

고용량 방사선 조사 후 골육종 세포주(Saos-2)의 아포프토시스 발생

고신대학교 복음병원 정형외과학교실
인제대학교 부산백병원 정형외과학교실*

김재도 · 정소학 · 홍영기 · 최장석*

- Abstract -

Induction of Apoptosis in Human Osteosarcoma Cell Lines(Saos-2) by Single Fraction High Dose Irradiation

Jae Do Kim, M.D., So Hak Chung, M.D., Young Gi Hong, M.D., Jang Seok Choi, M.D.*

Department of Orthopaedic Surgery, Gospel Hospital, Kosin University, Pusan, Korea
*Department of Orthopaedic Surgery, Pusan Baek Hospital, Inje University, Pusan, Korea**

A single fraction of 50 Gy extracorporeal irradiation, as a modality of limb-sparing operation, has been used to achieve tumor necrosis in osteosarcoma. Although this modality of radiation therapy preserving the mobility of a joint is commonly practiced, the precise knowledge on the radiobiological response of osteosarcoma cell has remained to be elucidated. We therefore observed whether a single high dose irradiation caused apoptosis in osteosarcoma cells and whether the commitment to apoptosis was associated with cell kinetics. We also investigated radiation dose response along the time course for development of apoptosis following single high dose irradiation. The morphologic change in apoptosis was observed by fluorescence with Hoechst 33258 and the degree and the fraction of cells by flow cytometry. Irradiation of osteosarcoma cells with 10, 30 and 50 Gy resulted in chromatin condensation and apoptotic body formation. The degree of apoptosis in osteosarcoma cells was $29.5 \pm 3.56\%$, $39.9 \pm 4.83\%$ at 24 and 48 hours after 10 Gy irradiation ; $41.1 \pm 3.93\%$, $66.9 \pm 5.21\%$ at 24 and 48 hours after 30 Gy irradiation ; and $48.0 \pm 3.69\%$, $75.6 \pm 4.65\%$ at 24 and 48 hours after 50 Gy irradiation. The fraction of cells in cell-cycle kinetic was $39.2 \pm 4.3\%$ in G2/M, $22.1 \pm 4.65\%$ in G1 at 24 hours after 10 Gy irradiation ; $51.0 \pm 4.3\%$ in G2/M, $20.4 \pm 4.7\%$ in G1 at 48 hours after 10 Gy irradiation ; $40.3 \pm 3.9\%$ in G2/M, $26.1 \pm 4.7\%$ in G1 at 24 hours after 30 Gy irradiation ; $59.2 \pm 3.9\%$ in G2/M, $5.9 \pm 5.1\%$ in G1 at 48 hours after 30 Gy irradiation ; and $44.3 \pm 4.2\%$ in G2/M, $21.1 \pm 3.5\%$ in G1 at 24 hours after 50 Gy irradiation. The fraction of cells at 48 hours after 50 Gy

※통신저자 : 김 재 도
부산광역시 서구 암남동 34
고신대학교 복음병원 정형외과학교실
Tel : 051) 240-6467, Fax : 051) 243-0181, E-mail : jdkim@ns.kosinmed.or.kr

irradiation could not be observed because of irradiation induced cell death of most of cells. All values for irradiated cells showed accumulation in G2/M phase and reduction in G1 phase, irrespective of irradiation dose.

The results suggest that a single fraction of high dose irradiation with 50 Gy results in accumulation of cells at G2/M phase, leading to apoptosis.

Key Words : Osteosarcoma cell, Irradiation, Apoptosis, Cell-cycle distribution

서 론

골육종의 수술적 치료 가운데 사지 보존술의 한 방법으로 절제된 자가골을 수술 중에 50 Gray(이하 Gy 이라 함)를 체외 방사선 조사하여 골의 해부학적 형태를 유지한 상태로 재건하는 재활용 자가골 이식술이 최근에 보고되고 있다^{8,12)}. 그러나 이들 보고는 임상적 시도 및 동물 실험을 통해서 재발을 및 생존률, 합병증에 대하여 보고하였기 때문에, 세포 차원에서 고용량의 방사선 조사 후 골육종 세포에 대한 방사선 생물학적 영향에 대한 연구보고는 많지 않다.

아포프토시스(Apoptosis)는 일종의 유전자에 의해 지배된 죽음(programmed cell death)이라 알려져 있으며, 아포프토시스의 유도기전은 성장인자, 세포내 신호전달 매개체, 유전자 조절단백질, 세포주기 등이 여러 경로를 통해서 작용하여 최종에는 아포프토시스를 실행한다고 알려지고 있고, 아포프토시스의 유도 및 촉진에 항암치료에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다⁴⁻⁷⁾.

최근에 난소 종양 및 유방 육종 세포주에 7 Gy, 10 Gy의 방사선 조사를 한 후 아포프토시스가 발생하였고, 아포프토시스의 발생은 특정 세포주기의 정체현상 즉 First Gap(G1) 주기의 감소 및 Second Gap/Mitosis(G2/M) 주기의 정체와 관계가 있다고 보고되었다^{2,9,10)}.

따라서 본 연구는 일시에 고용량의 방사선 조사가 골육종 세포주(Saos-2)에도 아포프토시스를 발생시키며, 방사선 조사후 골육종 세포주의 아포프토시스 발생이 방사선 조사량 및 시간 경과와 어떤 관계가 있는지, 또한 고용량의 방사선 조사가 골육종 세포주의 세포주기에 어떠한 영향을 주는지를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험대상 : 골육종 세포주

한국 세포주 은행에서 분양 받은 골육종 세포주 Saos-2 (KCLB30085)를 Eagle's minimal essential medium(GIBCO BRL, Lifetechnologies사, France), 10% fetal calf serum(GIBCO BRL, Lifetechnologies사, France)과 항생물질 penicillin 100unit/ml, streptomycin 100 μ g/ml을 첨가하여 배양하였다. 세포주는 6개의 75cm² 용기에서 1주일에 2회 배양액을 교환하여 세포주를 유지하였다.

2. 세포 배양 및 방사선 조사

형태학적 변화를 관찰하기 위하여 75cm² 용기에서 배양된 세포주는 실험 1일전, trypsin 효소 처리하여 세포를 떼어낸 후 세포수 측정기(hemocytometer)로 1×10^5 개의 세포가 되도록 조절하여 1cm²의 세포배양 유리가 포함된 24 well 배양용기 3개에 각각 9 well씩 분주하였으며, 시간에 따른 변화를 조사하기 위하여 각각의 24 well은 고용량의 방사선 조사 후 즉시, 24시간, 48시간으로 세분하여 관찰하였다. 각 시간별에 따른 관찰에는 각각 3개의 well로 구성하여 3회 관찰하도록 하였다.

아포프토시스 발생률 및 세포주기를 관찰하기 위하여 75cm² 용기에서 배양된 세포주는 실험 1일전, trypsin 효소 처리하여 세포를 떼어낸 후 세포수 측정기로 1×10^5 개의 세포가 되도록 조절하여 10 Gy 방사선 조사용 25cm² 배양용기 3개, 30 Gy용 3개, 50 Gy용 3개에 각각 분주하였으며, 시간에 따른 변화를 조사하기 위하여 각 용량의 배양용기는 즉시, 24시간, 48시간용 3개로 구분하였다.

골육종 세포주는 임상에서 이용하는 선형가속기(NELAC사, Japan, 200rad/min, 6MEV)로 일

시에 10 Gy, 30 Gy 그리고 50 Gy를 각각 조사하였으며, 방사선 조사후 즉시, 24시간, 48시간 후에 방사선 생물학적 변화를 관찰하였으며, 방사선 조사하지 않은 골육종 세포주도 비교 관찰하였다.

3. 형태학적 변화 및 핵의 형광 염색

시간에 따른 아포프토시스를 관찰하기 위하여 세포주를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 다음 methanol로 고정하였다. DNA염색 시약인 bisbenzenamide fluorochrome(Hoechst No. 33258, 이하 Hoechst) 5mg을 Hank's 용액 100ml에 녹이고 merthiolate 10mg을 첨가하여 보존액으로 사용하기 위하여 냉장 보관하였다. 보존액을 각 slide에 1ml을 분주한 다음에 30분간 실온에서 염색하였다. 염색 후 증류수로 3회 세척한 다음 형광현미경(Nikon사, Japan)으로 관찰하였다.

세포주의 세포질 및 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 방사선 조사 후 세포주를 PBS로 2회 세척 후 Wright 용액으로 염색한 다음 광학 현미경(Nikon사, Japan)으로 관찰하였다.

4. 아포프토시스 발생률 및 세포주기 분포의 변화

방사선 조사 후 배양된 세포주를 trypsin 효소 처리한 후 원심 분리하여 세포를 분리하였고, 분리된 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤에 냉장 보관된 70% ethanol로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 2회 세척하였다. RNase A 용액에 실온에서 30분간 처리한 다음에 Propium iodide(50ug/ml) 용액으로 염색하였다.

세포주기의 분포 및 아포프토시스 발생률은 유세포 분리기(Becton Dickinson사 FACS System, Germany) 및 동 기계에 포함된 Modifit DNA 분포 모델 프로그램을 이용하여 시간 및 조사량에 따라 분석하였다.

분석결과는 형광강도로 측정된 DNA양과 골육종 세포수로 산출하여 점분포도 및 산포도로 표현하였다.

5. 통계처리

SPSS(Window version 7.0, USA) 통계 프로그램을 이용하여 아포프토시스 발생률을 t-test로 검정하였다.

결 과

1. 형태학적 변화 및 핵의 형광 염색

일시에 고용량의 방사선을 조사한 후에 세포 배양 유리에 부착된 골육종 세포주의 형태학적 변화는 세포질이 위축되었으며 핵은 분절되어 나타났다(Fig. 1-A, B).

핵의 형광염색에서 골육종 세포주는 염색질이 농축되면서 핵막 주변으로 응집되어 반달모양의 형태를 보였고, 핵 자체는 분절되어 2개 이상의 조각으로 나뉘면서 아포프토시스 체를 형성하였다(Fig. 2-A, B, C).

2. 아포프토시스 발생률 및 세포주기 분포

방사선을 조사하지 않은 골육종 세포주에서 세포주기 및 DNA 정량분석을 보면, G1 주기에 64.1±3.2%, G2/M 주기는 11.3±4.1%로 분포하였다

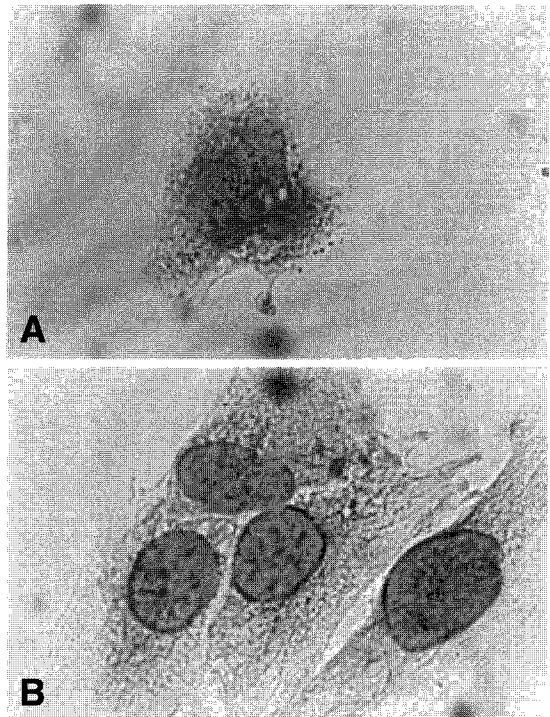


Fig. 1. Morphologic change in osteosarcoma cells.

A. Non-irradiated osteosarcoma cells

B. Osteosarcoma cells incubated 24 hours after 10 Gy irradiation, show marked cytoplasmic shrinkage and fragmented nuclei(Wright staining ×400).

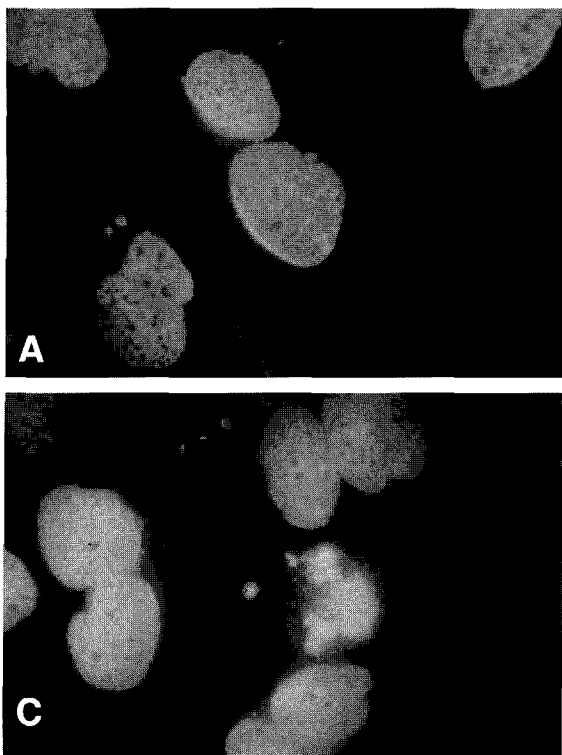
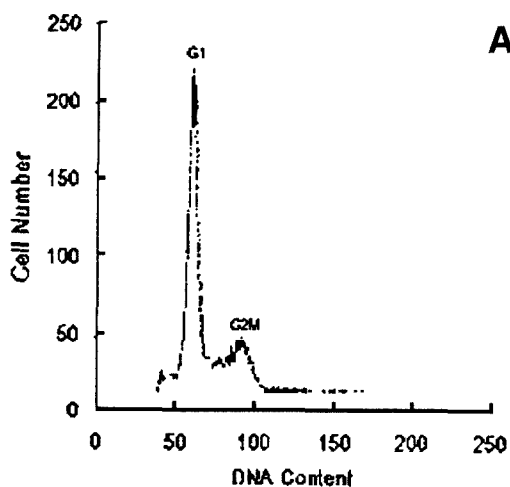
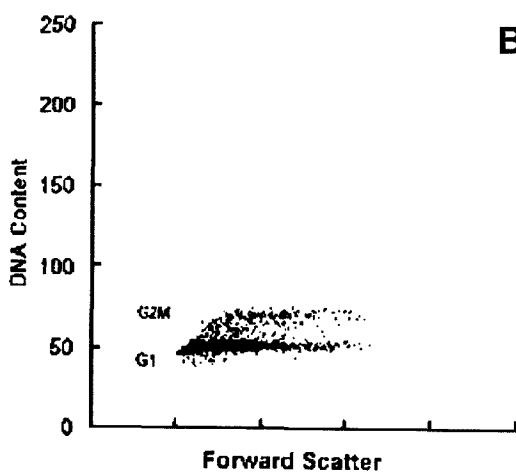


Fig. 2. Hoechst staining of nuclei in attached osteosarcoma cells.

- A.** Non-irradiated cells
- B.** Cells incubated 48 hours after 10 Gy irradiation, show chromatin condensation.
- C.** Cells incubated 48 hours after 10 Gy irradiation, show apoptotic body(Hoechst staining $\times 400$).



A



B

Fig. 3. Appearance of diploid cells in non-irradiated osteosarcoma cells.

- A.** DNA content frequency histogram shows high G1 phase.
- B.** Dot-plots of FACS analysis shows accumulation of G1 phase.

(Fig. 3-A,B). 10 Gy, 30 Gy, 50 Gy를 조사한 후의 세포주기 및 DNA 정량 분석은 방사선 조사하지 않은 골육종 세포와 비교해서 G1 주기는 감소하였고, G2/M 주기는 증가하였다(Fig. 4-A,B).

아포프토시스 발생률은 10 Gy의 방사선을 조사한 예에서 24시간, 48시간에 $29.5 \pm 3.56\%$, $39.9 \pm 4.83\%$ 로 각각 나타났고, 30 Gy를 조사한 예는 24시간, 48시간에 $41.1 \pm 3.93\%$, $66.9 \pm 5.21\%$ 로 나

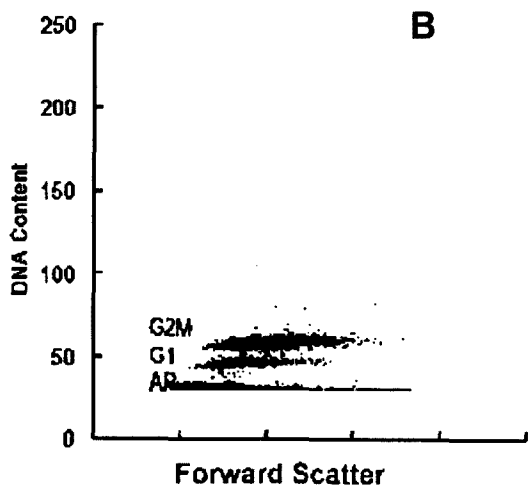
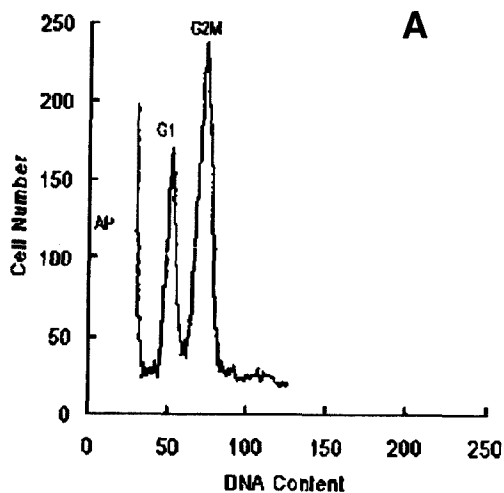


Fig. 4. Appearance of apoptotic cells in osteosarcoma cells after exposure of 10 Gy.

A. DNA content frequency histogram shows accumulation of G2/M phase.

B. Dot-plots of FACS analysis shows marked appearance of apoptosis and accumulation of G2/M phase.

AP: apoptotic cells

타났으며, 50 Gy를 조사한 예는 24시간, 48시간에 48.0±3.69%, 75.6±4.65%로 나타나 10 Gy 방사선 조사 후 아포토시스 발생률에 비해 유의하게 높게 나타났다($p < 0.001$) (Fig. 5).

세포주기 분포의 변화도 동시에 분석하였는데 10 Gy의 방사선을 조사후 24시간에 G2/M 주기가 39.2±4.3%로 증가하였으며, G1 주기는 22.1±3.7%로 감소하였다. 48시간에는 G2/M 주기가 51

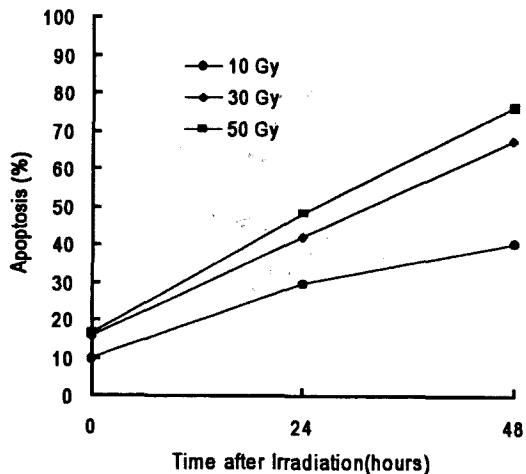


Fig. 5. Percentage of apoptosis in irradiated osteosarcoma cells. The cells at 48 hours after 50 Gy irradiation show highest apoptosis.

±4.3%, G1 주기가 20.4±4.7%였다(Fig. 6). 30 Gy의 방사선을 조사후 24시간에 G2/M 주기는 40.3±3.9%, G1 주기는 26.1±4.7%였고, 48시간에 G2/M 주기는 59.2±3.9% G1 주기는 5.9±5.1%로 나타났다. 50 Gy를 조사한 후 24시간에 G2/M 주기는 44.3±4.2%, G1 주기는 21.1±3.5%였고, 48시간에는 75% 이상의 골육종 세포가 아포토시스 발생을 보여서 세포주기를 측정할 수 없었다.

고 찰

골육종 치료의 한 방법으로 광범위 절제술 후 절제한 골 조직을 체외 방사선 조사하여 재건하는 방법이 이용되고 있는데 이때 사용하는 방사선 조사는 선형가속기로 일시에 50 Gy를 조사한다^{8,12)}. 그러나 일시에 고용량 방사선을 체외 조사하는 보고는 동물 실험 및 임상 연구에 한정되었기 때문에 세포 차원에서 고용량 방사선 조사 후 방사선 생물학적 변화에 대한 보고가 필요한 실정이었으며, 골육종 세포주에서 방사선 조사에 의한 방사선 생물학적 보고로 방사선 민감성을 측정하기 위한 골육종 생존율 및 방사선 조사 후 복원력을 조사한 보고가 발표되었지만^{5,11)}, 세포주에 따라서 다양한 반응을 보여, 방사선 조사의 영향에 대한 지표로는 불충분하였다.

항암제 및 방사선 조사는 정상 조직 및 암조직 세

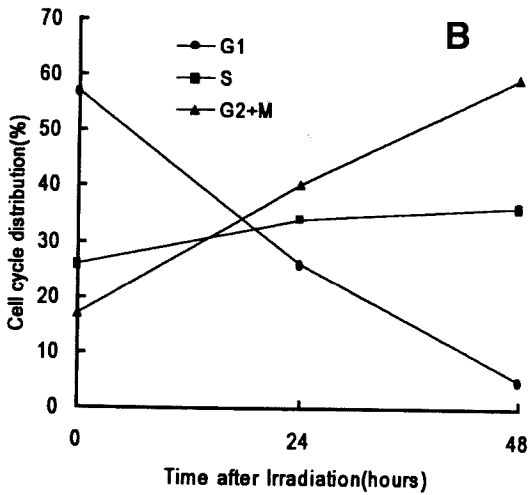
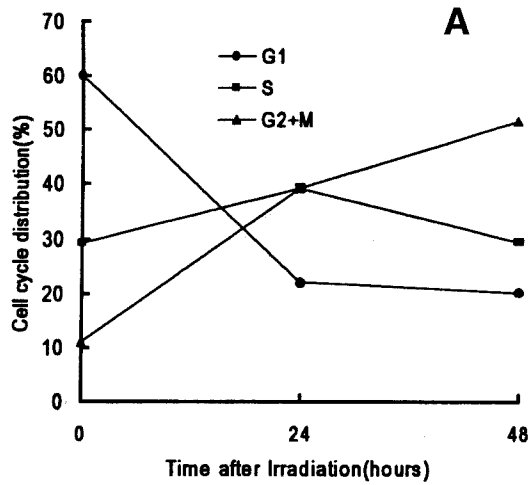


Fig. 6. Analysis of cell-cycle phase distribution.

A. Irradiation with 10 Gy shows accumulation of G2/M phase.

B. Irradiation with 30 Gy shows more accumulation of G2/M phase than 10 Gy.

포에 괴사와는 다른 형태의 세포 죽음인 아포프토시스를 유발한다고 알려져 있는데^{1,2,6,7,9,10}. 아포프토시스에 대한 지금까지의 정의는 세포가 핵을 중심으로 일어나는 일련의 형태학적 변화에 의한 형태학적 정의와 유전자 DNA의 nucleosome 단위로 단편화되는 생화학적 변화에 따른 생화학적 정의가 있었으나 최근에 “세포가 스스로 여러 가지 내외적인 정보를 종합적으로 판단하여 유전자에 의해 억제되어 있던 자살장치를 가동시키므로써 세포가 죽게 되는 과정”이며, 유전자에 의한 세포의 죽음이라고 정의되고

있다^{1,3,7}. 아포프토시스의 형태학적 특징은 핵내 염색질의 농축 현상 및 아포프토시스 체의 형성인데, 이러한 형태학적 변화는 nucleosome 사이의 연결부위에서 핵이 DNA가 분할이 일어나 여러 개의 조각을 만들기 때문이다. DNA조각은 전기영동에서 특징적인 사다리 모양을 보이며, 형광 염색에서 핵의 분절화 현상을 명확하게 관찰할 수 있다^{2,7,9}. 방사선 조사에 따른 방사선 민감성 유무를 알기 위해서는 아포프토시스 발생유무를 알 수 있는 DNA형광염색법 및 전기영동으로 DNA를 추출하여 사다리 형태의 DNA의 분절화 현상을 관찰하는 방법이 가장 정확한 방법이지만 전기영동으로 관찰할 수 있는 DNA 분절화 현상은 초기변화에는 나타나지 않는다는 보고가 있었다⁶.

본 실험에서 골육종 세포주에 일시에 고용량의 방사선 조사 후 세포 차원에서 방사선 생물학적 영향에 대한 지표로서 아포프토시스 발생유무를 관찰하였는데, 핵의 형태학적 변화를 관찰하는 Hoechst 염색을 시행하여 아포프토시스의 발생을 형태학적으로 관찰하였던 바, 방사선 조사량이 증가할수록 형광현미경 시야에서 높은 염색질의 농축 및 전형적인 아포프토시스 체의 발생을 관찰할 수 있었다. 이는 Soldatenkov 등^{9,10}이 유잉 육종 세포주에 7 Gy 방사선 조사 후 72시간째에 형광 염색법으로 아포프토시스를 관찰한 결과와 본 실험의 골육종 세포주에 10 Gy 방사선 조사 한 후 48시간에 아포프토시스 체의 발생과 유사하였다.

최근에 악성 종양의 연구에 있어서, 종양세포를 정상세포와 구별하고, 그 특성을 규정하며, 이를 바탕으로 한 종양세포의 특성에 관한 연구를 위하여 다양한 방법 즉, 세포의 크기, 모양, 세포질내 과립의 양, 색소의 양, DNA 함량, 세포내 단백질, 세포내 암유전자 등을 정량적으로 분석하는데 유세포 분리기가 유용하여 그 이용이 증가하고 있다^{4,7,9}.

Soldatenkov⁹ 및 Filippovich 등²이 방사선 조사 후 유잉 육종과 난소 종양의 세포주에서 유세포 분리기를 이용하여 아포프토시스 발생률을 보고하였는데, 유잉 육종 세포주에 7 Gy 방사선 조사 후 72시간에 20%의 아포프토시스 발생을 보고하였으며, 난소 종양 세포주에 감마 방사선 10 Gy를 조사한 후 72시간에 30~40%의 발생률을 보고하였다. 본 실험에서도 유세포 분리기를 이용하여 아포프토시스

의 발생을 관찰하였는데 10 Gy 방사선 조사 후 골육종 세포주에서 아포프토시스 발생률은 24시간, 48시간 후에 $29.5 \pm 3.56\%$, $39.9 \pm 4.83\%$ 로 유사한 결과가 나타났다. 한편 본 실험에서 50 Gy 방사선 조사한 후 48시간에 75%의 높은 아포프토시스 발생률을 보여 현재 임상에서 골종양의 재활용 재건술시체의 방사선 50 Gy를 조사하였을 경우 대부분의 골육종 세포가 아포프토시스 과정으로 유도되는 것을 관찰할 수 있었다.

아포프토시스 발생기전으로 정상 세포에 방사선 조사를 할 경우 세포는 p53 유전자가 발현되어 일시적으로 세포주기가 정지되며, 그 기간 동안 손상된 DNA가 복구되는데, 종양세포의 경우에는 종양 유전자에 의한 세포 증식의 촉진 현상과 p53 유도성 세포 주기 정지 현상의 충돌이 일어나 아포프토시스 과정으로 유도한다고 알려지고 있다. 본 실험에서 골육종 세포주에 방사선 조사 후 24, 48시간째에 골육종 세포주는 시간 및 조사량에 따라서 진행성으로 G1 주기의 감소와 G2/M 주기에 정체되는 현상을 보였다. 이 결과는 Soldatenkov⁹⁾ 및 Filippovich 등²⁾이 유잉 육종 및 난소 종양에 방사선 조사를 하여 관찰한 세포주기의 변화 즉, G2/M에 세포주기가 정체된 후 아포프토시스가 발생하였다는 보고와 일치하였다. 따라서 골육종 세포주는 방사선 조사 후 G2/M 주기에서 정체된 후 아포프토시스로 진행된다고 생각된다.

Ubiquitin-proteasom은 다발성 단백분해 활성을 가진 복합체로서 ubiquitin 단백질을 파괴하는 작용이 있으며, 세포주기의 조절에 필수적인 물질이라고 알려져 있다^{3,9,10)}. 따라서 방사선 조사에 의한 특정 세포주기의 정체는 proteasom 체계의 변형을 반영하며, 특정 세포주기의 정체는 종양세포의 증식을 유도하는 종양유전자와 충돌이 일어나 종양세포가 아포프토시스 과정으로 들어가도록 유도한다고 보고되었다⁹⁾. 최근에 Soldatenkov 등^{9,10)}은 유잉 육종에 7 Gy 방사선 조사를 한 후 종양세포에 ubiquitin 면역형광 염색을 시행하여 ubiquitin 단백질이 증가하는 것을 관찰하였고, ubiquitin 단백질의 증가가 아포프토시스 과정을 촉진한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서도 일시에 50 Gy 방사선 조사 후 초기 48시간에 75% 이상의 아포프토시스가 발생하였는데, 고용량의 방사선 조사가 방사선 유도성 아포

프토시스 발생 기전의 하나인 ubiquitin-proteasome 과정의 변형 및 p53 유전자의 발현을 증가하는지 분자생물학적으로 규명하는 연구가 향후 필요할 것으로 생각된다.

결 론

임상에서 이용하는 선형 가속기로 고용량의 방사선을 일시에 골육종 세포주(Saos-2)에 조사하였는데, 50 Gy의 방사선을 조사한 후 초기 48시간내에 높은 아포프토시스 발생률을 보여, 임상에서 사용하는 50 Gy의 방사선 조사는 골육종 세포의 아포프토시스를 유도한다고 생각된다.

고용량의 방사선 조사는 세포주기중 G2/M 주기의 정체와 G1 주기의 감소를 유발하였는데, 향후 방사선 조사에 의한 특정 세포주기의 정체가 아포프토시스 발생을 촉진하는 기전에 관한 분자생물학적 연구가 필요할 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Fellenberg J, Mau H, Scheuerpflug C, Ewerbeck V and Debatin KM : Modulation of resistance to anti-apo-1 induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. *Int J Cancer*, 72:536-542, 1997.
- 2) Filippovich IV, Sorokina NI, Robillard N and Chatal JF : Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids. *Int J Cancer*, 72:851-859, 1997.
- 3) Fisher DE : Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell*, 78:539-542, 1994.
- 4) Hall EJ : *Radiobiology for the radiologist*. 3th ed. Philadelphia, JB Lippincott Co:137-160, 1987.
- 5) Iizuka M, Ando K, Aruga T, Furusawa Y, Itsukaiche H, Nagasawa H and Moriya H : Effect of reoxygenation on repair of potentially lethal radiation damage in cultured MG-63 osteosarcoma cells. *Rad Res*, 147:179-184, 1997.
- 6) Mitsuhashi N, Ishikawa H, Saito Y, Takahashi T, Sakurai H, Nozaki M, Akimoto T, Hasegawa M : A quantitative study of radiation-induced apoptosis in two rat yolk sac tumour cell lines with different radiosensitivities in vitro. *Anticancer Res*, 1997, 17:3605-3608.

- 7) **Mori K, Hibasami H, Satoh N, Sonoda J, Yamasaki T, Tajima M, Higuchi S, Wakabayashi H, Kaneko H, Uchida A and Nakashima K** : Induction of apoptotic cell death in three human osteosarcoma cell lines by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidinohydrazone)(MGBCP). *Anticancer Res*, 17:2385-2390, 1997.
- 8) **Nagashima T, Yamamuro T, Kotoura Y, Takahashi M, Abe M and Nakashima Y** : Histological studies on the effect of intraoperative irradiation of osteosarcoma. *J J Orth Ass*, 57:1681-1697, 1983.
- 9) **Soldatenkov VA, and Dritschilo A** : Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Res*, 57:3881-3885, 1997.
- 10) **Soldatenkov VA, Prasad S, Notario V and Dritschilo A** : Radiation-induced apoptosis of Ewing's sarcoma cells : DNA fragmentation and proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res*, 55: 4240-4242, 1995.
- 11) **Sugimoto M, Toguchida M, Kotoura Y, Yamamuro T and Uchimi H** : Intrinsic radiosensitivity and PLD repair in osteosarcoma cell lines. *Int J Radiat Biol*, 62: 469-474, 1992.
- 12) **Uyttendaele D, Schryver AD, Claessens H, Roels H, Berkvens P and Mondelaers W** : Limb conservation in primary bone tumors by resection, extracorporeal irradiation and reimplantation. *JBJS*, 70 (B):348-353, 1998.