

ORIGINAL ARTICLE

미세먼지의 di(2-ethylhexyl) phthalate가 유도한 피부상피세포 사멸 신호전달기전 연구

박정배[#] · 김지윤[#] · 성정희¹⁾ · 김용웅* · 이세중*

대구한의대학교 제약공학과, ¹⁾리엔젠 부설연구소

Di(2-ethylhexyl) Phthalate Induces the Apoptotic Cell Death Mediated by Production of Reactive Oxygen Species in Human Keratinocyte

Jeong-Bae Park[#], Ji-Yun Kim[#], Junghee Sung¹⁾, Yong-ung Kim*, Sei-Jung Lee*

Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

¹⁾R&D center, Reanzen Co.,Ltd., Anyang 14056, Korea

Abstract

Particulate matter with an aerodynamic diameter of less than 2.5 μM ($\text{PM}_{2.5}$) is one of the major environmental pollutants. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), an endocrine disrupting chemical in $\text{PM}_{2.5}$, has been utilized for the manufacturing of polyvinyl chloride to increase the flexibility of final products. In the present study, we investigated the ecotoxicological effect of DEHP on the viability of skin keratinocytes (HaCaT). DEHP induced apoptotic cell death mediated by phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase through the production of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS). Interestingly, we found that DEHP induces the phosphorylation of the nuclear factor-kappa B responsible for the expression of cleaved caspase-3 as an executional cell death protease in HaCaT cells. On the basis of these results, we suggest that DEHP in $\text{PM}_{2.5}$ induces the apoptotic death of human keratinocytes via ROS-mediated signaling events.

Key words : Di(2-ethylhexyl) phthalate, Extracellular signal-regulated kinase, Skin keratinocyte, Nuclear factor-kappa B, Reactive oxygen species

1. 서론

피부는 인체에서 외부의 자극으로부터 내부를 보호하는 장벽기능의 역할을 하며, 끊임없는 세포분열과 분화를 통해 새로운 표피(skin keratinocyte)를 만들어 신체 내부의 체

액이 빠져나가는 것을 방지한다(Kim and Jung, 2012). 그 중 피부를 구성하고 있는 표피세포는 자가포식 및 세포면역 반응을 통하여 이러한 외부자극을 제어하는 것으로 알려져 있다(Yoon et al., 2013).

사회적으로 문제가 되고 있는 미세먼지(fine particulate

Received 13 December, 2019; Revised 3 February, 2020;

Accepted 12 February, 2020

*Corresponding author: Sei-Jung Lee, and Yong-ung Kim, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeong-san 38610, Korea.

[#] These authors contributed equally to this work.

Phone: +82-53-819-1806

E-mail: sjlee@dhu.ac.kr

The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

matter) 내에는 다양한 방향족 물질, 중금속, 환경 호르몬 (environmental hormones) 등이 포함되어 있으며, 특히 벤조피렌[benzo(a)pyrene], 프탈레이트[di(2-ethylhexyl) phthalate], 다이옥신(polychlorinated dibenzo-p-dioxin) 등은 미세먼지와 결합하여 호흡기를 통해 인체로 유입될 뿐만 아니라 피부를 뚫고 혈액으로 들어가 인체에 축적되어 암을 유발하거나, 아토피, 염증반응 등 유해한 영향을 끼치는 것으로 보고되었다(Christia et al., 2019).

한편, 프탈레이트는 PVC 플라스틱제품 제조 시 가소제로 흔히 사용되는 물질로 알려져 있는데 이것은 PVC에 화학적으로 결합되지 않기 때문에 실내 공기 및 대기, 식품, 기타 물질로 침출되거나 이동할 수 있다(Bizon et al., 2009). 특히 대기 중으로 이동한 프탈레이트가 미세먼지와 결합하여 생물체의 피부를 통해 유입되면 피하지방층(panniculum)에 농축되어 내분비계 교란물질(Endocrine Disrupter Cheminals, EDCs)로 작용할 가능성이 높아 사회적 문제로 강조되고 있다(Cole et al., 2011).

최근에 생식독성 측면에서 프탈레이트의 작용기작에 대한 많은 연구가 진행되었지만(Park et al., 2002) 미세먼지에 포함되어 있는 프탈레이트가 피부세포에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다. 특히 최근에 환경오염의 증가로 인해 미세먼지로부터 피부질환에 대한 우려로 다양한 안티폴루션(anti-pollution) 화장품이 증가하는 추세지만 이러한 제품의 문제점은 대부분 피부에 부착된 미세먼지를 닦아낼 수 있는 클렌징 제품이며 실제 피부손상 및 피부질환 유도기작은 아직 규명되지 않았다. 따라서 이 연구는 미세먼지에 다량 존재하는 프탈레이트가 피부상피세포의 손상에 미치는 작용기작 및 그 신호전달체계를 밝히고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

본 실험에 사용된 시약 중, di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였고, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지와 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)은 GE Healthcare Life Sciences (Morningside, Queensland, Australia)에서 구입하였으며, JNK, phospho-

-JNK, ERK, phospho-ERK, p38 MAPK, phospho-p38 MAPK, NF- κ Bp65, phospho-NF- κ Bp65, caspase-3 및 β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)의 제품을 사용하였다. 사용된 시약은 순도가 높은 (순도 99% 이상) 등급을 구입하였다.

2.2. 세포 배양

인간유래 피부각질세포(skin keratinocyte, HaCaT)는 미국 세포주은행(american type culture collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였으며, DMEM 배지에 10%의 FBS, 100 U/ml의 penicillin 및 100 μ g/ml의 streptomycin을 혼합한 후 37°C와 5%의 CO₂ 조건의 세포배양기에서 배양하였다.

2.3. 세포생존율 측정

프탈레이트가 피부상피세포에 미치는 독성효과를 측정하기 위해 EZ-CYTOX (DoGen Bio, Seoul, Korea)를 사용하였다. 세포를 96-well flat bottom plates에 분주하고 실험의 마지막 단계에서 10 μ l의 EZ-CYTOX를 각 well에 첨가하였다. 1시간 동안 CO₂ 세포배양기에서 반응시킨 후 microplate reader (Tecan, Seestrasse, mändendorf, Switzerland) 장치를 이용하여 450 nm 파장에서 그 흡광도를 측정하였다.

2.4. 세포 내 활성산소량 측정

세포 내 활성산소량은 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA)를 이용해 측정하였다. 피부상피세포에 프탈레이트를 처리한 후, 10 mM의 CM-H₂DCFDA를 30분 동안 처리하고 어두운 곳에서 배양하였다. 세포 내 활성산소량을 정량하기 위해 fluorescent microplate reader (Tecan, Seestrasse, mändendorf, Switzerland)를 이용하여 495 ~ 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 공초점 레이저 현미경(Olympus FluoView 300 confocal microscope, Tokyo, Japan)을 이용해 100배 배율로 세포 내 발생하는 활성산소량을 관찰하였다.

2.5. Western blot 분석

Western blot 실험을 수행하기 위해 피부상피세포에 프탈레이트를 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 세포 단백질을 추출하였다. 세포 단백질은 단백질 분해 억제제가 포함된 RIPA lysis buffer [20 mM HEPES, pH 7.5,

150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.5% sodium deoxycholate]에서 추출되었고, BCA Protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질의 농도를 확인하였다. 정량된 단백질들을 0.1%의 SDS가 포함된 10%의 polyacrylamide gel에 105 V, 30 mA에서 3시간 동안 전기영동기 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분리하였고, 이를 polyvinylidene fluoride membrane에 transfer 시킨 후, 5%의 탈지분유가 함유된 TBS-Tween 용액(50 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20)으로 25°C에서 30분 동안 반응시켰다. 3,000배 희석된 primary antibody와 함께 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 TBS-Tween 용액으로 세척하고 10,000배 희석된 secondary antibody를 2시간 동안 25°C에서 처리하였다. 각 단백질의 발현은 Bio-rad Chemi Doc™ XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해 확인하였고, Scion imaging 소프트웨어 (Scion Image Beta 4.02, Frederick, MD, USA)를 사용하여 단백질 발현 결과를 상대 강도값으로 계산하였다.

2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 실험결과는 평균 ± 표준 오차(S.E.)로 나타냈다. 통계적 유의적 차이는 GraphPad (Prism 6, GraphPad Software, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법으로 결정하였으며, *P*-values < 0.05의 값들을 유의적인 결과로 고려하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 프탈레이트가 피부상피세포 생존율에 미치는 영향

프탈레이트[di(2-ethylhexyl) phthalate]가 피부상피세포(HaCaT cells)에 미치는 영향을 알아보기 위해 water soluble tetrazolium salt (WST)와 mitochondrial dehydrogenase의 반응으로 형성되는 세포생존율의 지표인 formazan의 양을 측정하는 EZ-CYTOX 실험을 진행하였다(Kim et al., 2013). Fig. 1A에서 보는 바와 같이, 프탈레이트를 농도별로 24시간 동안 피부상피세포에 처리하였을 때, 세포생존율이 대조군과 비교하여 500 μ M에서 51%, 1000 μ M에서 44% 만큼 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 500 μ M의 프탈레이트를 24

시간과 48시간동안 처리하였을 때, 52%와 31%만큼 세포생존율이 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). 최근 프탈레이트와 동일한 내분비계 교란물질의 한 종류인 bisphenol A의 경우, 피부상피세포에서 세포독성을 유도하여 세포사멸을 유발한다는 결과가 보고되었다(Son et al., 2018). 따라서 이러한 연구결과들은 미세먼지 속 환경호르몬은 피부상피세포 손상에 유의적인 영향이 있음을 시사한다.

3.2. 피부상피세포 활성산소종 생성에 있어서 프탈레이트가 미치는 영향

내분비계 교란물질은 과산화수소(H_2O_2) 및 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 발생을 통해 세포의 산화스트레스를 유발한다고 알려져 있다(Sidorkiewicz et al., 2017). Fig. 2A에서 보는 바와 같이, 500 μ M의 프탈레이트에 의해 유도된 피부상피세포의 활성산소종을 시간에 따라 측정하였을 때, 세포 내 활성산소 발생 수준은 대조군과 비교하여 30분째 36%만큼 유의적 수준으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험의 결과는 세포 내 활성산소를 CM-H₂DCFDA로 염색하여 형광현미경 사진을 통해 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 최근 문헌에서 내분비계 교란물질인 bisphenol A가 활성산소종의 발생을 유도하여 세포사멸을 유도한다는 결과가 보고되었다(Zhao et al., 2016; Zhang et al., 2017). 따라서 이와 같은 결과는 미세먼지에 존재하는 내분비계 교란물질인 프탈레이트가 세포 내 활성산소종 발생을 통하여 피부상피세포 손상의 신호전달기작을 유도한다는 것을 시사한다.

3.3. 프탈레이트에 의한 피부상피세포 MAPKs의 활성화 변화

Mitogen-activated protein kinases (MPAKs)의 한 종류인 extracellular signal-regulated kinase (ERK)는 일반적으로 활성산소종의 대표적인 세포 내 하위신호전달인자로서 활성산소종으로 인한 ERK의 활성화는 세포사멸로 이어진다는 연구 결과가 보고되었다(Bastola et al., 2017). Fig. 3A에서 보는 바와 같이 500 μ M의 프탈레이트를 피부상피세포에 처리하였을 때 ERK 단백질의 인산화 수준은 대조군과 비교하여 1시간째 유의적으로 가장 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Fig. 3B와 Fig. 3C에서 보는 바와 같이 500 μ M의 프탈레이트를

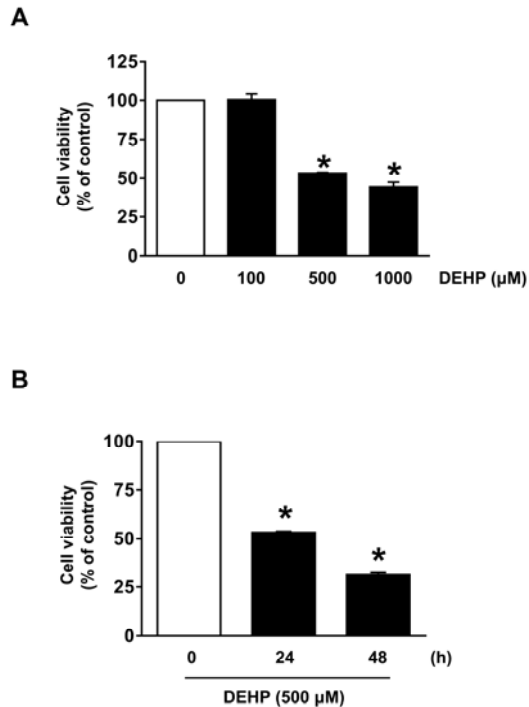


Fig. 1. DEHP induces apoptosis in HaCaT cells. (A) Dose responses of cell viability in HaCaT cells treated with 100, 500, and 1000 μM of DEHP for 24 h are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$ versus 0 μM . (B) Time responses of cell viability in HaCaT cells treated with 500 μM of DEHP are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$ versus 0 h.

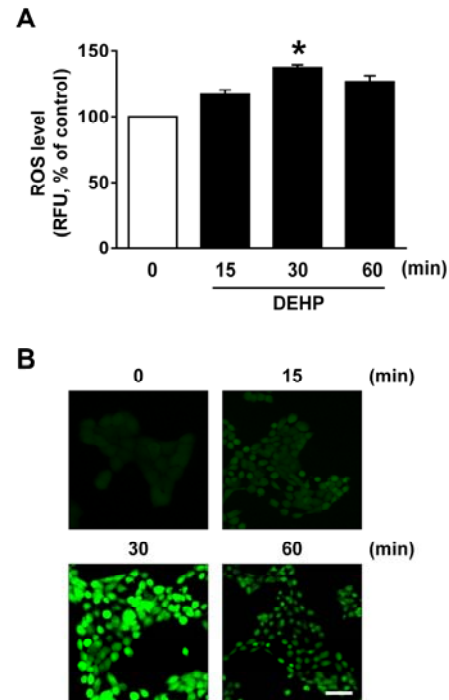


Fig. 2. DEHP induces apoptosis via ROS production. (A) Time responses of ROS production in cells treated with DEHP are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$ versus 0 min. (B) ROS production (green) was visualized by confocal microscopy. Scale bars represent 100 μm (magnification, $\times 100$). $n = 3$. RFU, relative fluorescence unit.

피부상피세포에 처리하였을 때, JNK와 p38 MAPK 단백질 인산화 수준은 대조군과 동일한 수준으로 변화가 없음을 관찰할 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과는 프탈레이트가 선택적으로 ERK 단백질 인산화를 통해 세포 사멸을 유도한다는 것을 암시한다.

3.4. 프탈레이트에 의한 NF- κ B의 활성 변화

ERK의 대표적인 하위신호전달자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)는 세포 핵 내의 세포사멸과 관련된 전사인자(transcription factor)로 보고되었다(Park et al., 2017). Fig. 4에서 보는 바와 같이, 500 μM 의 프탈레이트를 피부상피세포에 처리하였을 때, NF- κ B 단백

질의 인산화 수준은 대조군과 비교하여 1시간째 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. NF- κ B는 세포의 증식, 분화, 염증반응 및 세포사멸 등에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 조절하는 세포 내 신호전달체계의 중심이며, 대부분의 세포에 있어서 NF- κ B는 I κ B라는 inhibitory protein이 결합된 상태로 존재하고 있다가 NF- κ B가 활성화되면 I κ B와 분리되어 핵막을 통과하여 핵 내로 이동한 후 세포사멸과 관련된 다양한 mRNA의 생성에 관여한다고 알려져 있다(Baeuerle and Henkel, 1994). 따라서, 이와 같은 결과는 프탈레이트가 NF- κ B의 인산화 및 핵내로의 이동을 유도하여 세포사멸에 관련된 유전자의 발현을 조절하는 것임을 알 수 있다.

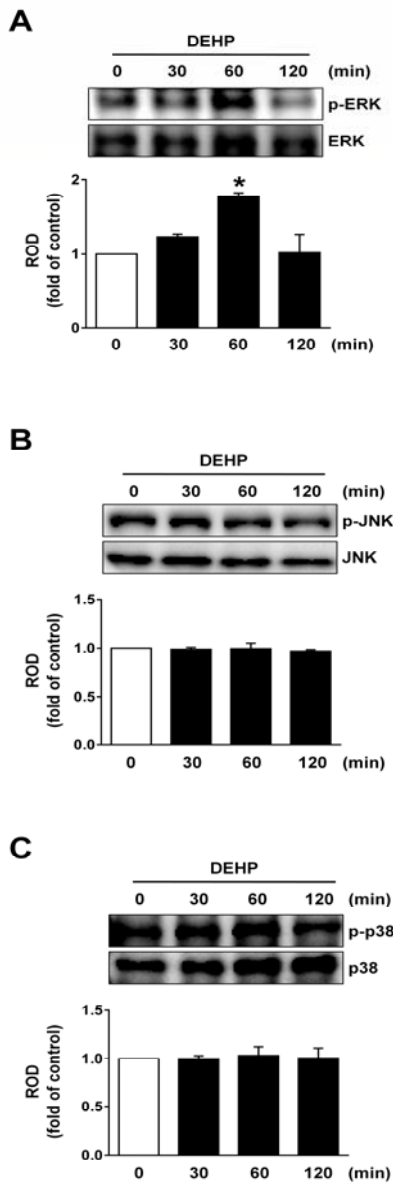


Fig. 3. Regulatory effect of DEHP on MAPKs activation. (A) Time responses of phosphorylation of ERK in cells treated with DEHP are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.01$ versus 0 min. (B) Time responses of phosphorylation of JNK in cells treated with DEHP are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. (C) Time responses of phosphorylation of p38 MAPK in cells treated with DEHP are shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. ROD, relative optical density.

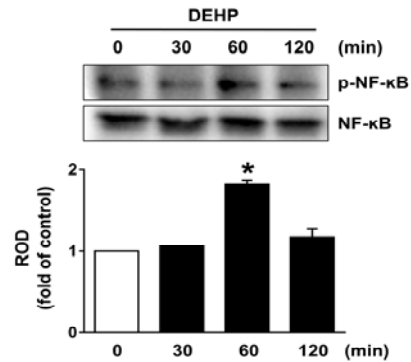


Fig. 4. DEHP induces NF- κ B-dependent apoptosis. Time responses of phosphorylation of NF- κ B in cells treated with DEHP are shown. Phosphorylation of NF- κ B was determined by western blot. Data represent means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.05$ versus 0 min. ROD, relative optical density.

3.5. 피부상피세포의 사멸을 유도하는 caspase-3의 활성화에 있어서 프탈레이트가 미치는 영향

Caspase-3는 세포사멸의 유발에 중요한 역할을 하는 조절단백질로 알려져 있으며, 정상 세포에서는 proenzyme 형태로 존재하지만 세포사멸 유도 신호에 의해 활성화되어 직접적 혹은 간접적으로 세포 내에 존재하는 많은 표적 단백질의 분해에 관여한다고 보고되었다(Fan et al., 2005; Wier et al., 2015). Fig. 5에서 보는 바와 같이, 500 μ M의 프탈레이트를 피부상피세포에 처리하였을 때, 12시간에서부터 24시간까지 cleaved caspase-3의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어보아 피부상피세포가 미세먼지의 프탈레이트에 노출되면 caspase-3 활성이 유도되면서 세포사멸이 유도되어 피부세포손상이 유발된다는 것을 시사한다.

지금까지의 연구를 종합해 볼 때, 프탈레이트는 피부상피세포에서 세포 내 활성산소종을 생성하고, ERK 및 NF- κ B의 인산화를 통해 caspase-3의 활성을 조절하여 피부세포손상을 야기시킨다는 것을 알 수 있다. 향후 피부상피세포에서 프탈레이트가 유도하는 세포사멸 신호전달 기전을 밝히기 위해 프탈레이트의 수용체 작용기전에 대한 분자생물학적인 연구가 더 필요하며, 피부손상에 있어서 프탈레이트의 유해 메커니즘을 억제할 수 있는 제어제에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

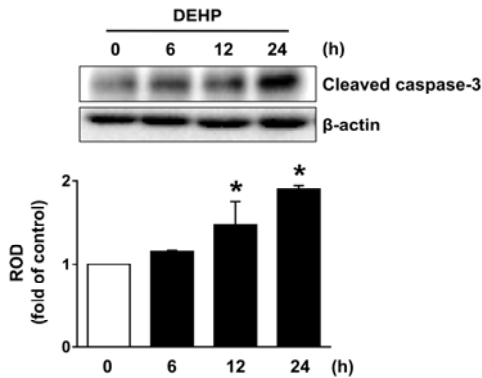


Fig. 5. DEHP stimulates apoptosis of HaCaT cells via activation of caspase-3. Time responses of expression of cleaved caspase-3 in cell treated with DEHP for 0 - 24 h were confirmed by western blot. Data represent means \pm S.E. n = 3. * $P < 0.05$ versus 0 h. ROD, relative optical density.

4. 결론

프탈레이트[di(2-ethylhexyl) phthalate]는 미세먼지 내에 다량으로 존재하는 내분비계 교란물질 중 하나이며, 플라스틱 제품의 제조 시 가소제로 흔히 사용되는 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는, 프탈레이트가 피부상피세포에서의 세포사멸에 미치는 세포수준의 신호전달기전에 대하여 알아보았다. 프탈레이트는 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species)의 생성을 통해 mitogen-activated protein kinases 중 extracellular signal-regulated kinase의 인산화를 촉진하였다. 또한 프탈레이트는 피부상피세포에서 전사인자인 nuclear factor- κ B의 인산화를 통해 세포사멸의 유발인자 중 하나인 caspase-3의 활성을 자극하였다. 이러한 결과를 종합해보면, 미세먼지의 프탈레이트는 피부상피세포에서 활성산소종의 생성을 통해 피부세포의 사멸을 유도하여 피부세포손상을 일으키는 내분비계 교란물질이라고 요약할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구 결과입니다 (No. 2019R1A2C1088927).

REFERENCES

- Bauerle, P. A., Henkel, T., 1994, Function and activation of NF- κ B in the immune system, *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 141-179.
- Bastola, T., An, R. B., Kim, Y. C., Kim, J., Seo, J., 2017, Cearoin induces autophagy, ERK activation and apoptosis via ROS generation in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Molecules*, 22, 242-255.
- Bizon, J. L., LaSarge, C. L., Montgomery, K. S., McDermott, A. N., Setlow, B., Griffith, W. H., 2009, Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats, *Neurobiol. Aging*, 30, 646-655.
- Christia, C., Poma, G., Harrad, S., de Wit, C. A., Sjostrom, Y., Leonards, P., Lamoree, M., Covaci, A., 2019, Occurrence of legacy and alternative plasticizers in indoor dust from various EU countries and implications for human exposure via dust ingestion and dermal absorption, *Environ. Res.*, 171, 204-212.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T. S., 2011, Microplastics as contaminants in the marine environment: a review, *Mar. Pollut. Bull.*, 62, 2588-2597.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., Liang, J., 2005, Caspase family proteases and apoptosis, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 37, 719-727.
- Kim, H. J., Jung, S. K., 2012, New trends in skin barrier research, *J. Skin Barrier Research*, 14, 15-28.
- Kim, K., An, S., Cha, H. J., Choi, Y. M., Choi, S. J., An, I. S., Lee, H. G., Min, Y. H., Lee, S. J., Bae, S., 2013, Lenalidomide induces apoptosis and alters gene expression in non-small cell lung cancer cells, *Oncol. Lett.*, 5, 588-592.
- Park, J. D., Habeebu, S. S., Klaassen, C. D., 2002, Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague-Dawley rats, *Toxicology*, 171, 105-115.
- Park, J. H., Seo, Y. H., Jang, J. H., Jeong, C. H., Lee, S., Park, B., 2017, Asiatic acid attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation and neurotoxicity through blocking of NF- κ B/STAT3/ERK and mitochondria-mediated apoptosis pathway, *J. Neuroinflammation*, 14, 240-255.
- Sidorkiewicz, I., Zareba, K., Wolczynski, S., Czerniecki,

- J., 2017, Endocrine-disrupting chemicals-Mechanisms of action on male reproductive system, *Toxicol. Ind. Health*, 33, 601-609.
- Son, S., Nam, K., Kim, H., Gye, M. C., Shin, I., 2018, Cytotoxicity measurement of Bisphenol A (BPA) and its substitutes using human keratinocytes, *Environ. Res.*, 164, 655-659.
- Wier, E. M., Fu, K., Hodgson, A., Sun, X., Wan, F., 2015, Caspase-3 cleaved p65 fragment dampens NF- κ B-mediated anti-apoptotic transcription by interfering with the p65/RPS3 interaction, *FEBS Lett.*, 589, 3581-3587.
- Yoon, S. D., Baek, W. K., Kim, S. P., Lee, K. S., Cho, J. W., 2013, Induction of apoptosis and autophagy in UVB-treated HaCaT cells, *Korean J. Dermatol.*, 51, 600-607.
- Zhang, Y., Han, L., Yang, H., Pang, J., Li, P., Zhang, G., Li, F., Wang, F., 2017, Bisphenol A affects cell viability involved in autophagy and apoptosis in goat testis sertoli cell, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 137-147.
- Zhao, J., Tang, C., Nie, X., Xi, H., Jiang, S., Jiang, J., Liu, S., Liu, X., Liang, L., Wan, C., Yang, J., 2016, Autophagy potentially protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-Dioxin induced apoptosis in SH-SY5Y cells, *Environ. Toxicol.*, 31, 1068-1079.
-
- Master student. Jeong-Bae Park
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University
wjdeqo128@gmail.com
 - Master student. Ji-Yun Kim
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University
gksmf6355@gmail.com
 - Researcher. Jung-Hee Sung
R&D center, Reanzen Co., Ltd.
sky1231002@naver.com
 - Professor. Yong-Ung Kim
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University
ykim@dhu.ac.kr
 - Professor. Sei-Jung Lee
Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University
sjlee@dhu.ac.kr