



닭 혈청을 포함한 배양액 조성 변화가 QM7 메추리 근육세포의 성장 및 분화에 미치는 영향 분석

최사랑¹ · 이상인² · 신상수^{2*}

¹경북대학교 대학원 축산BT학과 대학원생, ²경북대학교 축산생명공학과 교수

Effect of Culture Medium Containing Chicken Serum on Growth and Differentiation of QM7 Quail Muscle Cells

Sarang Choi¹, Sang In Lee² and Sangsu Shin^{2*}

¹Graduate Student, Department of Animal Science and Biotechnology, Graduate School, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea

²Professor, Department of Animal Biotechnology, Kyungpook National University, Sangju 37224, Republic of Korea

ABSTRACT QM7 cell, a quail muscle cell line, has been used in various studies. In cell culture, it is well known that the culture medium has a significant influence on cell growth and maintenance of cell characteristics. This study aimed to adjust the culture medium to make it more suitable for QM7 muscle cells. A culture medium was prepared by adding 2% chicken serum (CS) instead of 10% tryptose phosphate broth (TPB) to the conventional culture medium. In the culture medium prepared with CS, the QM7 muscle cells changed from a pointed, thin to a broader shape. In addition, they grew and divided more rapidly in the new culture medium than in the conventional culture medium. The number of cells increased faster in the CS-containing culture medium from day two after passaging, and significantly increased from day three. The muscle cells grown in the medium containing CS maintained their undifferentiated state prior to differentiation. Myotubes formed well when the cells were maintained in CS-containing medium, resulting in a longer length and uniformity. According to the above results, it is clear that the culture of QM7 myocytes using a medium containing CS rather than TPB helps obtain better results in cell maintenance and differentiation.

(Key words: QM7 cell, myocyte, muscle, myogenesis, chicken serum)

서 론

근육은 신체의 운동과 지지에 필수적인 조직이며, 근섬유(myofiber) 다발로 이루어져 있다. 이러한 근섬유들은 근원세포(myoblast)의 융합에 의해 형성된 다핵융합세포로 알려져 있다. 근원세포의 융합은 대부분의 유기체에서, 적절한 시간과 장소에서 이루어지는 근육 발달의 한 과정이다(Abmayr and Pavlath, 2012; Chal and Pourquie, 2017). 근육 관련 연구는 주로 인간의 질병과 단백질원으로서 근육 식품에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, 가축의 경우 산업 생산성을 높이기 위해, 근육의 양과 질을 향상시키기 위한 연구가 폭 넓게 진행되고 있다(Bowker and Zhuang, 2016;

Daughtry et al., 2017; Chen et al., 2019; Li et al., 2020).

근육 발달 연구에 있어서 중요한 재료 중 하나는 근원세포라고 할 수 있다. 가금분야에서는 메추리 섬유육종(fibrosarcoma) 유래의 근육세포주인 QM7 세포주가 있으며, 이를 이용하여 근육 분화, 발생, 유전자 및 단백질 기능 연구 등 다양한 분야에서 연구가 진행되었다(Antin and Ordahl, 1991; Metayer-Coustard et al., 2010; Shin et al., 2015; Kim et al., 2017). 근원세포를 이용한 근육 분화 연구에 있어서 중요한 것 중 하나는, 일반적인 상황에서는 근원세포가 분화 능력을 잃지 않고 그 상태를 유지하다가 분화가 유도되면 적절히 근섬유로 분화되는 것이다. 이러한 상태 변화는 주로 세포 배양액의 조성을 변화시켜 유도하게 된다.

* To whom correspondence should be addressed : sss@knu.ac.kr

세포 배양액은 세포가 체외환경에서 증식될 수 있도록 필요한 영양분이 들어있는 액체 배지이다. QM7 세포는 Medium 199를 기본 배지로 하여, tryptose phosphate broth(TPB)와 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 각각 10%씩 추가한 배양액을 사용해 배양하고 있다. TPB는 tryptose, dextrose, 염 등을 포함하고 있어, 아미노산과 에너지 공급 및 삼투압 조절과 pH 완충액 역할을 할 수 있다. 혈청은 세포의 성장과 부착을 위한 다양한 성장인자들이 포함되어 있으며, 보통의 경우 2-10% 배양액에 포함하여 사용한다. QM7 세포의 경우, FBS의 농도에 따라 10%에서는 미분화 상태를 유지할 수 있고, 반대로 0.5%에서는 분화를 유도할 수 있다(Antin and Ordahl, 1991).

본 연구에서는, 다른 세포주와 비교해서 성장 속도가 느린편에 속하는 QM7 세포의 성장을 개선하기 위한 방법을 모색했다. 이를 위해 세포 배양액에 초점을 맞췄으며, FBS는 세포 분화를 억제하기 위해 꼭 필요한 요소이므로, TPB를 대체할 수 있는 다른 소재를 조사했다. 그 결과 몇몇 연구에서 닭 혈청(chicken serum, CS)을 사용하는 것을 발견했다(Nasiri et al., 2013; Zeng et al., 2014; Park et al., 2018). 하지만 위 논문들에서는 TPB를 CS로 교체했을 때 세포에 생길 수 있는 변화에 대해서는 언급 없이 사용되고 있었다. QM7 세포는 근섬유로 분화할 수 있는 능력을 유지하는 것이 무엇보다 중요하므로, 배양액 조성을 바꿨을 때 세포에 영향이 없는지를 확인할 필요성이 있다. 세포 배양액은 세포를 키우는데 사용되지만, 경우에 따라서는 세포에 맞지 않아 세포를 죽이거나 분화시킬 수 있기 때문이다(Arora, 2013; Baust et al., 2017). 이러한 이유로 본 연구는 QM7 세포의 성장을 촉진할 수 있는 적절한 배양액을 찾기 위해 행해졌으며, 배양액 조성 변화가 QM7 세포의 분열과 분화에 미치는 영향을 조사했다.

재료 및 방법

1. 세포배양

QM7 세포 배양을 위해 사용한 배양액은, 기존 배양액인 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA), 10% TPB(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% antibiotic-antimycotic (ABAM; Gibo)를 포함한 Medium199(Sigma-Aldrich) 배양액과 비교를 위해 본 실험에서 사용한 10% FBS, 2% CS(Sigma-Aldrich), 1% ABAM을 포함한 Medium199 배양액이다. 새로운 배양 조건은 선행 연구 결과들을 참고하여 확립하였다(Kim et al., 2017; Kim et al., 2017; Lee et al., 2021).

각각의 배양액을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 세포를 배양하였으며, 세포가 분화되지 않도록 배양접시에 세포가 가득차기 전에 계대 배양하였다.

2. 세포분화

세포의 분화를 유도하기 위해, 기존에 사용한 분화배양액은 세포 배양액에서 FBS 농도만 0.5%로 낮춰 만들었으며, 본 실험에서 새롭게 사용한 분화배양액은 새로운 세포 배양액에서 FBS 농도는 0.5%로, CS 농도는 0.1%로 줄여서 사용하였다. 새로운 분화배양액 조건의 경우 기존 분화배양액과 비슷하게 일반 배양액을 1/20로 희석하는 방법을 이용해 확립했다. 8×10⁵개의 세포를 φ35 mm 배양접시에 넣은 후, 세포가 배양접시에 가득 차갈 때까지 배양한 후에 분화를 유도하는 배양액으로 바꿔주었다. 분화는 4일간 이루어졌으며, 2일째부터 배양액을 절반씩 새 분화 배양액으로 바꿔주었다.

3. 세포분열측정

세포의 분열 속도를 측정하기 위하여, 초기 1×10⁴ 개의 세포를 배양접시에서 넣은 뒤 4일 동안 배양했으며, 24시간 간격으로 세포 수를 측정하였다. 배양액은 2일째부터 24시간 간격으로 절반씩 바꿔주었다.

4. 면역형광염색

분화된 세포의 myosin heavy chain(MyHC)을 염색하기 위해 이전 연구방법을 사용하였으며, 간단히 다음과 같다(Lee and Shin, 2020). 배양접시에 있는 세포를 10% formalin으로 15분간 고정하고, 0.3% NP40으로 세포막에 투과성으로 만들어준다. 이후 PBST(phosphate buffered saline with 0.1% tween 20)에 5% non-fat dry milk를 녹여 비특이항원을 차단해주었다. 1차 항체는 anti-MyHC(MF20; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA)로, 2차 항체는 anti-mouse IgG-CruzFluorTM594(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)가 결합된 항체를 사용하였고, DAPI로 세포의 핵을 염색하였다. 세포의 사진은 도립형광현미경(CKX53; Olympus, Tokyo, Japan)과 카메라를 이용하여 얻었다.

5. Western Blot

QM7 세포를 PBS로 세척한 후 세포용해액을 이용하여 세포 단백질을 추출하였다. 세포 잔해물의 제거를 위해 4°C, 14,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액만 새 튜브에 옮

겨 동일한 양의 2X Laemmli sample buffer를 추가하여 끓여 주었다. Coomassie staining으로 단백질의 농도를 측정하였고, 단백질을 9% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, PVDF membrane에 옮겼다. 이후 TBST에 5% non-fat dry milk로 비특이항원을 차단해주었다. 1차 항체 anti-MyHC(NA4, Developmental Studies Hybridoma Bank)를 overnight으로 처리 후 2차 항체 anti-mouse IgG-HRP(cell signaling technology)를 1시간 처리하였다. ECL solution을 이용해 발광시킨 후 Chemidoc Imaging System을 사용하여 사진을 얻었다.

6. 통계분석

통계분석을 위해 SPSS-26 프로그램 내 이원분산분석법을 이용하여 데이터의 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 배양액의 변화가 QM7 메추리 근육세포에 미치는 영향을 조사하여, 새로운 배양액의 사용 가능 여부 및 기존 배양액에 비해 새 배양액의 장점을 판단하는데 있으며, 이를 위해 세포의 모양, 성장 및 분화 차이 등에서 세포의 특성 변화를 측정하였다. 따라서, 세포를 새 배양액에서 최소 5회 이상 계대 배양하여, 세포가 새 배양액에 적응된 상태를 만들었다. 배양액의 차이가 세포에 미치는 여러가지 영향 중, 우선 세포 배양액의 차이에 의한 세포 모양 변화 여부를 검증하였다. TPB를 사용한 기존 배양액에서 자란 세포는 가늘고 긴 형태를 보이지만, CS로 대체하여 만든 배양액에서 자란 세포는 길이는 비슷한 반면, 대조군보다는 덜 뾰족하고 조금 더 넓은 형태를 보였다(Fig. 1). 즉 배양액의 변화에 의해 세포의 형태적 변화가 발생했음을 확인하였다.

다음은 배양액의 변화에 따른 QM7 세포의 성장 및 분열 속도 변화 여부를 조사하였다. 결과적으로, QM7 세포는 TPB를 넣어 만든 배양액에서보다 CS를 넣어 만든 배양액에서 더 빠르게 분열함을 확인하였다. 초기에 같은 수의 세포를 이용하여 배양을 시작했을 때, Day 2까지는 배양액에 따라 큰 차이 없이 세포들이 비슷한 속도로 분열하여 비슷한 수를 유지하였다. 그러나 Day 3에서부터는 TPB를 넣어 만든 배양액에서보다 CS를 넣어 만든 배양액에서 세포의 수가 유의적으로 증가하기 시작했으며, Day 4에서는 약 2배 정도 많은 수의 세포로 늘어났다($P < 0.05$, Fig. 2). 즉, Day 0에서 Day 2까지는 세포 분열이 비슷한 속도로 일어나지만, Day 3 이후에는 CS를 넣어 만든 배양액에서 세포의 분열이

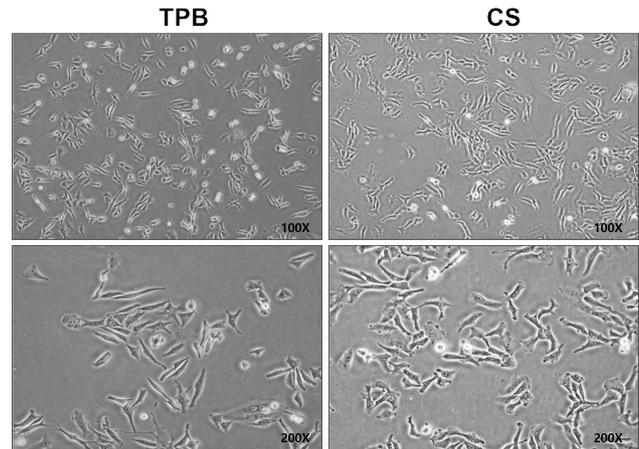


Fig. 1. The shape of cells cultured in a conventional medium containing TPB or a CS-containing new medium. The cells cultured in a new medium have wider and less pointed shape than cells in conventional medium. Magnifications are 100 \times or 200 \times .

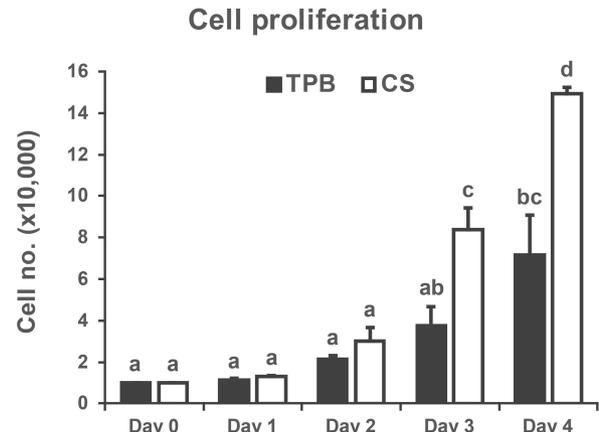


Fig. 2. Comparison of QM7 cell proliferation depending on the medium. The number of cells started to increase after day 2 and significantly increased by more than 2 folds in the CS-containing medium on day 3. The data were shown as mean+SEM. The letters on the bars indicate that the bars with the same letter are not significant between them ($P < 0.05$).

더 잘 이루어지는 것을 확인하였다. 이는 세포 계대 시, 초기에는 세포의 회복에 시간이 필요하고, CS가 세포를 빠르게 회복시키고 안정화시켰으며, 이후 세포 분열도 빠르게 유도하였을 것으로 사료된다.

다음은 각각의 배양액에서 배양된 세포들의 분화 시, 서로 차이가 있는지를 확인해 보았다. 이는 세포가 안정화되고 빠르게 분열하였다고 하더라도, 원래 특성을 잃어버린 세포는 연구목적에 맞게 쓰일 수 없기 때문이다. TPB를 넣어 만든 배양액에서 배양한 세포들은 원래의 분화 유도 배

양액을 사용하여 분화를 유도했으며, 결과적으로 분화한 세포들은 짧고 두꺼운 근섬유로 분화하고 근섬유의 모양 또한 일정하지 않았다(Fig. 3). 반면, CS를 넣어 만든 배양액에서 배양한 세포는 FBS와 CS의 농도를 1/20로 줄인 분화 유도 배양액을 이용하여 분화시켰으며, 분화한 세포들은 근섬유가 서로 이어진 길고 일정한 모양의 근섬유로 분화하였다(Fig. 3). 근육세포의 분화 정도와 근섬유의 모양 차이를 확실히 보기 위해 MyHC를 특이적으로 면역형광염색하였다. Fig. 3에서 관찰하였던 바와 같이, CS를 넣어 만든 배양액에서 키워 분화한 세포들은 전체적으로 길고 일정한 모양의 근섬유를 형성한 반면, TPB를 넣어 만든 배양액에서 키워 분화한 세포들은 전체적으로 짧고 모양이 일정하지 못한 근섬유를 형성하였다(Fig. 4). 세포 분화 정도의 양적 비교를 위해, western blot을 이용하여 MyHC 단백질의 발현 양 분석을 하였다(Fig. 5). 분화가 이루어진 Day 4에서, MyHC 단백질량은 두 군에서 거의 차이가 없었다. 앞에서 근관의 모양이 차이가 나므로 MyHC의 양이 다를 것이라 생각했지만, 실제로 MyHC의 양은 크게 다르지 않았으며, 이는 근관이

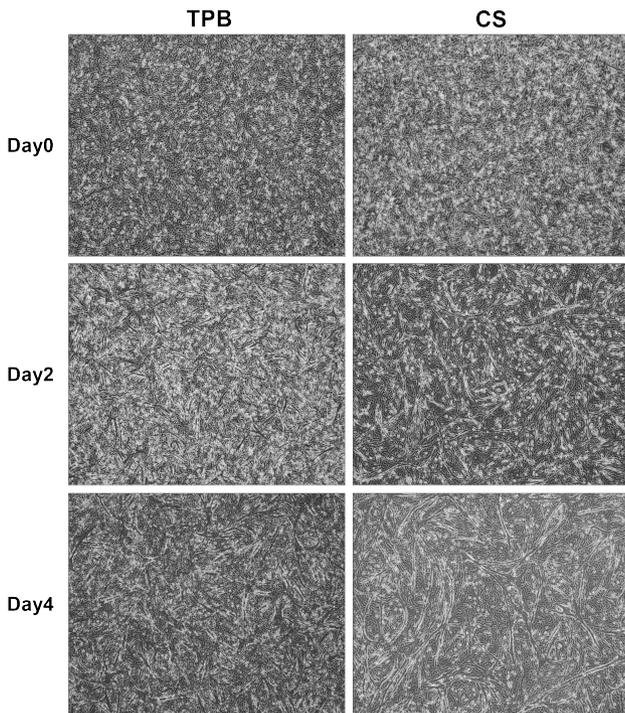


Fig. 3. Differentiation of QM7 cells grown in different media containing TPB or CS. Cells cultured in a medium with TPB differentiated into short, thick, and ununiform muscle fibers. On the other hand, cells cultured in a medium containing CS differentiated into long and uniformly shaped muscle fibers connected to the other fibers. Magnification is 40x.

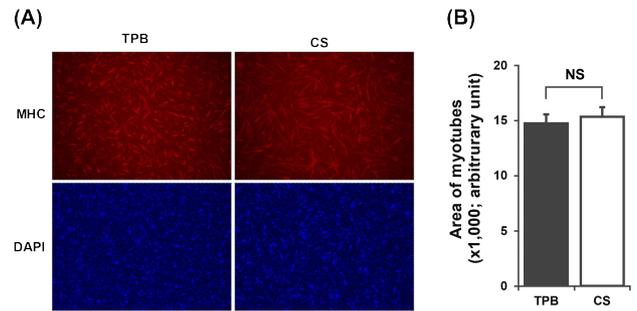


Fig. 4. Myotube of QM7 cells grown in different media containing TPB or CS. (A) The myotube (red) and nucleus (blue) were stained with MyHC antibody and DAPI at day 4 of differentiation, respectively. The myotubes formed from QM7 cells grown in a CS-containing medium were longer and interconnected. (B) Total areas of myotubes in each group were not significantly different from each other. NS means non-significant difference. Magnification is 40x.

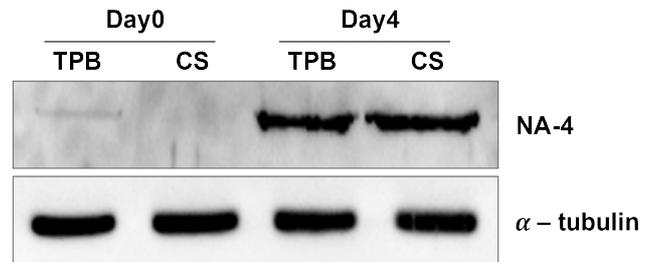


Fig. 5. Western blot analysis of MyHC protein expression in QM7 cells. The differentiation of QM7 cells was analyzed by determining the expression of MyHC proteins by western blot using the MyHC antibody (NA4). MyHC expressed slightly in QM7 cells grown in TPB-containing medium from day 0 of differentiation while was not detected in QM7 cells grown in CS-containing medium. On day 4 of differentiation, MyHC expressed similarly in both groups.

적은 TPB를 이용한 군에도 실제로는 분화 중이지만 아직 근관을 형성하지 못한 세포들이 많이 있을 것으로 유추된다. 흥미롭게도, 분화를 유도하기 직전인 Day 0에서 CS를 이용한 군에서는 MyHC가 탐지되지 않았지만 TPB를 이용한 군에서는 MyHC가 탐지되었으며, 이는 TPB를 이용한 군에서 벌써 분화가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 배양접시에서 근세포를 분화시키기 위해 필요한 조건 중 하나는 세포들이 밀착되는 것인데, 세포들이 밀착된 상태에서 TPB를 이용한 배양액은 세포의 분화를 막지 못한다는 것을 의미한다. 반면 CS를 이용한 배양액은 세포들이 밀착된 상태에서도 TPB를 이용한 배양액보다 어느 정도 분화를 방지할 수 있음을 알 수 있다. 이는 세포 분화 유도를 동기화하는데 있

어서 중요한 요소 중 하나이기도 하다.

이상의 결과에서, CS를 이용한 배양액은 기존에 사용되어온 배양액에 비해 QM7 근육세포의 회복과 성장에 좋은 영향을 미치며, 특히 세포가 많은 상태에서도 세포의 특성을 유지시켜주는 능력이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다. QM7 세포는 약간 불안정한 세포로, 실제로 판매처에서도 간헐적인 세포 클로닝을 통해 그 특성을 유지해야 한다고 안내하고 있는 바, CS의 이용은 QM7세포의 특성 유지에 일정 정도 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 CS의 이용은, 세포 분화 유도 시, 세포들이 일관성 있게 분화될 수 있도록 도와줌으로써, 연구 목적에 부합하는 결과를 좀더 쉽고 정확하게 얻을 수 있음을 의미한다. 이러한 결과는, 다른 세포를 이용한 연구들에서도 보여진 바와 같이, TPB에 포함된 성장인자들보다 CS에 포함된 성장인자들이 QM7 근육세포의 성장과 특성 유지에 더 알맞기 때문일 것으로 유추된다(Lee et al., 2009; Kim et al., 2019). 본 연구의 결과를 통해, QM7 근육세포를 배양하는데 있어서 TPB를 이용하는 것보다 CS를 이용하는 것이 더 바람직할 것으로 사료된다.

적 요

매추리 근육세포주인 QM7 세포는 다양한 연구에서 이용되고 있다. 세포배양에 있어서, 배양액의 조건은 세포의 성장과 분열에 많은 영향을 미친다고 알려져 있다. 본 연구는 QM7 근육세포 배양에 좀더 적절한 배양액 조성을 맞추어 나가기 위해 진행되었다. 이를 위해 세포배양 시, 기존에 사용하던 배양액에서 10% tryptose phosphate broth(TPB) 대신 2% chicken serum(CS)를 넣어 만든 배양액을 기존 배양액을 사용하는 경우와 비교하였다. CS를 넣어 만든 배양액에서 QM7 근육세포는 가늘고 뾰족한 모양에서 좀더 넓어지는 모양으로 바뀌었다. 또한, 기존 배양액에서보다 CS를 넣어 만든 배양액에서 더 빠르게 성장하고 분열하였다. 이는 세포 계대 후 2일차부터 증가하기 시작하여 3일차부터는 세포 수가 유의적으로 많았다. CS를 넣은 배양액에서 유지한 근육세포는 분화 전에는 그 미분화 상태를 잘 유지하고 있다가, 분화를 유도하면 근관 형성이 잘 일어나 길이가 좀더 길고 일정하게 분화되는 것을 확인하였다. 이상의 결과에 따라, QM7 근육세포를 배양하는데 있어서 TPB를 이용하는 것보다 CS를 이용하면, 세포의 유지 및 분화에 있어 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

(색인어 : QM7세포, 근원세포, 근육, 근생성, 닭혈청)

사 사

이 성과는 2016년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2016R1C1B1013407).

ORCID

Sarang Choi <https://orcid.org/0000-0002-5488-146X>
Sang In Lee <https://orcid.org/0000-0002-0019-1834>
Sangsu Shin <https://orcid.org/0000-0002-5264-9632>

REFERENCES

- Abmayr SM, Pavlath GK 2012 Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Dev* 139(4):641-656.
- Antin PB, Ordahl CP 1991 Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol* 143(1):111-121.
- Arora M 2013 Cell culture media: a review. *Mater Methods* 3(175):24.
- Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, Price P, Reid YA, Simone F 2017 Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 53(8):669-672.
- Bowker B, Zhuang H 2016 Impact of white striping on functionality attributes of broiler breast meat1. *Poult Sci* 95(8):1957-1965.
- Chal J, Pourquoi O 2017 Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Dev* 144(12):2104-2122.
- Chen X, Ouyang H, Chen B, Li G, Wang Z, Nie Q 2019 Genetic effects of the EIF5A2 gene on chicken growth and skeletal muscle development. *Livest Sci* 225:62-72.
- Daughtry MR, Berio E, Shen Z, Suess EJR, Shah N, Geiger AE, Berguson ER, Dalloul RA, Persia ME, Shi H, Gerrard DE 2017 Satellite cell-mediated breast muscle regeneration decreases with broiler size. *Poult Sci* 96(9):3457-3464.
- Kim K-W, Jeon D, Lee J, Lee S-S, Kim S, Kim C-L, Lee S-H 2019 Influence of various serum supplement on *in vitro* culture for goat embryos. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society* 20(9):510-516.
- Kim SW, Lee JH, Park BC, Park TS 2017 Myotube differentiation

- in clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-mediated MyoD knockout quail myoblast cells. *Asian-Australas J Anim Sci* 30(7):1029-1036.
- Kim SW, Lee JH, Park TS 2017 Functional analysis of SH3 domain containing ring finger 2 during the myogenic differentiation of quail myoblast cells. *Asian-Australas J Anim Sci* 30:1183-1189.
- Lee DM, Choi MS, Woo GI, Shin YM, Lee KH, Cheon YP, Chun T, Choi I 2009 Effect of gender-specific bovine serum supplemented medium on cell culture. *J Anim Sci Technol* 51(5):413-420.
- Lee I, Shin S 2020 Cloning and characterizing of the quail chibby family member 2 (CBY2) Gene in quail muscle cells. *Korean J Poult Sci* 47(3):127-133.
- Lee KY, Loh HX, Wan ACA 2021 Systems for muscle cell differentiation: from bioengineering to future food. *Micro-machines* 13(1):71.
- Li R, Zeng W, Ma M, Wei Z, Liu H, Liu X, Wang M, Shi X, Zeng J, Yang L, Mo D, Liu X, Chen Y, He Z 2020 Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang small spotted pigs. *Transgenic Res* 29(1):149-163.
- Metayer-Coustard S, Mameri H, Seiliez I, Crochet S, Crepieux P, Mercier Y, Geraert PA, Tesseraud S 2010 Methionine deprivation regulates the S6K1 pathway and protein synthesis in avian QM7 myoblasts without activating the GCN2/eIF2 alpha cascade. *J Nutr* 140(9):1539-1545.
- Nasiri V, Dalimi A, Ghaffarifar F 2013 Use of chicken (*Gallus gallus*) serum as a costly replacement for the fetal calf serum in cultivation of promastigotes of *Leishmania infantum*. *Asian Pac J of Trop Dis* 3(3):169-173.
- Park JW, Lee JH, Kim SW, Han JS, Kang KS, Kim SJ, Park TS 2018 Muscle differentiation induced up-regulation of calcium-related gene expression in quail myoblasts. *Asian-Australas J Anim Sci* 31(9):1507-1515.
- Shin S, Choi YM, Suh Y, Lee K 2015 Delta-like 1 homolog (DLK1) inhibits proliferation and myotube formation of avian QM7 myoblasts. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 179:37-43.
- Zeng Q, Wang L, Shu G, Wang S, Zhu X, Gao P, Xi Q, Zhang Y, Zhang Z, Jiang Q 2014 Decorin-induced proliferation of avian myoblasts involves the myostatin/Smad signaling pathway. *Poult Sci* 93(1):138-146.

Received May 10, 2022, Revised Jun. 14, 2022, Accepted Jun. 19, 2022