

한국산 생약으로부터 항암물질의 개발 (제 9보). 비색분석법에 의한 포공령 추출물의 항암평가

한두석 · 이명호 · 최규은¹ · 백승화^{1,*}

원광대학교 치과대학 구강해부학교실

¹*자연과학대학 화학과

(1998. 3. 3 접수)

Development of Anticancer Agents from Korean Medicinal Plants. Part 9. Antitumor Evaluation of *Taraxaci Herba* Extracts by Colorimetric Methods.

Du Seok Han, Myoung Ho Lee, Kyw Eun Choi¹ and Seung Hwa Baek^{1,*}

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry

¹Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT : In the present study, we have evaluated cytotoxic effects of *Taraxaci Herba* extract in human oral epitheloid carcinoma cells. An antitumor activity was measured by colorimetric assays using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and sulforhodamine protein B (SRB). The light microscopic study showed morphological changes, Ag-NOR (argyrophylic nucleolar organizer region) number and PAS positive reaction of the treated cells. These results obtained are as follows : MTT and SRB quantities were significantly decreased in cultured KB cells treated with 10^{-2} mg/ml and 10^{-3} mg/ml concentrations. The number of Ag-NORs were significantly decreased in cultured KB cells treated with 10^{-2} mg/ml and 10^{-3} mg/ml concentrations and the rate of Ag-NORs was shifted to left side (one Ag-NOR/nucleus was increased and five Ag-NORs/nucleus were decreased) by the high concentration. PAS reaction of cultured KB cells treated with 10^{-2} mg/ml and 10^{-3} mg/ml concentrations was negative. These results suggest that *Taraxaci Herba* retains a potential antitumor activity.

Key words : *Taraxaci Herba*, MTT assay, SRB assay, PAS reaction, Ag-NOR, Antitumor activity.

서 론

구강암은 인체에서 발생하는 전체 암종의 5%를 차지하며 이 중 90%이상은 편평세포암종이다. 구강암의 원인은 아직까지 명백하게 밝혀지지 않았으나 흡연, 음주, 부적절한 보철물, 바이러스 감염 및 전신질환 등이 요인으로 보고되었고(Binnie 등, 1983), 구강편평상피세포암종으로 확진을 받은 환자들의 예후는 나빠서 3년 생존율은 43.5%이고 5년 생존율은 26.1%였다고 우리나라에서 보고하였다(정인교 등, 1996).

포공령(*Taraxaci Herba*)은 민들레(*Taraxacum mongolicum* H. Mazzetti)의 한방 명으로서 국화과(Compositae)에 속하며, 전국 산야에 분포하는 다년생 초본으로서, 최근에 Chen (1990)은 만성 B형 간염에 치료효과가 있다고 보고하였고, Zheng (1990)은 herpes simplex virus에 대한 항바이러스 작용(antiviral action)이 있다고 보고하였으며, Liu(1992)등은 intestinal metaplasia와 위점막의 atypical hyperplasia의 치료에 효과가 있다고 보고하였다. 우리나라에서도 이(1993)등은 포공령의 수층분획이 위점막 보호작용과 pepsin의 활성감소에

*To whom correspondence should be addressed.

의한 항위염작용이 있다고 보고하였다.

천연물에서 분리하는 추출물이나 분획 및 화학요법제들의 세포독성에 대한 1차 검색에는 비색법을 다양하게 이용하고 있고(Alley *et al.*, 1992, Borenfreund *et al.*, 1984, Carmichael *et al.*, 1987, Mosmann *et al.*, 1983, Skehan, *et al.*, 1988, Takahashi, *et al.*, 1987), 최근에는 Ag-NOR(aryrophylic nucleolar orgnizer region) 염색방법은 국내외에서 몇몇 장기질 환이나 중앙세포에서 Ag-NOR 수를 산정하여 세포증식에 대한 지표로 응용하고 있으며(Egan, *et al.*, 1988, Howat, *et al.*, 1988, Kim, *et al.*, 1989), 암세포의 전이에 관여하는 세포의 기질단백량을 검색하는 방법들도 이용되고 있다(정병욱 등, 1997).

본 연구는 항암성분인 terpene 성분이 함유되어 있는 포공령 으로부터 물추출물을 조제하여 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후, 1차 검색방법인 비색정량방법 중 가장 민감하고 안정적인 방법인 MTT정량 분석법과 SRB정량 분석법을 이용하여 세포의 활성을 측정하였고, Ag-NOR 염색방법을 이용하여 Ag-NOR 수를 산정하여 세포증식에 미치는 영향을 확인하였으며, 단백질합성을 분석하기 위하여 PAS염색을 실시하여 PAS반응 정도를 확인하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 포공령은 원광대학교 한방병원에서 구입하여 외부형태를 비교 조사하여 확인 후 사용하였다. 실험에 사용된 식물체는 원광대학교 자연과학대학 천연물화학고실에 보관되어 있다.

1) 검액조제

본 연구에 사용한 포공령은 원광대학교 한방병원에서 구입하여, 그늘에서 말린 포공령을 정선하고 조말하여 약 600 g을 평량한 후, 2개의 3000 ml 등근 플라스크에 1차 증류수 1500 ml과 포공령 300 g씩 넣고 100°C에서 3시간 동안 물증탕하여 환류추출하였다. 이와 같이 3번 반복하여 얻은 추출액을 0.45 µm 필터로 여과한 후 여과액을 50°C에서 감압농축시킨 후 동결건조하였다. 건조된 양은 약 50 g정도 얻을 수 있었다. 추출액은 실험직전에 생리식염수로 용해시켜 사용하였다.

2) 시약

세포배양에 사용한 RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT정량, 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

3) 실험기기

세포의 배양은 CO₂ incubator(Shellab Co., USA)를 사용하였고, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 사용하였으며, 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus)을 사용하였다. MTT정량 및 SRB정량은 ELISA reader(Spectra Max 250, U.S.A)를 사용하였다.

실험방법

1) 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4°C냉장고에 저장하였다가 사용직전에 배지로 희석하여 실험에 사용하였다.

2) 세포배양

항암작용을 측정하기 위하여 서울대학교 암연구소에서 분양 받은 인체 구강유상피암종세포(ATCC No, OCL17)를 사용하였다. 인체 구강유상피암종세포는 RPMI-1640(Gibco, U.S.A)에 10% fetal bovine serum(Gibco, U.S.A)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml)를 첨가하여 사용하였다.

각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO₂ incubator, Shellab, U.S.A)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여, Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 2×10⁴ cells/ml 되도록 세포부유액을 만들었다.

3) MTT정량분석법

Mosmann의 방법(1983)에 의하여, 각 well에 4×10⁴ cells을 넣고, 동시에 포공령의 물추출물 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온방치하여 MTT formazan을 용해한 후, ELISA reader(520 nm, Spectra Max 250, USA)로 MTT의 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

4) Ag-NOR검사

6 well plates의 각 well에 8×10⁴ cells을 넣고, 동시에 포공령의 물추출물 10⁻²~10⁻⁶ mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 커버글라스에 부착된 세포를 인산완충액으로 세척하였고, 10% formalin용액으로 10분간 고정된 후 증류수로 수세하고 alcohol 및 증류수에서 함수시킨 후, 1% formic acid 용액에 gelatin을 2%가 되도록 녹인 용액과 50% sliver nitrate수용액의 비율이 1:2가 되도록 섞어 만든 은 콜로이드용액에 넣어 실온 암소에서 30분간 반응시킨 후 증류수로 수세하고 탈수시켰다. 염색된 커버글라스를 유리슬라이드의 정위치에 놓고 cannada balsam으로 봉인한 표본을 광학현미경(BH-2, Olympus, Japan) 유침렌즈하에서 암세

포에 나타난 핵중 100개를 임의로 선정하여, 개개의 세포핵 내에서 진하게 갈색으로 염색된 Ag-NOR의 수를 세어 통계처리 하였다.

5) SRB정량분석법

kehan *et al.*의 방법 (1988)에 따라 세포를 포공령의 물추출물 10^{-2} ~ 10^{-6} mg/ml 농도가 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 배양액을 버리고 5회 세척한 후 0.4% sulforhodamine B protein (SRB)를 200 μ l씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음, 1.0% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM Tris base[tris(hydroxymethyl)aminomethane]로 결합된 protein stain을 녹인 후, ELISA reader(520 nm, Spectra Max 250, USA)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

6) PAS stain

커버글라스에 부착된 세포를 인산완충액으로 세척하였고, 10% formalin에 10분간 고정하였다. 그 후 증류수로 수세하여 periodic acid에 2분간 처리하였고, 증류수로 잘 세척해 schiff 용액에서 8분간 반응시켰다. 5-10분간 흐르는 물로 수세한 다음, 핵을 구분하기 위하여 harris's hematoxylin에 2분간 대조 염색한 후, 탈수과정을 거쳐 canada balsam으로 봉입하여 광학현미경(BH-2, Olympus, Japan)적으로 관찰하였다.

7) 통계처리

실험결과와 통계처리는 Student's t-test에 준하였고, P-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

암 치료제의 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이기 위하여, 생약으로부터 항암물질을 개발하기 위한 노력이 계속되고 있다. 본 연구도 그 일환으로 항암활성물질로 알려진 terpene 화합물이 함유되어 있는 것으로 알려진 포공령으로부터 물추출물을 조제하여 인체 구강유상피암세포에 적용한 후, 1차 검색방법인 비색법중 가장 민감하고 안정적인 방법인 MTT정

량분석법과 SRB정량분석법을 이용하여 암종세포의 활성을 측정하고, 암종세포증식의 지표가 되는 Ag-NOR 수를 산정하였으며, 단백질성능을 간접적으로 분석하기 위하여 PAS 염색을 실시한 결과 Table 1-3과 같다.

MTT 정량분석법

MTT 분석법에 의한 실험결과는 Table 1에서 보는 바와 같이, 포공령의 물추출물 10^{-2} mg/ml농도에서 10^{-4} mg/ml농도까지 MTT량이 유의하게 감소하였으나, 10^{-5} mg/ml농도와 10^{-6} mg/ml농도에서는 MTT량이 증가하여 농도가 증가함에 따라 항암활성이 강한 것으로 나타났다.

Ag-NOR 검사

Ag-NOR 염색방법에 의하여 염색한 후, 즉시 핵내 Ag-NOR 수를 산정하여 통계처리한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이, 포공령 물추출물 10^{-2} mg/ml농도에서 Ag-NOR 수가 유의하게 감소하였으며, 농도를 희석 시킴에 따라 Ag-NOR 수는 증가하여 포공령 물추출물 10^{-5} mg/ml농도에서는 대조군의 수와 거의 일치하였다. 핵내 Ag-NOR 수의 분포 비율은 10^{-2} mg/ml농도에서 1개인 경우가 대조군에 비하여 증가한 반면 5개인 경우는 대조군에 비하여 현저히 감소하였으며, 농도를 희석시킴에 따라 1개인 경우는 감소하고 5개인 경우는 증가하여 10^{-5} mg/ml농도에서는 대조군과 거의 일치하는 경향이었다.

SRB 정량분석

핵소체 형성부위는 rRNA의 전사활동 증가시 은콜로이드에 염색되므로 이와 관련된 단백질들의 존재를 간접적으로 확인할 수 있어, 핵내의 단백질인 sulforhodamine B protein 양을 측정하는 방법인 SRB 정량분석법을 이용하여 SRB량을 측정 한 결과, Ag-NOR 수의 증감과 일치하는 결과를 얻었다. Table 3에서 보는 바와 같이 SRB량은 포공령 물추출물 10^{-2} mg/ml농도와 10^{-3} mg/ml농도에서 유의하게 감소하였으며 농

Table 1. The MTT absorbance of Taraxaci Herba on Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells

Group Concentration (mg/ml)	MTT quantity	
	Mean \pm S.D. ^a	% of Control
Control	4.06 \pm 0.15	100.0
10^{-2}	2.95 \pm 0.47**	72.7
10^{-3}	3.14 \pm 0.70*	77.3
10^{-4}	3.27 \pm 0.37**	80.6
10^{-5}	3.89 \pm 0.28	95.6
10^{-6}	4.04 \pm 0.22	99.4

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvered with Trypsin-EDTA.

Significantly different from the control value: *P<0.05, ***P<0.001

a) The values represent the mean \pm standard deviations for triplicate experiments.

Table 2. Number and Distribution of Ag-NOR per Nucleus in Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells

Group	Concentration (mg/ml)	Ag-NOR/Nucleus mean ± S.D. ^a	Ag-NOR (%)				
			1	2	3	4	5
Control		3.51 ± 0.98	2.47	12.04	29.46	27.74	29.03
10 ⁻²		2.57 ± 0.24*	7.69	28.21	36.54	17.95	9.62
10 ⁻³		2.83 ± 0.21	5.42	23.83	33.57		9.03
10 ⁻⁴		3.21 ± 0.10	2.22	13.33	26.67		26.67
10 ⁻⁵		3.32 ± 0.54	2.36	12.05	32.51	26.64	26.50

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvered with Trypsin-EDTA.

Significantly different from the control value: *P < 0.05.

a) The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments.

도를 회색시킴에 따라 SRB량이 증가하였다.

세포의 광학 현미경적 관찰

인체 구강유상피암종세포를 24시간 배양하면 well 바닥에 뚜렷한 핵을 갖는 방추형으로 단층을 이루며, 48시간 배양하면 여러형태의 세포들이 층을 이루며, Ag-NOR 염색과 PAS 염색을 위하여 커버글라스를 well 바닥에 넣고 배양하면 세포의 증식 속도가 느려 48시간 배양후 단층을 이루었다.

포공령 물추출물을 농도별로 첨가하여 배양하면 10⁻³ mg/ml 농도에서 보는 바와 같이 세포수는 감소하고, 세포형태는 원형으로 변형되며 세포들이 서로 응집하는 경향이었으나, 10⁻⁵ mg/ml 농도에서는 대조군과 유사한 형태를 관찰 할 수 있었다. Ag-NOR 염색에 있어서도 10⁻³ mg/ml 농도에서 보는 바와 같이 세포수가 감소하고, 핵내 핵소체 형성부위의 수도 감소하였으나 10⁻⁵ mg/ml 농도에서는 대조군과 거의 일치하였다. 당단백질량을 확인할 수 있는 PAS 염색을 실시하면 대조군에서는 세포질내에 PAS 양성반응이 뚜렷하고, 핵주위에는 더욱 뚜렷하며 일부 세포에서는 염색액이 뭉치는 경향이 있으나, 포공령 물추출물 10⁻² mg/ml 농도와 10⁻³ mg/ml 농도를 처리한 군에서는 PAS 음성반응이 나타나고 10⁻⁵ mg/ml 농도에

서는 다시 PAS 양성반응이 나타났다.

본 연구에서는 포공령으로부터 조제한 물 추출물이 인체구강유상피암종세포에 나타내는 항암 활성 기전을 밝히기 위하여, 단백질 합성에 직접 관여하는 핵소체 형성부위(Ag-NOR)와 암세포의 부착능과 전이작용에 간접적으로 관여하는 것으로 알려진 당단백질을 측정하기 위하여 PAS 염색을 실시하였으며, 본 실험의 결과는 포공령으로부터 조제한 물 추출물을 회색하여 농도별로 인체구강유상피암종세포에 적용한 결과 농도가 증가할수록 Ag-NOR 수는 대군에 비하여 감소하였고, Ag-NOR 수의 분포 비율은 농도가 증가할수록 1개인 경우는 증가하고, 5개인 경우는 감소하여 포공령 추출물에는 핵소체 형성부위 형성을 억제하는 물질이 함유되어 있는 것으로 추측할 수 있으며, Ag-NOR 수의 감소는 SRB량의 감소를 일으켰을 것으로 추측할 수 있다. 한편 당단백은 대표적인 세포의 기질 단백질 fibronectin의 구성성분이고, 세포내 fibronectin의 생성의 증가는 세포외로의 분비를 증가시킬 것이며, 세포외로 분비된 fibronectin은 암세포의 부착능과 전이능력을 증가시킨다 (Nakamura, et al., 1991). 이와 같은 기전을 염두에 두고 PAS 염색을 실시한 결과, 대조군의 인체 구강유상피암종세포 내에서는 PAS 양성반응이 강하게 나타나고, 포공령의 물추출

Table 3. The SRB absorbance of *Taraxaci Herba* on Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells

Group	Concentration (mg/ml)	SRB quantity	
		Mean ± S.D. ^a	% of Control
Control		2.42 ± 0.11	100.0
10 ⁻²		1.93 ± 0.15***	79.8
10 ⁻³		2.24 ± 0.08*	92.5
10 ⁻⁴		2.31 ± 0.06	95.3
10 ⁻⁵		2.32 ± 0.08	95.9
10 ⁻⁶		2.43 ± 0.23	100.5

Cells were incubated for 48 hrs. The cells were harvered with Trypsin-EDTA.

Significantly different from the control value: *P < 0.05, ***P < 0.001

a) The values represent the mean ± standard deviations for triplicate experiments.

물의 10^{-2} 와 10^{-3} mg/ml농도에서는 PAS 음성반응이 나타나며, 10^{-5} mg/ml농도에서는 다시 PAS 양성반응이 나타났다. 포공령의 물추출물에는 Ag-NOR 수를 감소시키는 물질이 함유되어 있으므로 Ag-NOR 수의 감소는 당단백질량의 감소와 관련이 있을 것으로 추측되므로, PAS 음성반응을 나타내는 인체 구강유상피암종세포는 부착능과 전이능력이 감소될 것으로 추측된다. 앞으로 세포의 부착능과 직접적인 관련이 있는 세포의 기질 단백질 fibronectin, laminin 및 actin 등의 분석에도 중점을 두어 연구를 계속할 계획이다.

결 론

천연물로부터 독성에 의한 부작용이 적고, 항암활성이 강한 물질을 개발할 목적으로 terpene 성분을 함유하고 있는 것으로 알려진 포공령으로부터 물추출물을 조제하여 인체 구강유상피암종세포에 적용한 후, 일차검색에 이용되는 비색법중 가장 민감하고 안정적인 MTT 정량분석법과 SRB 정량분석법을 이용하여 항암활성을 측정하였고, 세포증식의 지표가 되는 Ag-NOR 염색방법을 이용하여 Ag-NOR 수를 산정하였으며, 당단백질량을 간접적으로 알아보기 위하여 PAS 염색을 실시하여 PAS 반응정도를 확인하였다.

1. 포공령 물추출물의 10^{-2} mg/ml농도와 10^{-3} mg/ml농도는 MTT량과 SRB량을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.

2. 포공령 물추출물의 10^{-2} mg/ml농도는 Ag-NOR 수를 대조군에 비하여 유의하게 감소시키고 Ag-NOR 분포비율을 좌방이동 시켰다.

3. 포공령 물추출물의 10^{-2} mg/ml농도와 10^{-3} mg/ml농도는 인체 구강유상피암종세포의 세포질내 PAS 반응을 음성으로 변화시켰다.

이상의 결과는 포공령의 물추출물내에는 항암성분을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 원광대학교 교비의 지원에 의해서 연구되었으며, 이에 감사한다.

참고문헌

- Alley, M.S., Kim, S.G., Eun, J.S., Lim, J.P., Yum, J.Y., Suh, E.S., Oh, C.H. and So, J.N., (1992): Studies on the combined effect of several combined preparation of crude drugs and mitomycin C (I). *Kor. J. Pharmacogn.*, **23**, 158-170.
- Binnie, W.H., Rankin, K.V. and Mackenzie, I.C., (1983): Etiology of oral squamous cell carcinoma, *J. Oral Pathol*, **12**, 12-29.
- Chen, Z., (1990) : Clinical study of 96 cases with chronic hepatitis B treated with jiedu yanggan gao by a double-blind method. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, **10**, 71-74.
- Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B., (1987): Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942.
- Egan, M.J. and Crocker, J., (1988): Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. *J. Pathol.*, **154**, 247-253.
- Howat, A.J., Giri, D.D. Wright, A.L., (1988): Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in think cutaneous malignant melanoma. *J. Pathol.*, **156**, 227-232.
- Kim, J.M., Kim, I.S. and Paik, S.Y., (1989): Nucleolar organizer regions in normal tissue and hyperplastic and neoplastic lesions. *Kor. J. Pathol.*, **23**, 208-222.
- Liu, X.R., Han, W.Q., Sun, D.R., (1992): Treatment of intestinal metaplasia and atypical hyperplasia of gastric mucosa with xiao wei yan powder. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, **12**, 602-603.
- Mosmann, T., (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Nakamura, M., Mishima, H., Nishida, T., Otori, T., (1991): Requirement of microtubule assembly for initiation of EGF-stimulated corneal epithelial migration. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **35**, 377-385.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Visteca, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R., (1988): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112.
- Takahashi, K., Fujita, Y., Mayumi, T., Hama, T. and Kishih, T., (1987): Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 326-334.
- Zheng, M., (1990): Experimental study of 472 herbs with antiviral action against the herpes simplex virus. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, **10**, 39-41.
- 이은방, 김정근, 김옥경, (1993): 포공령의 항위염 작용, 생약학회지, **24**, 313-318.
- 정병욱, 김주영, 이윤창, (1997): 암세포주의 세포외기질단백에 미치는 Nocodazole의 영향, 대한해부학회지, **30**, 521-532.
- 정인교, 김택규, 김종렬, 양동규, 신상훈, 정기돈, (1996): 구강편평상피세포암의 처치와 예후에 관한 임상적 연구, 대한 구강악안면외과학회지, **22**, 346-355.