대 한 골 관 절 종 양 학 회 지
J. of Korean Bone & Joint Tumor Soc.
Volume 5, Number 4, December, 1999

골육종에서 수술 전 항암화학요법에 의한 고사

광주 기독병원 정형외과, 전남대학교 의과대학 병리학교실*

김기수 · 최용수 · 염경성 · 손경선 · 이재혁*

- Abstract -

Preoperative Chemotherapy-Induced Apoptosis in Osteosarcoma

**Ki Soo Kim, M.D., Yong Soo Choi, M.D., Kyung Sung Yeom, M.D.,
Kyung Sun Shon, M.D., Jae Hyuk Lee, M.D.***

*Department of Orthopedic surgery, Kwangju Christian Hospital, Kwangju, Korea
Department of Pathology, Chonnam National University, Kwangju, Korea**

The purpose of this study was to verify the importance of apoptosis in genesis of osteosarcoma and whether apoptosis may play an important role as a predictive factor for the response to chemotherapy. Of the patients who were diagnosed osteosarcoma between January 1995 and June 1999, ten patients were selected. All specimens were obtained before and after preoperative chemotherapy and examined for the occurrence of apoptosis. Apoptosis was investigated by in situ end-labeling technique on paraffin-embedded sections and apoptotic indices were calculated before and after chemotherapy. The ages of ten patients ranged from 15 to 59 with equal sex ratio. All patients completed the planned pre-operative chemotherapy. Apoptosis occurs in osteosarcoma and apoptotic indices are increased after chemotherapy. Mean apoptotic index (AI) before and after chemotherapy were 17.2 (range 6-28.9) and 26.3 (9.6-46.2), respectively. Apoptotic cells were usually present around the necrotic area. The AI was increased as the progression of stage and in responder group more than in non-responder. Apoptosis is induced by pre-operative chemotherapy and the response is variable. Changes in AI levels before and after chemotherapy may possibly predict an individual patient's overall response.

Key Words : Osteosarcoma, Chemotherapy, Apoptosis index

※통신저자 : 최 용 수
광주기독병원 정형외과
광주광역시 남구 양림동 264
Tel : 062) 650-5062, Fax : 062) 650-5066, E-mail : Inok116@unitel.co.kr

* 본 논문의 요지는 1999년 제 18차 대한 골관절 종양학회 추계학술대회에서 구연하였음.

서 론

골육종은 골격성장이 활발한 성장기에 주로 장골 골간단부에 호발하는 원발성 악성 골종양이다. 수술적 단독치료 시 과반수의 환자들에서 사지절단 후 6개월이내에 육안적 전이가 발생하거나 수술적 제거 후 80% 이상의 환자들이 2년내에 재발하여 5년 생존율은 20%에 불과하였다[7,15]. 그러나 1970년대 이후 methotrexate, adriamycin 등을 이용한 보조항암화학요법이 도입되면서 미세전이의 효과적인 예방과 종양세포의 사멸을 일으키게 되면서 환자의 생존율이 크게 향상되었고, 특히 복합화학요법의 시행으로 5년 생존율이 55~75%까지 증가하게 되었다[4,9,13].

1973년 Rosen 등[20]이 처음 항암치료와 병행하는 사지보존술(limb salvage surgery)을 시도한 이후, 최대한 미세전이를 억제하고 치료반응률을 높여 종양크기를 줄이며, 사지보존술 시행에 의한 삶의 질을 향상시키려는 개념에서 수술 전 항암화학요법이 시행되었고, 현재 수술 전 항암화학요법은 골육종의 표준 치료방법으로 자리잡게 되었다. 특히 수술 전 항암화학요법의 시도로 종양세포의 병리조직학적인 괴사정도로서 치료반응을 파악하여 수술 후 보조화학요법의 약제선정에 응용하는 개념도 아울러 발전하게 되었다(***in vivo*** chemotherapy[17]).

최근에 밝혀진 고사(apoptosis)는 생명체의 생명유지에 불필요하거나 위험한 세포를 스스로 죽게 하는 유전자의 제어에 의해 지배되는 계획된 세포 사멸기구로서 종양의 발생과정, 증식억제, 소실과정 및 분화의 유도과정에 관여하는 것으로 알려져 있다[25,26]. 종양에서의 고사는 경도의 허혈이나 대식세포에서 유리된 종양괴사인자, 그리고 항암제 치료에 의해 유도된다고 하며, 특히 항암화학요법에 따른 종양세포의 고사는 세포독성과정을 거쳐 종양 세포를 파괴하거나 약제의 민감성을 증가시키고 일부는 약제에 대한 내성을 가지게 만들기도 한다[1,10,22].

이에 저자는 항암화학요법을 시행한 전후의 골육종 조직에서 종양세포의 사멸과 관계된 고사지수(Apoptotic index; AI)를 알아보고 약물치료 효과를 병리조직학적으로 판정할 수 있는지 확인하고자 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

1995년 1월부터 1999년 6월까지 전남대학교 병원에 내원하여 골육종으로 진단 받은 환자들 중 선정기준에 적합한 10예를 대상으로 하였다. 수술 전 임상적 병기는 병소 부위의 자기공명영상과 동맥조영술, 폐전산화 단층촬영 및 전신 골주사 등을 시행한 후 Enneking[3]이 제시한 기준에 따라 결정하였다. 대상환자들의 선정기준은 과거 항암화학요법이나 방사선 치료를 받은 적이 없고 침생검을 통해 병리조직학적으로 골육종으로 확진된 후 항암화학요법이 시행되고 사지보존술에 의해 술 후 검체의 획득이 가능하였던 골육종 환자들로 간, 골수 및 신장기능이 정상이었던 경우로 제한하였다.

조사가 가능하였던 환자들의 연령분포는 15세에서 59세(평균연령: 24.8세)까지로 10명중 8명이 25세 이하 였으며, 남녀의 비율은 같았다. 골육종이 발생한 부위는 대퇴골 원위부 3명, 경골 근위부 2명, 비골 근위부가 2명으로 대부분이 슬관절 부근에서 발생하였다. 조직학적 유형에 따른 분류결과, 골모세포형이 6예, 연골모세포형이 3예, 그리고 섬유모세포형이 1예로 관찰되었다.

2. 연구방법

1) 방사선학적 검사

환자는 수술 전 항암화학요법 전에 병소부위의 단순 방사선 검사(Fig.1-A)와 흉부 방사선 검사, 병소부위의 전산화 단층촬영, 자기공명영상촬영(Fig.2-A), 동맥조형술, 동위원소검사를 시행하고 수술 전 항암화학약물의 투여 후 환자의 반응정도를 평가하기 위해 다시 병소의 단순 방사선 검사(Fig.1-B), 자기공명영상 촬영(Fig.2-B)을 실시하는 것을 원칙으로 하였다.

2) 임상적 병기의 결정

앞서 기술한 방사선학적 검사를 토대로 Enneking[3]의 방법에 따라 임상적 병기를 결정하였는데 검사결과 IIA가 3예, IIB가 5예, III가 2예로 분류되었다.

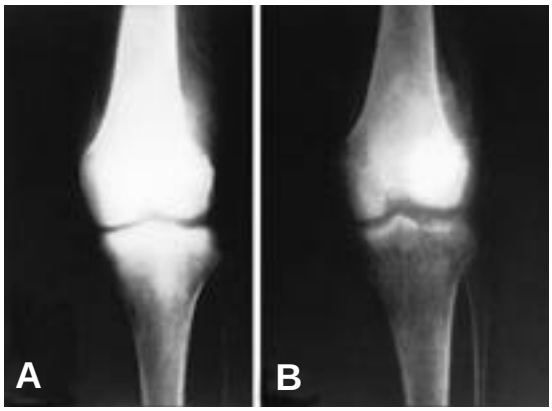

Fig. 1-A, B The simple X-ray shows irregular radio-opaque density, cortical destruction, and soft tissue extension before (A) and after (B) chemotherapy.

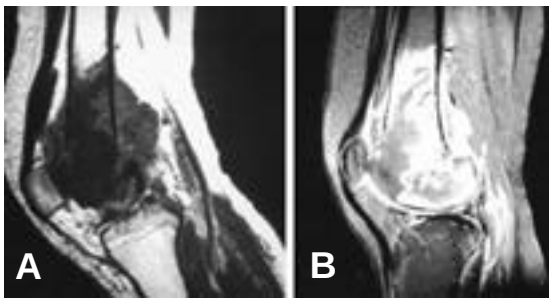

Fig. 2-A, B MRI shows decreased tumor size and peri-tumoral edema before (A) and after (B) chemotherapy.

Fig. 3 Gross photograph shows extensive necrosis, destruction of cortical bones, and viable tumor mass in adjacent soft tissues after chemotherapy.

3) 환자의 수술 전 항암화학요법

환자의 수술 전 화학요법은 Rosen의 T10 protocol[20]을 변형하여 수술 전 고용량의 methotrexate (8-12g/m²)를 citrovorum rescue factor 용법과 병행하여 2회 반복투여하고 cisplantin(100mg/m²) 및 adriamycin(60mg/m²)을 정주하였다. 그리고 상기 약물치료를 2회 반복 실시하는 것을 원칙으로 시행하였다.

4) 수술 전 항암화학요법에 의한 병리조직학적 치료효과의 판정

수술 전 항암화학요법의 임상적 효과판정은 WHO 기준[16]에 의하여 결정하였다. 병리조직학적인 괴사정도는 Huvos 등[8]이 제시한 기준으로 판정하였다 (Fig. 3). 골아세포의 소실, 소강의 확장 및 골세포의 소실, 골세포 간질의 염색상이 감소되는 소견이 있으면서 골수 간질세포의 잔해로 보이는 세포가 남아있거나 육아조직의 증가가 관찰되는 경우를 괴사로 판정하였다. 이와 같이 조직에서 괴사의 정도를 판정하여 조직학적 등급 I은 50%미만의 조직괴사가 관찰될 때, 등급 II는 50~90%, 등급 III은 90%이상의 종양세포 들에서 괴사가 관찰될 때로 정하였으며 종양이 모두 괴사되어 살아있는 종양세포가 관찰되지 않는 경우를 등급 IV로 분류하였다. 그리고 등급 I과 II의 괴사를 보이는 환자들을 비반응군(non-responders)으로, 등급 III 및 IV를 보이는 환자군을 반응군(responders)으로 재분류하였다.

5) 종양세포의 고사를 관찰하기 위한 *in situ* end-labeling 법

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 이용하여 표지된 nucleotide를 linker DNA의 단절에 의해 노출된 3' 말단에 붙이는 end-

labeling법[5]에 따라 조직구조를 유지한 상태에서 DNA 단절을 관찰하였다. Probe on 슬라이드에 두께 5 ㎛로 박절된 조직절편을 탈파라핀과 함수과정을 거쳐 20㎍/㎖의 proteinase K (Sigma) 용액에 실온에서 15분간 반응시켜 DNA를 노출시키고 2% 과산화수소 용액에 실온에서 5분간 작용시켜 내재성 peroxidase의 활성을 억제하였다. 조직을 TdT 효소와 digoxigenin-11-dUTP와dATP 혼합용액(Oncor)에 37 C에서 2시간 반응시킨 후 peroxidase가 부착된 항digoxigenin항체를 37 C에서 1시간 작용시켰다. PBS (phosphate buffered saline)로 세척한 후 부착된 peroxidase를 0.02% 과산화수소와 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma)의 혼합액으로 갈색의 산화 DNA침전물을 만들었고 hematoxylin으로 대조염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 위양성반응을 배제하기 위해 TdT 대신 PBS용액을 작용시킨 대조표본을 만들어 음성반응을 확인하였다. 염색결과 각각의 예에서 고사지수(apoptotic index, AI)를 산정하였는데 비특이적으로 약한 염색상을 보인 핵들은 제외하고 강하게 염색된 종양세포의 핵들만을 대상으로 삼았다. 고사지수는 최소1,000개의 종양세포 중에서 양성반응을 보인 고사세포수와 고사체를 산정하여 표시하였다.

6)통계학적 분석

각각의 환자들에서 항암화학요법을 시행한 전후의 고사지수 변화를 알아보고자 Wilcoxon의 부호순위 검정방법을 이용하여 유의성을 검증하였다. 또한 임상적 병기, 조직학적 유형 및 치료에 대한 반응여부와 고사지수간이 관계를 알아보기 위해 Wilcoxon의 순위합 검정방법을 사용하였는데 이러한 검정방법들은 모두 SAS 통계프로그램을 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 수술 전 항암요법에 따른 병리조직학적 효과판정

수술 전 항암화학요법에 대한 병리조직학적 괴사의 정도를 수술 후 검체에서 조사한 결과 등급 II가 6예, 등급 III이 3예, 등급 IV가 1예로 확인되었다. 이들을 반응군(responder)과 비반응군(non-responder)으로 재분류하여 보면 반응군이 4예, 비반응군이 6예로 조사되었다.

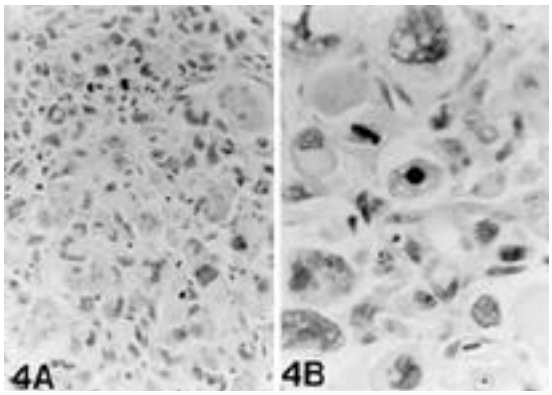

Fig. 4-A, B Apoptotic cells are characterized by pyknotic nuclei surrounded by shrunken cytoplasm and separated from surrounding cells by halo (A,B). H&E × 200 (A) × 600 (B).

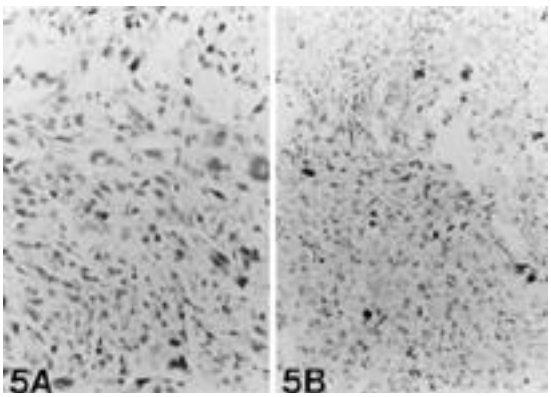

Fig. 5-A, B In situ end-labeling (ISEL) demonstrate in both apoptotic cells and scattered apoptotic bodies (A, B). A: low apoptotic index case, B: high apoptotic index case. ISEL × 250 (A) × 200 (B).

2. 항암요법 전후에 관찰되는 고사세포수

통상적인 헤마톡실린-에오신 염색에서 고사세포는 세포질의 응축과 염색체의 농축으로 주위 종양세포와 떨어져 있으며 산발적인 분포의 양상을 보였다 (Fig. 4-A,B).

In situ end-labeling 결과, 골육종에서 고사세포는 주로 신생 종양유골주위나 괴사부위에 인접하여 흔히 관찰되었으며, 특히 연부조직내로 침윤된 종양의 변연부를 따라 자주 출현하였다. 수술 전 화

학요법이 시행되기 전의 평균 고사지수는 17.2(6-28.9)였고, 항암화학요법이 시행된 후의 조직에서 관찰된 평균 고사지수는 26.3(9.6-46.2)로, 항암화학요법의 시행과 관련하여 고사지수는 통계학적으로 의미있게 증가하였다(p=0.003)(Fig. 5-A,B).

병기에 따른 고사지수를 조사한 결과 항암요법전 평균 고사지수는 병기 IIA가 14.6, 병기 IIB가 17.0, 병기 III가 21.8였으며 항암요법후의 평균 고사지수는 병기 IIA가 20.1, 병기 IIB가 23.1 병기 III가 42.4로 수술전후에 관계없이 병기가 높아갈수록 다소 증가하는 경향을 보였다(p=0.0941). 조직학적 유형별로 관찰한 치료전후의 평균고사지수는 골모세포형의 경우 18.3과 30.3, 연골모세포형의 경우 11.1과 14.6, 그리고 섬유모세포형의 경우 각각 28.9와 39.0으로 관찰되어 골모세포형과 섬유모세포형에서 비교적 높게 관찰되었고 연골모세포형에서 낮은 경향을 보였다(p=0.2293). 조직학적 괴사정도에 따른 항암화학요법의 효과판정 결과, 반응군(4예)의 경우 항암치료전후의 평균 고사지수는 19.7과 30.4이었고 비반응군(6예)에서는 수술전후의 평균 고사지수가 15.6과 23.9로 나타나 반응군들에서 고사지수가 비교적 높게 관찰되었으나 통계학적인 의의는 없었다(p=0.8312)(Table 1, Fig.6).

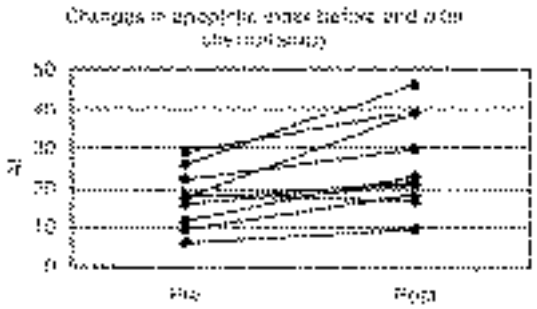

Fig. 6 Changes in apoptotic index before and after chemotherapy. Pre; Preoperative Chemotherapy. Post; Postoperative chemotherapy. AI; Apoptotic index.

고 찰

골육종치료에서 수술 전 항암화학요법은 항암제의 투여로 미세전이를 예방하고 수술 전 화학요법에 대한 종양의 반응을 미리 알아 수술 후에 적절한 항암제를 선택하여 사용할 수 있게 한다. 또한 종양의 크기를 감소시킴으로써 수술 후 국소재발을 방지하고 사지보전술을 용이하게 하여준다. 이러한 골육종에 대한 수술 전 항암화학 약물치료 효과로 인해 골육종환자의 5년 생존율은 수술적 치료만 시행했을 때의 5~20%이지만 Rosen 등[20]은 T10 protocol을 사용하여 고용량 methotrexate, cisplantin, adriamycin 등을 투여하여 5년 생존율이 80%임을 보고한 바 있고, 국내에서도 강 등[11]이 44~68%의 5년 생존율을 보고하여 현저히 향상되었음을 알 수 있었다.

최근 항암제의 투여로 인한 종양세포의 사멸과정에서 고사의 중요성이 강조되고 있으며 이러한 고사의 형태학적 특징으로 세포질의 농축, 원형질막의 미세섬모의 소실, 핵의 농축과 분쇄 및 고사체의 형성 등인

Table 1. Osteosarcoma cases characteristics and results

Case	Sex/age	Site of the primar tumor	Stages	Pathologic Dx*	Histologic Response	Pre-AI†	Post-AI‡
1	F/15	Femur	IIB	Chondroblastic OS	II(non-responder)	9.3	18
2	F/17	Femur	IIB	Osteoblastic OS	IV(responder)	17.2	21.6
3	F/19	Femur	III	Osteoblastic OS	III(responder)	25.9	46.2
4	M/22	Femur	IIB	Fibroblastic OS	II(non-responder)	28.9	39
5	F/59	Fibula	IIA	Chondroblastic OS	II(non-responder)	6	9.5
6	M/19	Fibula	IIB	Osteoblastic OS	II(non-responder)	11.4	23.1
7	M/24	Tibia	IIA	Osteoblastic OS	II(non-responder)	15.5	21
8	M/15	Tibia	IIB	Chondroblastic OS	III(responder)	18	16.3
9	M/30	Humerus	III	Osteoblastic OS	III(responder)	17.7	38.5
10	F/23	Calcaneus	IIA	Osteoblastic OS	II(non-responder)	22.2	29.7

*Dx, Diagnosis; †Pre-AI, Pre-operative apoptotic index; ‡Post-AI, Post-operative apoptotic index

데 통상의 헤마톡실린-에오신 염색을 통한 광학현미경으로는 관찰하기가 어렵다. 본 실험에서 이용한 ***in situ*** end-labeling법은 세포질과 염색질 농축과 같은 고사의 형태학적 특징이 보이지 않는 초기단계의 고사세포들을 포함한 DNA의 단절이 있는 고사세포만을 선택적으로 관찰할 수 있는 예민한 방법으로 고사지수의 객관적인 측정에 널리 이용되고 있다. 방광암[12]과 유방암 환자[2]의 항암치료시 관찰되는 종양세포의 고사는 항암제 투여 후 8시간에서 출현하기 시작하여 12~24시간에 최고에 다다르고 48시간 이후에는 관찰이 되지 않는다고 하였다. 생체외 실험에 비해 생체내에서의 고사는 특정시기에 소수의 세포들만 고사의 과정에 들어가기 때문에 이러한 고사세포를 관찰하기 위해서는 일정한 시간 간격을 두고 반복 생검을 실시하는 것이 일반적이다[10]. 하지만 본 실험의 골육종 환자들은 모두 항암제 투여 2주후에 수술이 시행된 경우로 수술조직에서 관찰되는 고사세포가 항암제효과와 무관한 소견으로 볼 수있다. 그러나 생체내에서 고사는 역동적인 과정이기 때문에 종양세포의 감수성이나 항암제의 투여방법, 기간, 용량 및 혈중 농도 등에 따라 달리 출현한다는 보고 등[10]으로 미루어 보아 항암제 투여 이후에도 관찰될 수 있다고 생각된다.

대부분의 항암제는 빠르게 분열하는 종양세포들의 DNA에 손상을 주어 종양세포를 파괴하는데[21] 골육종의 경우 종양의 변연부나 종양유골의 주변에서 활발한 세포증식을 보인다. 따라서 ***in situ*** end-labeling 결과 고사세포들이 이러한 부위에서 흔히 관찰되었으며 괴사의 주변에서도 많은 고사세포와 고사체를 확인할 수 있었다.

골 종양의 치료에 있어 중요한 장애요인으로 항암제에 대한 내성이 있다[6,24]. 이를 극복하려는 시도로 생체외 항암제 감수성 조사 등 여러 방법들이 시도되고 있으나 검사의 부정확성과 기술적인 제약으로 인해 임상적용에 부적절하였다. 수술 전 약물요법의 중요한 장점중의 하나는 수술 후 종양조직에서 생체내 항암제 감수성 검사가 가능하다는 사실이다. Huvos 등[23]도 수술 전 약물요법후 비반응군 환자들에서 수술 전 투여하지 않았던 항암제를 병용하는 방법으로 비반응군의 생존율를 증가시켰다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 이들 보고에 근거하여 수술전 약물요법후 종양조직의 병리학적 괴사정도에 따라 환자를 반응군과 비반응군으로 분류하고 각각의 군들에서 고사지수를 조사한 결과, 반응군(4예)의 경우 수술전후의 평균 고사지수는 19.7과 30.4이었고 비반응군(6예)에서는 수술전후의 평균 고사지수가 15.6과 23.9로 나타나 비록 통계학적 의의는 없었지만 반응군에서 고사지수가 높게 관찰되었다. 이러한 결과는 조사대상으로 삼았던 대상의 수가 많지 않았기 때문으로 생각되었다.

본 연구결과 병리조직학적인 괴사정도와 고사지수가 비교적 일치하는 경향을 보여 약물치료에 대한 수술 후 고사지수가 반응군에서 비반응군에 비해 증가하였다. 또한 수술 전 항암제 투여후 얻은 검체에서의 평균 고사지수가 26.3으로 투여전의 17.2에 비해 통계학적으로 의의있게 증가하였다.

항암제 치료후 고사지수의 증가를 보였던 대부분의 증례들과 달리 증례 8의 경우 항암치료 전에 비해 치료후에 오히려 고사지수가 감소하였는데, 항암제 자체가 p53의 돌연변이나 bcl-2 유전자의 과발현과 같이 고사를 억제하는 방향으로 유전자의 돌연변이를 일으킴으로써 종양세포가 약제의 내성을 가지게 되는 요인으로 작용할 수 있을 것으로 생각된다[10,21].

항암제에 의한 고사의 기전은 많은 유전자와 유기적인 복잡한 관계를 보이지만 주로 p53, myc과 같은 종양억제 유전자의 돌연변이나 종양유전자의 발현 및 증폭으로 인한 bax나 fas의 증가 및 bcl-2의 억제 등으로 설명하고 있다[4,18,19]. 따라서 본 실험에서처럼 고사만을 관찰함으로써 항암제의 효과를 판정하려는 시도는 한계를 지닐 수 밖에 없었다. 하지만 추후 종양세포의 고사와 함께 이러한 유전자들의 발현을 규명함으로써 항암제들이 종양세포의 고사에 미치는 영향을 보다 자세히 알 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험 결과, 항암화학요법에 의한 종양세포의 사멸은 괴사 뿐만 아니라 고사의 과정을 거쳐 발생하는 것으로 추정되었으며 종양내에서 관찰되는 고사세포수와 임상적 예후와는 밀접한 관련이 있을 것으로 보이나 이는 더 많은 환자들의 추적관찰을 통해 연구되어야 할 것으로 생각되었다.

결 론

항암화학요법에 대한 종양세포의 고사와 그 의미를 알아보고자 수술적 근치수술전 항암화학요법을 받았던 10명의 골육종 환자들의 파라핀 포매괴

(paraffin block)를 대상으로 하여 ***in situ*** end-labeling 결과, 골육종에서 고사세포는 주로 신생 종양유골주위나 괴사부위에 인접하여 흔히 관찰되었으며, 특히 연부조직내로 침윤된 종양의 변연부를 따라 자주 출현하였다. 조직학적 유형에 따른 고사지수는 골모세포형과 섬유모세포형에서 비교적 높게 관찰되었고 연골모세포형에서 다소 낮은 경향을 보였다. 수술 전 화학요법이 시행되기 전의 평균 고사지수는 17.2이였고, 항암화학요법이 시행된 후의 조직에서 관찰된 평균 고사지수는 26.3으로, 항암화학요법의 시행과 관련하여 고사지수는 통계학적으로 의의있게 증가하였다($p<0.05$). 이상의 성적으로 보아 항암화학요법에 의한 종양세포의 사멸은 괴사 뿐만 아니라 고사의 과정을 거쳐 발생하는 것으로 추정되었으며 종양내에서 관찰되는 고사세포수와 임상적 예후와는 밀접한 관련이 있을 것으로 보이나 이는 더 많은 환자들의 추적관찰을 통해 연구되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1) **Chresta CM and Hickman JA** : Apoptosis: its relevance to carcinogenesis and anti-tumour drug sensitivity. *Urol Res*, 27: 1-2, 1999.
2) **Ellis PA, Smith IE, McCarthy K, Detre S, Salter J and Dowsett M** : Preoperative chemotherapy induces apoptosis in early breast cancer. *Lancet*, 349: 849, 1997.
3) **Enneking WF, Spanier SS and Goodman MA** : A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop*, 153: 106-120, 1980.
4) **Ettinger LJ, Douglass HO Jr and Higby DJ, et al** : Adjuvant adriamycin and cis-diamminedichloroplatinum in primary osteosarcoma. *Cancer*, 47: 248-254, 1981.
5) **Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA** : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119:493-501, 1992.
6) **Glasser DB, Lane JM, Huvos AG, Marcove RC and Rosen G** : Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma: the Memorial Hospital experience. *Cancer*, 69:698-708, 1992.
7) **Hudson M, Jaffe MR, Jaffe N, et al** : Pediatric osteosarcoma : Therapeutic strategies, results, and prognostic factors derived from a 10-year experience. *J Clin Oncol*, 8:1988-1997, 1990.
8) **Huvos AG, Rosen G and Marcove RC** : Primary osteogenic sarcoma: Pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy, en Bloc resection and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med*, 101: 14-18, 1977.
9) **Jaffe N, Frei E 3d, Traggis D and Bishop Y** : Adjuvant methotrexate and citrovorum factor treatment of osteogenic sarcoma. *N Engl J Med*, 291: 994-997, 1974.
10) **Kamesaki H** : Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol*, 68: 29-43, 1998.
11) **KangYK, Kim HM, Rhee SK, Woo YK, Kim JM and Kim HK** : Clinical results of neo-adjuvant chemotherapy and surgery on osteosarcoma. J of Korean Bone Joint Tumor Soc, 2: 27-32, 1996.
12) **Kelly JD, Williamson KW, Irvine AE, et al** : Apoptosis and its clinical significance for bladder cancer therapy. *Br J Urol*, 83:1-10, 1999.
13) **Link MP, Goorin AM, Horowitz M, et al** : Adjuvant chemotherapy of high grade osteosarcoma of the extremity: Updated results of the multi-institutional osteosarcoma study. *Clin Orthop*, 270: 8-14, 1991.
14) **Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE** : p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxity of anticancer agents. *Cell*, 74: 957-967, 1993.
15) **Marcove RC, Mike V and Hajek JV, et al** : Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one: A review of 145 operative cases. *J Bone Joint Surg*, 52-A: 411-423, 1970.
16) **Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M and Winkler A** : Reporting results of cancer treatment. *Cancer*, 47:207-214, 1981.
17) **Picci P, Sangiorgi L, Rougraff BT, Neff JR, Casadei R and Campanacci M** : Relationship of chemotherapy-induced necrosis and surgical margins to local recurrence in osteosarcoma. *J Clin Oncol*, 12: 2699-2705, 1994.
18) **Pompetti F, Stuppia L, Gatta V, et al** : Correlation between apoptosis and TP53 status in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 105: 177-181, 1998.
19) **Posl M, Amling M, Werner M, et al** : Osteosarcoma-apoptosis and proliferation. Study of bcl-2 expression. *Pathologe*, 15(6): 337-44, 1994.
20) **Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nivenberg A, Kosloff C and Huvos AG** : Primary osteogenic sarcoma: The rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*, 43: 2163-2177, 1979.
21) **Schmitt CA and Lowe SW** : Apoptosis and Therapy.

J Pathol, 187: 127-137, 1999.

22) **Sen S, D'Incalci M** : Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett*, 307:122-127, 1992.

23) **Smith J, Heelan RT, Huvos AG, et al** : Radiologic changes in primary osteogenic sarcoma following intensive chemotherapy: Radiological-pathological correlation in 63 patients. *Radiology*, 143: 355-360, 1982.

24) **Taylor WF, Ivins JC, Unni KK, Beabout JW, Golenzer HJ and Black LE** : Prognostic variables in osteosarcoma: A multi-institutional study. *J Natl Cancer Inst*, 81: 21, 1989.

25) **Williams GT** : Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65:1097-1098, 1991.

26) **Wyllie AH** : What is apoptosis. *Histopathology*, 10: 995-998, 1986.