFR T790M mutation [J]. *Cancer Discov* , 2012 , 2(10) : 922 – 33.

The inhibitory effects of the combination of pemetrexed and BIBW2992 or gefitinib respectively on human lung adenocarcinoma cell line

Bian Jin , Wang Lin , Xun Chen , et al

(*Dept of Medical Oncology , College of Clinical Medicine Anhui Medical University , PLA 81st Hospital , Nanjing 210002*)

Abstract Objective To investigate the potential anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the combination of pemetrexed and afatinib(BIBW2992) or gefitinib respectively on gefitinib-sensitive cells (PC-9) and gefitinib-resistant cells with the T790M mutation of EGFR(H1975) and explore its possible anti-cancer mechanism. **Methods**

MTT assay was performed to reveal the inhibitory effect on cell proliferation. Flow cytometry using annexin V-FITC/PI staining was employed to measure the cell apoptosis and cell cycle. Western blot was performed to detect the protein expressions of thymidylate synthase (TS) after treated with different dose of BIBW2992 and gefitinib respectively. **Results** The PC-9 and H1975 cells were inhibited to different degrees after treatment with BIBW2992 , gefitinib and pemetrexed alone and had apparent apoptotic features. The combined treatment with BIBW2992 and pemetrexed resulted in a synergistic effect in inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation compared with BIBW2992 and pemetrexed alone both on the PC-9 and H1975 cells($P < 0.05$) . The combined treatment with gefitinib and pemetrexed resulted in a synergistic effect only on the PC-9 cells($P < 0.05$) , whereas had no such synergistic effect on the H1975 cells. The BIBW2992 decreased the expressions of TS apparently both on the PC-9 cells and H1975 cells , whereas gefitinib had no such effect on the H1975 cells. **Conclusion** The BIBW2992 can overcome the drug resistance of cells with the T790M mutation of EGFR. The combination of BIBW2992 and pemetrexed has an enhanced antitumor effect on both PC-9 cells and H1975 cells , whereas the combination of gefitinib and pemetrexed has an enhanced antitumor effect only on PC-9 cells , with the possible mechanism of ability to suppress the expression of TS.

Key words BIBW2992; gefitinib; adenocarcinoma; cell cycle; cell apoptosis