

도깨비부채 잎 추출물의 NF- κ B 활성화를 통한 대장암 세포 HCT116에 대한 세포생육 억제활성

김정동¹, 정진부^{2*}

¹국립안동대학교 생약자원학과, 대학원생, ²교수

Inhibitory Effect of the *Rodgersia podophylla* Leaf Extracts against Cell Proliferation through Activation of NF- κ B in Human Colorectal Cancer Cells

Jeong Dong Kim¹ and Jin Boo Jeong^{2*}

¹Graduate Student and ²Professor, Department of Medicinal Plant Resources, Andong National University, Andong 36729, Korea

Abstract - In this study, we evaluated the anti-cancer activity and potential molecular mechanism of 70% ethanol extracts of leaves from *Rodgersia podophylla* against human colorectal cancer cells, HCT116. RPL dose-dependently decreased the cell viability through RPL-induced apoptosis in HCT116 cells. RPL induced inactivation the nuclear factor κ B(NF- κ B) through blocking I κ B- α degradation and P65 nuclear accumulation. The inhibition of GSK3 β by LiCl attenuated RP-L-mediated NF- κ B signaling inactivation. In addition, RP-L induced GSK3 β activation. Based on these findings, RPL may be a potential candidate for the development of chemopreventive or therapeutic agents for human colorectal cancer.

Key words - Anticancer activity, NF- κ B signaling pathway, *Rodgersia podophylla*

서 언

암은 미국을 포함한 세계적으로 주요 사망원인 중 하나로 여겨진다(Wang *et al.*, 2012). 그 중 대장암은 세계에서 세번째로 가장 흔한 악성종양이며 암 관련 주요 사망원인 중 네번째 원인으로 꼽힌다(Arnold *et al.*, 2017). 대장암에 대한 항암제가 개발되고 특정 표적 치료기술들이 상당히 발전하였으나 이미 전이 많이 진행된 암에 대한 치료는 여전히 어려운 실정이다(Wang *et al.*, 2012). 대장암 치료를 위한 다수의 항암제가 개발되었으나, 장기간 사용으로 인한 많은 부작용을 야기한다(Meyerhardt and Mayer *et al.*, 2005). 보다 안전하고 효율적인 치료를 위해 천연물이 활용된 치료법 개발이 새롭게 대두되고 있으며, 이에 대안으로 한의학을 포함한 보완대체의학에 대한 관심이 증가함에 따라 많은 암 환자에게 한의학적 항암 치료의

응용이 증가되고 있다(Park *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012).

범의귀과에 속하는 여러해살이풀인 도깨비부채(*Rodgersia podophylla*)는 중국, 일본 및 한국에 분포하며 반룡칠(盤龍七)이라는 한약재로 쓰여왔다. 도깨비부채는 예부터 장염 또는 세균성 이질, 해열 및 진통을 치료하는데 사용되었다. 최근 도깨비부채는 손상된 간에서 보호 효과를 나타낸다고 보고되었다(Chin *et al.*, 2006). 또한 도깨비부채 잎이 HO-1 발현과 특정 신호전달을 억제함으로써 항염증 활성을 나타내고 대장암을 포함한 암세포에 대한 세포생육억제를 나타내고 발암단백질의 발현을 유도하는 β -catenin 단백질의 분해를 유도하였다(Kim *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020).

NF- κ B 신호전달은 내외적으로 세포사멸을 억제하는 단백질들을 증가시키며 세포사멸 억제인자 발현을 유도함으로써 암 치료에서 주요 표적이 된다(Dolcet *et al.*, 2005). 일반적으로 NF- κ B의 활성화는 세포사멸을 억제한다고 알려져 있지만 다른 상황에서 NF- κ B 신호전달 활성화가 세포사멸에 관여한다

*교신저자: E-mail jjb0403@anu.ac.kr

Tel. +82-54-820-7757

고 보고되었으며 암 예방 및 치료에 잠재적 표적으로 간주된다 (Jeong *et al.*, 2013). 그리하여 도깨비부채 잎의 대장암에 대한 항암활성과 NF- κ B 신호전달 작용기전을 조사하기 위해 본 연구에서는 도깨비부채 잎의 암 세포생육 억제 및 그 작용기전에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서 암 세포의 배양을 위해 사용된 배지인 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 1 : 1 modified medium (DMEM/F-12)는 Lonza (Morrison, NJ, USA)에서 구매하였다. 단백질분해 억제제인 MG132, 특정 효소활성 억제제인 PD98059, SB203580, SP600125, LY294002, LiCl 및 BAY11-7082와 세포생육 억제효능을 평가하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구매하였다. 그리고 western blot 분석에서 사용된 항체인 I κ B- α , p65, GSK3 β , phospho-GSK3 β , TBP, actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구매되었다.

추출물 제조

본 연구에 사용된 도깨비부채 잎은 국립산림과학원 산림약용자원연구소로부터 제공받았다. 도깨비부채의 확증표본(표본번호: FMCRpYg 1908_1)은 국립산림과학원 산림약용자원연구소에 보관되어 있으며, 도깨비부채는 산림약용자원연구소의 손호준 박사의 식물학적 동정을 거쳤다. 도깨비부채 잎 20 g을 70% ethanol 400 mL과 함께 상온에서 교반하여 3일 동안 추출하였다. 추출 후 filter paper (No. 2, Whatman Co., Maidstone, England)로 여과하여 70% ethanol 추출물을 회수하였다. 회수한 도깨비부채 잎 ethanol 추출물은 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 40°C 이하의 중탕에서 농축 후 동결건조하였다. 건조된 추출물은 -80°C의 냉동고에 보관하여 본 연구에서 시료로 사용되었다. 도깨비부채 잎(RPL) 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 본 연구에 사용되었으며, 대조군은 DMSO를 0.1%를 초과하지 않았다.

세포 생육 억제활성 측정

인간 대장암 세포인 HCT116은 한국세포주은행에서 구매하여 본 연구에서 사용하였으며, 세포는 10% fetal bovine serum

(FBS), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin이 포함된 DMEM/F-12 배지로 5% CO₂ 하로 유지한 37°C incubator에서 배양하였다. 대장암세포인 HCT116의 세포생육 억제활성은 MTT assay로 측정하였다. 대장암 세포인 HCT116은 96 well plate에서 well 당 1 \times 10⁵ cells로 24 시간 배양하여 도깨비부채 잎 70% ethanol 추출물을 농도별로 24 시간 동안 처리하였다. 처리 후 각 well에 MTT (1 mg/mL) 용액 50 μ l씩 첨가하여 1시간 30분에서 2시간 동안 다시 배양시킨 후, 형성된 formazan이 흡수되지 않도록 상등액을 제거하였다. 상등액이 제거된 formazan에 DMSO를 100 μ L를 첨가하여 남아있지 않도록 녹인 후 UV/Visible spectrophotometer (Xma-3000PC, Human Corporation Co., Seoul, Korea)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석

HCT116세포로부터 단백질 추출을 위해, 시료처리 후 세포를 4°C에서 유지된 1 \times phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 회수하였다. protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co.)이 포함된 NP-40 lysis buffer (GenDEPOT, Katy, TX, USA)를 4°C에서 30분 처리하여 원심 분리 후 상등액을 취해 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay (Pierce Biotechnology Inc., Waltham, MA, USA)로 정량분석하였다. 정량분석을 통한 동일량의 단백질을 12% SDS-acrylamide gel로 전기영동을 가하여 PVDF membrane (BioRad, Hercules, CA, USA)에 이동시켰으며, 상온에서 1 시간 동안 blocking을 위해 5% non-fat dry milk을 사용하였다. Blocking 후, 5% non-fat dry milk에 용해시킨 1차 항체를 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 membrane을 0.05% Tween-20이 포함된 Tris-buffered saline (TBS-T)로 세척하였다. 세척 후 5% non-fat dry milk에 용해시킨 2차 항체를 membrane에 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 후 TBS-T로 5분 간격으로 3회 세척 후 membrane은 ECL western blotting substrate (Amersham Biosciences Co., Little Chalfont, England)를 이용하여 단백질 수준을 확인하였다.

통계분석

본 연구에서 나온 결과는 3 회 반복하여 측정 후 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 처리 간 유의성은 Student's t-test로 검증하였으며, 0.05 미만의 p-value 값일 경우, 통계상 유의하다고 판단하였다(Microsoft Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

결과 및 고찰

RPL의 HCT116세포에 대한 세포생육억제 활성

RPL의 대장암세포인 HCT116세포에 대한 세포생육억제 활성을 평가하기 위해 HCT116에 RPL을 농도별로 24시간 처리 후, MTT assay를 이용하여 RPL의 세포생육억제 활성을 평가하였다. 그 결과, RPL은 HCT116세포의 세포생육을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 이러한 RPL의 세포생육억제 활성이 RPL의 apoptosis의 유도에 의해 일어난 것인지 평가하기 위해, RPL을 농도별로 24시간 처리 후, cleaved PARP protein 발현을 조사하였다. 그 결과, RPL은 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 cleaved PARP의 발현에 영향을 주지 않았으나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 크게 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 세포는 apoptosis가 일어나게 되면 세포 간의 접촉이 떨어

지며 chromatin 응축을 수반하게 된다(Wyllie *et al.*, 1981). HCT116에 RPL을 농도별로 24시간 처리 후, 현미경으로 확인하였다. 그 결과, HCT116에서 농도 의존적으로 chromatin 응축 과정이 일어나고 있음을 확인하였다. 세포 내 thiol의 감소는 세포 내 산화, 환원 상태의 균형을 무너뜨려 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다(Zhang *et al.*, 2004). HCT116에서 RPL을 농도별로 처리하여 세포 내 thiol을 분석한 결과, 농도별로 thiol이 감소한다는 것을 확인하였다(Fig. 1C). 본 결과들은 HCT116에서 RPL이 세포생육 억제활성을 나타내며 세포 내 apoptosis를 유도하여 세포생육 억제활성을 나타내는 것을 의미한다.

RPL의 HCT116세포에서 $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$ 분해유도를 통한 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 신호전달 활성화

항염증 활성을 가진 특정 NSAID 치료제가 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 활성화를

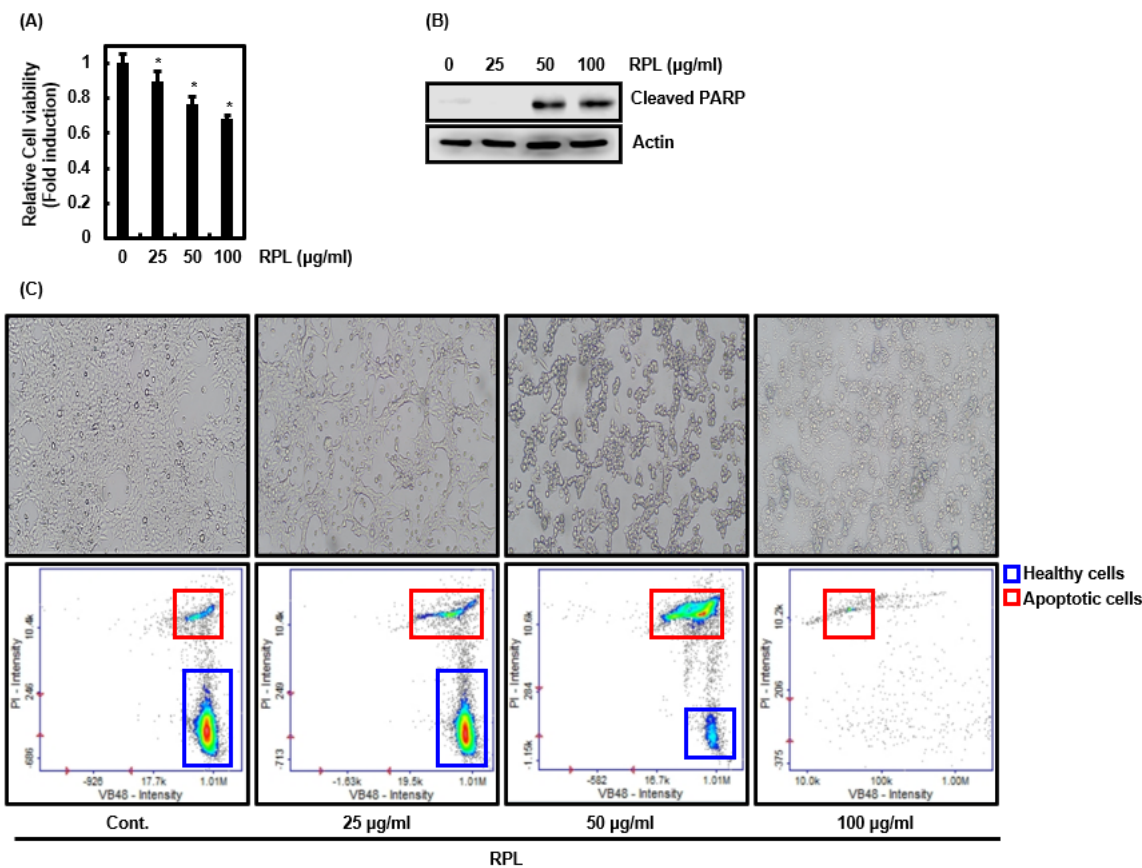


Fig. 1. Effect of RPL on the cell growth in HCT116 cells. (A) Cell growth was evaluated by MTT assay at 24 h after RPL treatment. * $p < 0.05$ compared to cell without RPL. (B) HCT116 cells were treated with RPL at the indicated concentrations for 24 h. Western blot analysis was performed against Cleaved PARP. Actin was used as internal controls for Western blot. (C) HCT116 cells were treated with RPL at the indicated concentrations for 24 h.

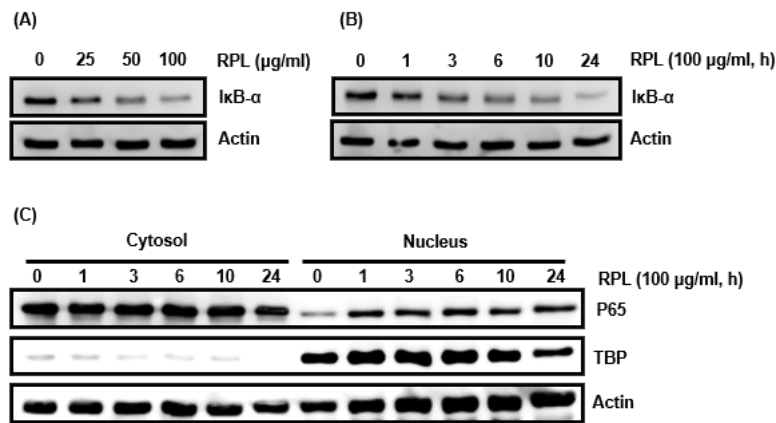


Fig. 2. Effect of RPL on NF- κ B activation in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were treated with RPL at the indicated concentrations for 24 h. (B and C) HCT116 cells were treated with 100 μ g/mL of RPL for the indicated times. Western blot analysis was performed against I κ B- α and p65. Actin and TBP was used as internal controls for Western blot.

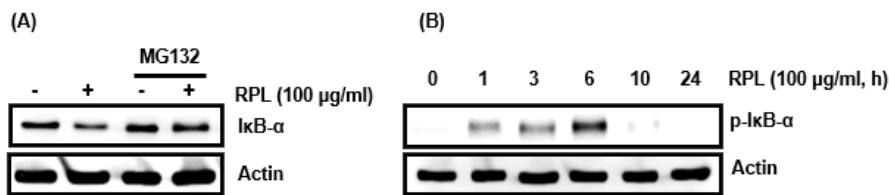


Fig. 3. Effect of RPL on I κ B- α proteasomal degradation through I κ B- α phosphorylation in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were pretreated with MG132 (10 μ M) for 2 h and then co-treated with RPL (100 μ g/mL) for 3 h. (B) HCT116 cells were treated with 100 μ g/mL of RPL for the indicated times. Western blot analysis was performed against I κ B- α and p-I κ B- α . Actin was used as internal controls for Western blot.

통해 항암효과를 나타낸다는 연구결과가 보고된 바 있다(Jeong *et al.*, 2013). NF- κ B 신호전달은 평소 I κ B- α 와 NF- κ B 복합체가 결합상태로 NF- κ B 활성을 억제하고 있으나 외부자극을 통해 I κ B- α 가 분해가 되면서 NF- κ B 복합체의 구성인자인 p65의 핵내 전이가 일어나면서 NF- κ B 신호전달이 활성화된다(Dolcet *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2013). RPL의 NF- κ B 신호전달 활성을 평가하기 위해 RPL의 I κ B- α 의 분해를 조사하였다. RPL을 농도별로 24시간 처리하여 확인한 결과, RPL은 농도의존적으로 I κ B- α 의 단백질 수준이 감소한다는 것을 확인하였다(Fig. 2A). RPL 100 μ g/mL을 시간별로 처리한 결과, RPL을 처리 후 3시간부터 I κ B- α 유의적으로 수준감소가 일어난다는 것을 확인하였다(Fig. 2B). RPL의 I κ B- α 단백질 수준 감소가 p65의 핵내 전이로 이어지는지 조사하기 위해 RPL 100 μ g/mL을 시간별로 처리하여 확인한 결과, 처리 후 1시간부터 p65 핵내 전이가 나타났음을 확인하였다(Fig. 2C). 본 결과들을 미루어 볼 때, RPL은 HCT116 세포에서 I κ B- α 단백질 수준 감소를 통해 p65 핵내 전이

를 야기하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 것을 확인하였다.

RPL의 HCT116세포에서 I κ B- α 인산화를 통한 I κ B- α 단백질 분해 유도 활성

RPL이 HCT116 세포에서 I κ B- α 의 단백질 수준감소와 p65 핵내 전이를 통해 NF- κ B 활성화를 시킨다는 것을 확인하였다. RPL의 I κ B- α 의 단백질 수준감소가 I κ B- α 단백질 분해로 인한 것인지 조사하였다. HCT116세포에 MG132 10 μ M을 2시간 전 처리 후 RPL 100 μ g/mL 3시간 처리한 결과, RPL 100 μ g/mL을 처리한 구간에선 I κ B- α 의 단백질 수준감소가 나타났지만 단백질 분해 억제제인 MG132와 RPL 100 μ g/mL을 같이 처리한 구간에선 수준감소가 나타나지 않았다(Fig. 3A). 이 결과로 RPL은 I κ B- α 의 단백질 분해를 유도한다는 것을 확인하였다. I κ B- α 의 단백질 분해는 I κ B- α 의 인산화와 밀접한 관련이 있다(Dolcet *et al.*, 2005). RPL이 I κ B- α 인산화를 유도하는지 확인하기 위해 RPL 100 μ g/mL을 시간별로 처리한 결과, 처리 후 1시간부터 I κ

B- α 의 인산화가 일어났고 6시간에 크게 일어났다(Fig. 3B). 본 결과들은 RPL은 I κ B- α 인산화를 통해 I κ B- α 의 단백질 분해를 유도한다는 것을 의미한다.

RPL의 HCT116세포에서 GSK3 β 활성화를 통한 I κ B- α 단백질 분해 유도 활성

NF- κ B 신호전달 활성화는 MAPKs, PI3K/Akt 및 다른 신호 전달 경로의 활성화가 관여한다고 알려져 있다(Dolcet *et al.*, 2005). HCT116세포에서 RPL에 의해 유도되는 I κ B- α 단백질 분해와 관련된 kinase를 규명하기 위해, HCT116세포에 ERK1/2 억제제인 PD98059, p38 억제제인 SB203580, JNK 억제제인 SP600125, IKK 억제제인 BAY11-7082, GSK3 β 억제제인 LiCl 그리고 PI3K 억제제인 LY294002 를 각각 2시간 동안 전처리 후, RPL 100 μ g/mL을 3시간 동안 처리하고 I κ B- α 단백질 수준을 확인하였다. 그 결과, LiCl이 처리된 HCT116세포에서는 RPL에 의해 유도되는 I κ B- α 단백질의 수준감소가 줄어들었으나(Fig. 3E), PD98059, SB203580, SP600125, BAY11-7082, LY294002이 처리된 HCT116 세포에서는 RPL에 의해 유도되는 I κ B- α 단백질 수준감소가 줄어들지 않았다(Fig. 4A-F). 본 결과들은 RPL에 의해 유도되는 I κ B- α 의 단백질 분해가 GSK3 β 의존성이라는 것을 의미한다.

RPL의 HCT116에서 GSK3 β 활성화를 통한 I κ B- α 인산화와 p65 핵내 전이 유도 활성

HCT116세포에서 RPL의 I κ B- α 단백질 분해 유도가 GSK3 β 의존성임을 확인하였다. 앞서 조사한 결과를 바탕으로 HCT116 세포에서 RPL의 단백질 분해와 밀접한 관련이 있는 I κ B- α 인산화와 p65의 핵내 전이가 GSK3 β 에 의존하는지 조사하였다. HCT116세포에 GSK3 β 억제제인 LiCl 을 각각 2시간 동안 전처리 후, RPL 100 μ g/mL을 3시간 동안 처리하고 I κ B- α 단백질 수준을 확인하였다. 그 결과, RPL을 처리한 구간에 비해 LiCl을 전처리한 구간에서 I κ B- α 단백질 수준 감소가 LiCl 농도별로 줄어든다는 것을 확인하였다(Fig. 5A). HCT116세포에 GSK3 β 의 억제제인 LiCl을 2시간 전처리 후, RPL 100 μ g/mL을 1시간 처리하여 p65를 확인하였다. 그 결과, LiCl 처리에 의한 GSK3 β 의 억제는 RPL처리에 의해 야기되는 p65의 핵내 전이를 억제시켰다(Fig. 5B). RPL이 HCT세포에서 GSK3 β 활성화시키는지 조사하기 위해 RPL 100 μ g/mL을 시간별로 처리하였다. 그 결과, RPL은 1시간부터 GSK3 β 인산화를 통한 활성화가 진행되었다는 것을 확인하였다(Fig. 5C). 본 결과들을 미루어 볼 때, RPL은 GSK3 β 활성화를 통해 I κ B- α 의 분해를 유도하고, I κ B- α 의 분해를 통해 p65 핵내 전이를 유도한다는 것을 확인하였다.

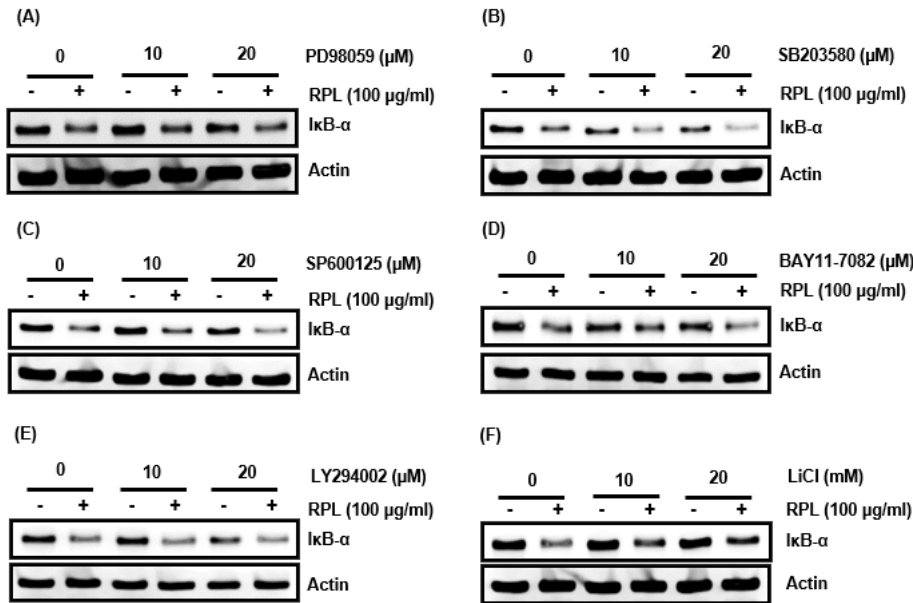


Fig. 4. Effect of MAPKs, IKK, PI3K and GSK3 β on I κ B- α proteasomal degradation by RPL in HCT116 cells. (A-F) HCT116 cells were pretreated with PD98059 (10 and 20 μ M), SB203580 (10 and 20 μ M), SP600125 (10 and 20 μ M), BAY11-7082 (10 and 20 μ M), LY294002 (10 and 20 μ M) and LiCl (10 and 20 mM) for 2 h, and then co-treated with 100 μ g/mL of RPL for 3 h. Western blot analysis was performed against I κ B- α . Actin was used as internal controls for Western blot.

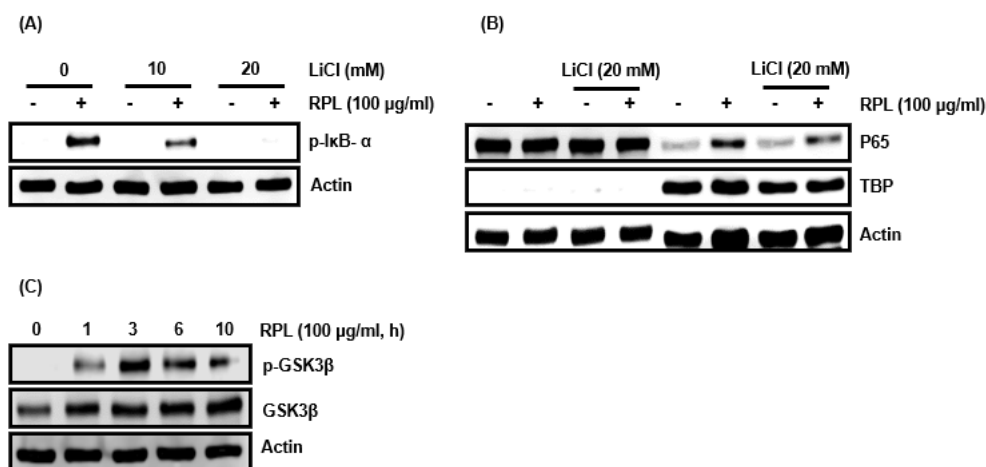


Fig. 5. Effect of RPL on $I\kappa B-\alpha$ phosphorylation and p65 nucleus accumulation through GSK3 β activation in HCT116 cells. (A) HCT116 cells were pretreated with LiCl (10 and 20 mM) for 2 h, and then co-treated with 100 μ g/mL of RPL for 3 h. (B) HCT116 cells were pretreated with LiCl (20 mM) for 2 h, and then co-treated with 100 μ g/mL of RPL for 1 h. (C) HCT116 cells were treated with 100 μ g/mL of RPL for the indicated times. Western blot analysis was performed against $I\kappa B-\alpha$, p65, p-GSK3 β and GSK3 β . Actin and TBP were used as internal controls for Western blot.

적 요

본 연구 결과들을 바탕으로 도깨비부채 잎(RPL)은 GSK3 β 활성화를 통해 $I\kappa B-\alpha$ 를 인산화시켜 단백질 분해를 유도하고 $I\kappa B-\alpha$ 분해로 인해 p65 핵내 전이를 유도하여 NF- κ B 신호전달을 활성화시킨다. 이러한 NF- κ B 신호전달 활성화를 통해 대장암의 세포생육을 억제하는 것으로 추정된다. 본 결과는 도깨비부채 잎을 소재로 항암을 목적으로 한 천연치료제 및 대체보완소재 개발에 활용할 수 있다고 판단된다. 그러나 도깨비부채 잎의 대장암에 대한 세포생육 억제와 작용기전의 정확한 관련성과 세포생육 억제활성 물질 분석을 위해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단 이공분야 기초연구사업 지역대학우수과학자 후속지원사업(NRF-2019R1D1A3A03103685)과 중점연구소지원사업(NRF-2018R1A6A1A03024862)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Arnold, M., M.S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray. 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66:683-691.
- Chin, Y.W., E.Y. Park, S.Y. Seo, K.D. Yoon, M.L. Ahn, Y.G. Suh, S.G. Kim and J. Kim. 2006. A novel iNOS and COX-2 inhibitor from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:4600-4602.
- Dolcet, X., D. Llobet, J. Pallares and X. Matias-Guiu. 2005. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 446:475-482.
- Jeong, J.B., X. Yang, R. Clark, J.E. Choi, S.J. Baek and S.H. Lee. 2013. A mechanistic study of the proapoptotic effect of tolfenamic acid: Involvement of NF- κ B activation. *Carcinogenesis* 34:2350-2360.
- Kim, H.N., J.D. Kim, H.J. Son, G.H. Park, H.J. Eo and J.B. Jeong. 2019. Anti-cancer activity of the leaf extracts of *Rodgersia podophylla* through β -catenin proteasomal degradation in human cancer cells. *Korean J. Plant Res.* 32(5):442-447.
- Kim, H.N., J.D. Kim, S.B. Park, H.J. Son, G.H. Park, H.J. Eo, H.S. Kim and J.B. Jeong. 2020. Anti-inflammatory activity of the extracts from *Rodgersia podophylla* leaves through activation of Nrf2/HO-1 pathway, and inhibition of NF- κ B

- and MAPKs pathway in mouse macrophage cells. *Inflamm. Res.* 69:233-244.
- Meyerhardt, J.A. and R.J. Mayer. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 352:476-87.
- Park, B.K., J.H. Lee, C.K. Cho, H.K. Shin, S.K. Eom and H.S. Yoo. 2008. Systemic review of clinical studies about oriental medical treatment of cancer in Korea. *Korean J. Orient. Int. Med.* 29(4):1061-1074.
- Wang, H., T.O. Khor, L. Shu, Z. Su, F. Fuentes, J.H. Lee and A.N.T. Kong. 2012. Plants against cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 12: 1281-1305.
- Wyllie, A.H., G.J. Beattie and A.D. Hargreaves. 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J.* 13:681-692.
- Zhang, S., C.N. Ong, H.M. Shen. 2004. Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 208:143-153.

(Received 12 May 2020 ; Revised 23 September 2020 ; Accepted 23 September 2020)