

IL-15 对膝关节骨性关节炎患者外周血单个核细胞的影响

汪 昊 徐 斌 魏松松 徐洪港 王 瑞 吴 磊 李 博

摘要 目的 探讨膝骨性关节炎(KOA)患者与健康对照者血清中白细胞介素 15(IL-15)的变化。方法 选取 30 例 KOA 患者和 35 例健康成人外周血,将 KOA 组分为两组,一是实验组加入 IL-15(10 ng/ml),二是不加 IL-15 作为本组对照组。将 HC 组也分为两组,一是实验组加入 IL-15(10 ng/ml),二是不加 IL-15 作为本组对照组。采用 ELISA 法检测 KOA 组和健康对照组外周血清中 IL-15 的水平,采用流式细胞仪检测 IL-15 对 KOA 患者和健康对照者外周血自然杀伤(NK)细胞受体表达的影响,以及采用 ELISA 法检测 IL-15 对外周血单个核细胞(PBMCs)产生肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和干扰素 γ (IFN- γ)水平的影响。结果 KOA 组血清 IL-15 水平比对照组升高。IL-15 可增强 KOA 组外周血 NK 细胞受体 CD69、CD94 和 NKG2D 的表达。KOA 组细胞培养后上清液中 TNF- α 与 IFN- γ 的含量高于对照组。结论 IL-15 拮抗剂可能成为阻止或延缓 KOA 进展的一种新治疗选择。

关键词 膝骨性关节炎;白细胞介素 15;自然杀伤细胞;肿瘤坏死因子 α ;干扰素 γ

中图分类号 R 684.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1617-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.021

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种慢性退行性关节疾病,OA 以滑膜炎和软骨破坏为特征^[1-2], OA 在早期阶段,其关节内部发生的分解作用和抗炎合成过程也在持续发生,其中关键作用是免疫细胞和细胞因子网络内的相互作用^[3-4],所以细胞因子在 OA 的进展中起着重要作用。有研究^[5]显示 OA 患者滑膜中有大量 NK 细胞浸润,且 NK 细胞比例随着疾病严重程度的增加而上升,提示了 NK 细胞确实参与了 OA 的进展。NK 细胞能够通过释放细胞因子如干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)促进炎症的发生^[6]。前期的预实验显示膝骨性关节炎

(knee osteoarthritis, KOA)患者外周血中白细胞介素 15(interleukin-15, IL-15)水平高于健康对照者。该研究主要分析 IL-15 对 KOA 患者和健康对照者外周血中 NK 细胞受体及单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象 KOA 外周血标本取自 30 例安徽医科大学第一附属医院患有 KOA 的住院患者,其中男 14 例,女 16 例,年龄 61~74(66.83 \pm 4.07)岁,所有患者均符合 KOA 诊疗指南(2018 年版)中的诊断标准,健康对照(healthy control, HC)组外周血来源于 35 例招募的无 KOA 病史的志愿者,男 20 例,女 15 例,年龄 18~49(33.65 \pm 7.91)岁,受试者的筛选均经高年资医师确认。排除标准:① 膝关节感染患者;② 类风湿性关节炎患者;③ 红细胞沉降率、类风湿因子升高患者;④ 滑膜炎患者;⑤ 近期服用非甾体类抗炎药患者。本研究通过本院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂 基因重组人 IL-15、BV510 标记的 CD3 单克隆抗体、BV421 标记的 CD56 单克隆抗体、FITC 标记的 CD69 单克隆抗体、PE-CY7 标记的 CD69 单克隆抗体、PE 标记的 CD94 单克隆抗体、APC 标记的 NKG2D 单克隆抗体均购自美国 BD 公司;淋巴细胞分离液(Ficoll)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)购自美国 Sigma 公司;RPMI-1640 培养液购自美国 HyClone 公司、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 HyClone 公司;青霉素、链霉素购自杭州市四季青生物技术有限公司;IL-15、TNF- α 及 IFN- γ 的 ELISA 定量试剂盒购自上海江莱生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 PBMCs 的制备和细胞培养 从存放外周血的乙二胺四乙酸(EDTA)管中取出 4 ml 新鲜外周血,用等体积 0.9% 氯化钠溶液稀释,并缓慢加入至 4 ml Ficoll 溶液表面,2 000 r/min 离心 30 min,轻轻吸出中间白色薄膜状细胞层,加入 PBS 重悬,1 800 r/min 离心洗 2 遍后,即可得到高纯度的 PBMCs。

2021-07-04 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH243)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院运动创伤与关节镜外科,合肥 230022

作者简介:汪 昊,男,硕士研究生;

徐 斌,男,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: youchen100@126.com

用 0.4% 锥虫蓝溶液染色后用细胞计数仪检测细胞总数和活细胞数,并用 RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度为 2.0×10^6 /ml 加入到 24 孔板中,将 KOA 组分为两组,一是实验组加入 IL-15(10 ng/ml),二是不加 IL-15 作为本组对照组。将 HC 组也分为两组,一是实验组加入 IL-15(10 ng/ml),二是不加 IL-15 作为本组对照组。将培养板放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

1.3.2 CCK-8 检测 PBMCs 增殖能力 取提纯得到的高纯度 PBMCs,接种细胞悬液(5 000 个/孔)于 96 孔板中,实验组加入 IL-15(10 ng/ml),对照组加等量完全培养基,放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。在每孔内加入 10 μl 的 CCK-8 试剂,培养板放置培养箱内继续培养 4 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,该实验重复 3 次。

1.3.3 流式细胞仪检测外周血 NK 细胞表面受体的表达情况 培养后的细胞悬液中加入 BV510-CD3、BV421-CD56、FITC-CD69、PE-CY7-CD69、PE-CD94、APC-NKG2D 避光共孵育 30 min,以分析 NK 细胞表面受体 CD69、CD94 和 NKG2D 的表达状况,采用 Beckman Coulter 流式细胞仪进行检测,用 CytExpert 软件进行分析。

1.3.4 细胞因子测定 空腹采集前臂静脉血 3 ml,待试管中血液凝血后吸取试管中的上清液 3 000 r/min 离心 10 min 标本于 -80 °C 保存。将 PBMCs 培养 24 h 后保留的上清液标本 3 000 r/min 离心 10 min 标本于 -80 °C 保存。两者均应用 ELISA 法检测,分析方法和操作步骤按说明书进行,最低检测浓度小于 0.1 pg/ml。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 版软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据差异

采用 *t* 检验进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KOA 组与 HC 组外周血 IL-15 的水平 KOA 组外周血清中 IL-15 水平与 HC 组比明显升高,差异有统计学意义($t = 8.598, P < 0.01$)。见图 1。

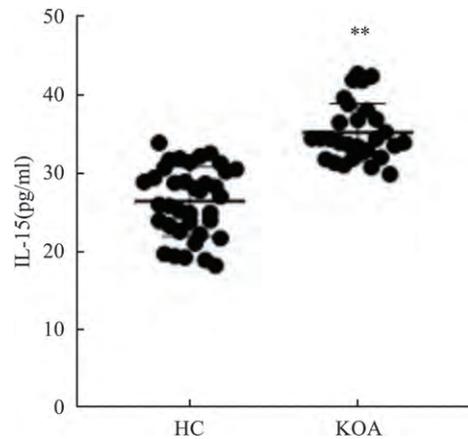


图1 两组外周血中 IL-15 水平比较与 HC 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 IL-15 对两组 PBMCs 增殖能力的影响 结果显示 IL-15 对 KOA 组与 HC 组 PBMCs 的增殖能力并无影响,说明 IL-15 对 NK 细胞表面受体和 PBMCs 分泌细胞因子的影响并非由细胞增殖引起的,而是 IL-15 通过对细胞的刺激引起的。见图 2。

2.3 IL-15 对 NK 细胞 CD69、CD94、NKG2D 表达的影响

2.3.1 IL-15 对 NK 细胞 CD69 表达的影响 图 3 结果显示未加 IL-15(10 ng/ml) 培养的 KOA 组与 HC 组 NK 细胞表面受体 CD69⁺ 的表达基本没有变

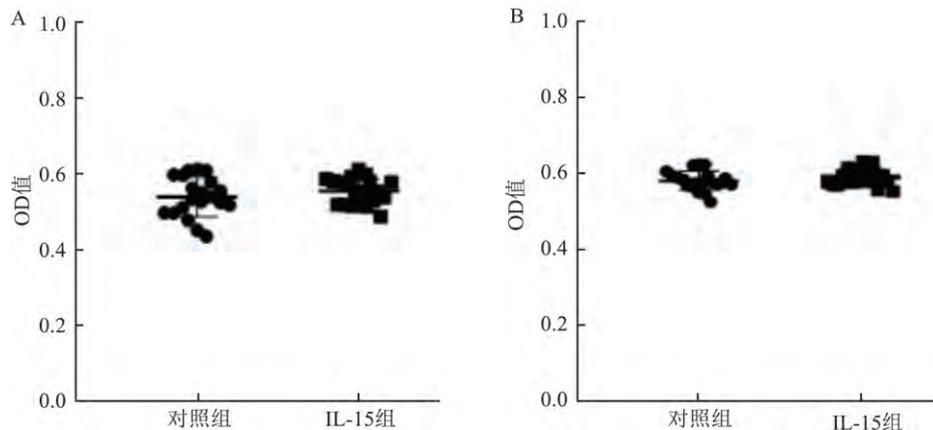


图2 CCK-8 实验检测 IL-15 对两组 PBMCs 增殖能力的影响

A: IL-15 对 HC 组 PBMCs 增殖能力影响的半定量分析; B: IL-15 对 KOA 组 PBMCs 增殖能力影响的半定量分析

化。经 IL-15(10 ng/ml) 刺激培养后分别增强了 HC 组 NK 细胞表面受体 CD69⁺ 的表达($t = 6.181, P < 0.01$) 和 KOA 组 NK 细胞表面受体 CD69⁺ 的表达($t = 7.085, P < 0.01$), 差异有统计学意义。说明 IL-15 能够升高 NK 细胞表面受体 CD69⁺ 的表达。

2.3.2 IL-15 对 NK 细胞 CD94 表达的影响 图 4 结果显示未加 IL-15(10 ng/ml) 培养的 KOA 组与 HC 组 NK 细胞表面受体 CD94⁺ 的表达基本没有变化。经 IL-15(10 ng/ml) 刺激培养后分别增强了 HC 组 NK 细胞表面受体 CD94⁺ 的表达($t = 3.033, P <$

0.01) 和 KOA 组 NK 细胞表面受体 CD94⁺ 的表达($t = 2.764, P < 0.01$), 差异有统计学意义。说明 IL-15 能够升高 NK 细胞表面受体 CD94⁺ 的表达。

2.3.3 IL-15 对 NK 细胞 NKG2D 表达的影响 图 5 结果显示未加 IL-15(10 ng/ml) 培养的 KOA 组比 HC 组 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达明显升高($t = 4.007, P < 0.01$)。经 IL-15(10 ng/ml) 刺激培养后分别增强了 HC 组 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达($t = 9.752, P < 0.01$) 和 KOA 组 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达($t = 6.107, P < 0.01$), 差异有

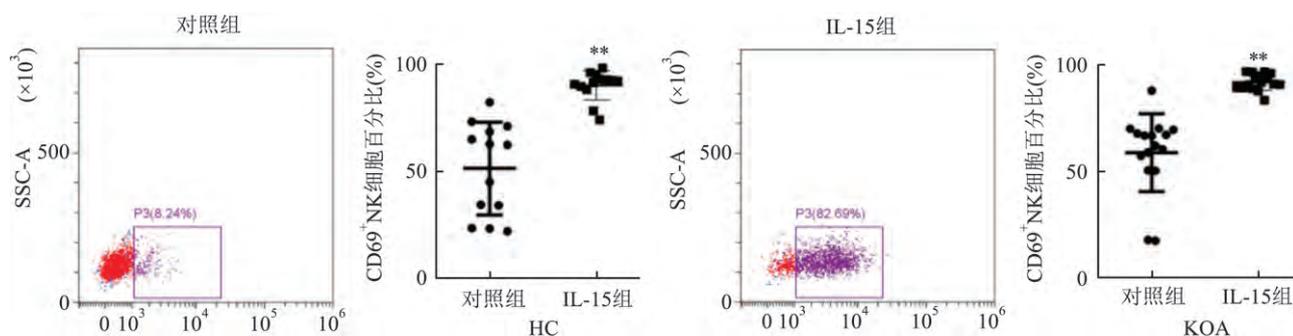


图3 流式细胞术检测 NK 细胞表面受体 CD69⁺ 的表达和 CD69⁺ NK 细胞半定量分析图
与对照组比较: ** $P < 0.01$

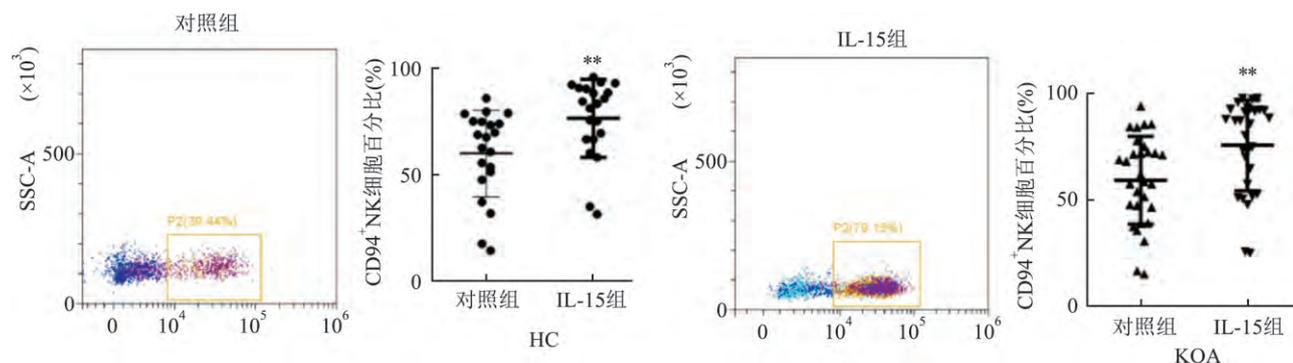


图4 流式细胞术检测 NK 细胞表面受体 CD94⁺ 的表达和 CD94⁺ NK 细胞半定量分析图
与对照组比较: ** $P < 0.01$

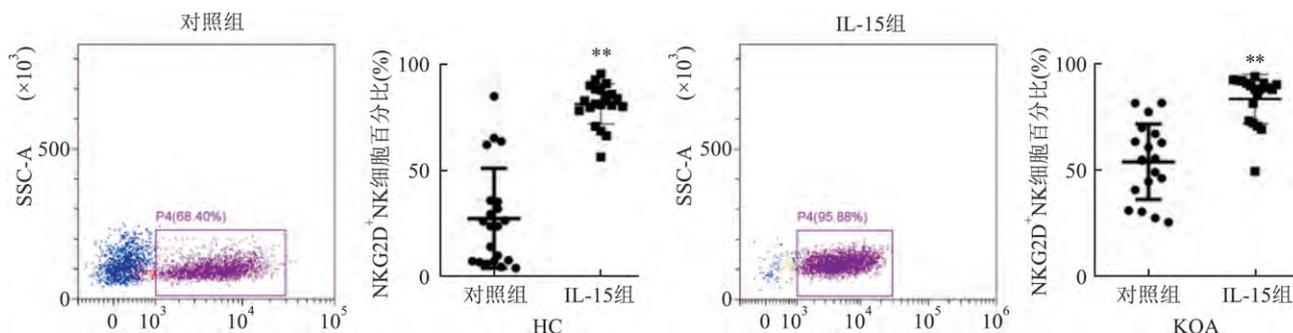


图5 流式细胞术检测 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达和 NKG2D⁺ NK 细胞半定量分析图
与对照组比较: ** $P < 0.01$

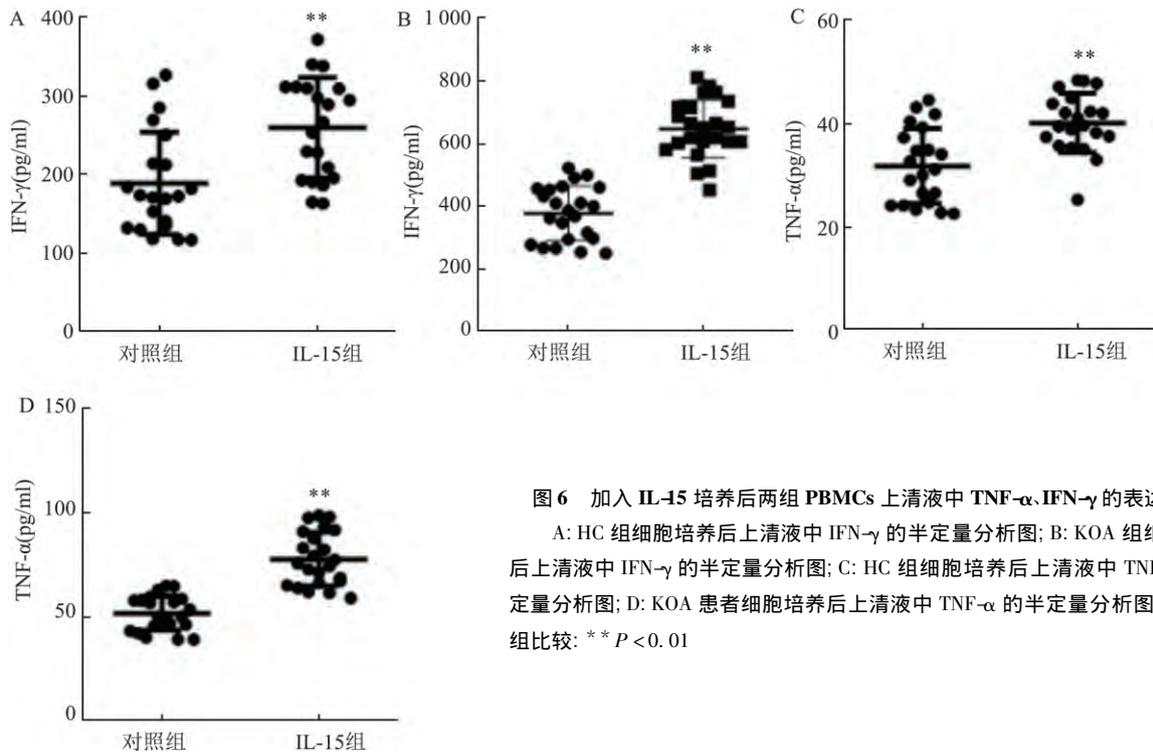


图6 加入 IL-15 培养后两组 PBMCs 上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的表达含量
 A: HC 组细胞培养后上清液中 IFN- γ 的半定量分析图; B: KOA 组细胞培养后上清液中 IFN- γ 的半定量分析图; C: HC 组细胞培养后上清液中 TNF- α 的半定量分析图; D: KOA 患者细胞培养后上清液中 TNF- α 的半定量分析图; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

统计学意义。说明 IL-15 能够升高 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达。

2.4 加入 IL-15 (10 ng/ml) 培养后两组 PBMCs 上清液中 TNF- α 、IFN- γ 的表达含量 图6显示 KOA 患者的 PBMCs 经培养后上清液中 TNF- α 和 IFN- γ 的含量均比 HC 组升高。图6A和图6C结果显示 HC 组加入 IL-15 (10 ng/ml) 细胞培养后的上清液中 IFN- γ ($t = 3.554, P < 0.01$) 和 TNF- α ($t = 4.144, P < 0.01$) 的含量比未加入的 HC 组明显升高。图6B和图6D结果显示 KOA 组加入 IL-15 (10 ng/ml) 细胞培养后的上清液 IFN- γ ($t = 10.19, P < 0.01$) 和 TNF- α ($t = 8.177, P < 0.01$) 的含量比未加入的 HC 组明显升高, 差异有统计学意义。说明 IL-15 能够提高 KOA 患者和健康对照者 PBMCs 产生 TNF- α 和 IFN- γ 的能力, 且 KOA 患者的 PBMCs 对 IL-15 的刺激反应性更强。

3 讨论

首先通过对 KOA 组和 HC 组外周血 IL-15 的测定来分析两者是否存在差异性, 实验结果显示 KOA 患者外周血 IL-15 水平明显高于 HC 组。所以 KOA 患者外周血中升高的 IL-15 可能参与疾病的发生与发展。

根据 NK 细胞表面 CD56 分子的密度, NK 细胞可分为 CD56^{dim} 和 CD56^{bright} 两个亚群。CD56^{dim} NK

细胞具有细胞毒性作用, CD56^{bright} NK 细胞能够产生丰富的细胞因子^[7], NK 细胞可能通过其细胞毒性和释放细胞因子参与 OA 的进展。然而 NK 细胞的效应功能受激活和抑制受体信号之间的平衡调节^[8]。其中 CD69 是 NK 细胞表面一种激活型受体, 可在细胞被激活后迅速诱导表达, 由于 CD69⁺ NK 细胞能够诱导单核细胞释放 TNF- α , 因此被认为是促进炎症产生的一种表达受体^[9], 并可能同时启动由 NK 细胞介导的免疫攻击。在加入 IL-15 (10 ng/ml) 培养的情况下 KOA 组和 HC 组 NK 细胞的 CD69⁺ 受体表达均升高。说明在 IL-15 升高的情况下, NK 细胞被激活, 其细胞表面的 CD69⁺ 受体迅速表达, 进而可能引起 NK 细胞通过分泌细胞因子来促进或抑制其他免疫细胞的功能。

NKG2D 是能识别癌细胞和病毒感染细胞表达的应激诱导配体, 对提高 NK 细胞毒性至关重要^[10]。在未加入 IL-15 (10 ng/ml) 培养的情况下 KOA 组 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达与 HC 组比明显升高, 说明 KOA 组的 NK 细胞可能已经处于某种激活状态。在加入 IL-15 (10 ng/ml) 后, KOA 组和 HC 组 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达均升高, 说明 IL-15 能够升高 NK 细胞表面受体 NKG2D⁺ 的表达, 从而可能提高 NK 细胞的细胞毒性来参与 KOA 的免疫应答反应。

CD94 是 NK 细胞上表达的一种抑制性受体, 然

而在许多情况下抑制信号支配激活信号,因此可能通过 CD94 抑制受体表达的增多来激活 NK 细胞增强其对靶细胞的反应^[11]。实验结果显示 IL-15 能够增强 KOA 组和 HC 组 NK 细胞受体 CD94⁺ 的表达,所以 IL-15 可能通过增加 CD94⁺ 的表达从而调节 NK 细胞功能进而参与 KOA 的发生与发展。

实验结果显示加入 IL-15 (10 ng/ml) 细胞培养后上清液中的 TNF- α 和 IFN- γ 的水平均显著增高,且 KOA 组加入或者未加入 IL-15 的结果均比 HC 组明显升高,说明 KOA 患者的 PBMCs 已经发生某些改变,促使 KOA 患者的 PBMCs 对 IL-15 的刺激敏感性更高,并且分泌细胞因子的能力提高,这可能与 KOA 的疾病状态有关系。已有研究^[12]表明 TNF- α 在 OA 的发病机制中起着重要作用,其通过刺激蛋白酶和 PGE2 的产生,并诱导滑膜细胞和软骨细胞产生其他细胞因子,导致关节组织加速损伤。TNF- α 和 IFN- γ 也可以通过诱导 IL-6 的产生从而抑制 II 型胶原的产生,并通过增加 MMPs 组酶的产生促进 KOA 的发生与发展^[13]。由此可以看出 TNF- α 和 IFN- γ 对 OA 的发生发展起着重要作用。而 KOA 患者本身外周血升高的 IL-15 可能是疾病发生的一个重要环节,可通过进一步促进 TNF- α 和 IFN- γ 炎性细胞因子水平的产生来加速 KOA 的发生与发展。

参考文献

- [1] 张思成,袁亮,宁波等.大鼠 DDH 关节软骨早期退变和 X 型胶原、基质金属蛋白酶 13 表达相关性的研究[J].安徽医科大学学报 2015, 50(6): 765-9.
- [2] 张可可,毕意辉,陈学周等.建立大鼠骨性关节炎模型及补体复合物表达研究[J].安徽医科大学学报 2016, 51(12): 1785-90.

- [3] Griffin T M, Scanzello C R. Innate inflammation and synovial macrophages in osteoarthritis pathophysiology[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 120(5): 57-63.
- [4] Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammation in osteoarthritis[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2019, 37 Suppl 120(5): 48-56.
- [5] Jaime P, García-Guerrero N, Estella R, et al. CD56⁺/CD16⁻ natural killer cells expressing the inflammatory protease granzyme A are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2017, 25(10): 1708-18.
- [6] Sivori S, Vacca P, Del Z G, et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2019, 16(5): 430-41.
- [7] Khan M, Arooj S, Wang H. NK cell-based immune checkpoint inhibition[J]. *Front Immunol*, 2020, 13(11): 167.
- [8] Han B, Mao F, Zhao Y, et al. Altered NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 expression on circulating NK cells is associated with tumor progression in human gastric cancer[J]. *J Immunol Res*, 2018, 3(2018): 6248590.
- [9] Gonzalez-Amaro R, Cortes J R, Sanchez-Madrid F, et al. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(10): 625-32.
- [10] Zingoni A, Molfetta R, Fionda C, et al. NKG2D and its ligands: "One for all, all for one" [J]. *Front Immunol*, 2018, 12(9): 476.
- [11] Kamiya T, Seow S V, Wong D, et al. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(5): 2094-106.
- [12] Wang T, He C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 44: 38-50.
- [13] Grieshaber-Bouyer R, Kammerer T, Rosshirt N, et al. Divergent mononuclear cell participation and cytokine release profiles define hip and knee osteoarthritis[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(10): 1631.

Effect of interleukin - 15 on peripheral blood mononuclear cells in patients with knee osteoarthritis

Wang Hao, Xu Bin, Wei Songsong, et al

(Dept of Sports Trauma and Arthroscopic Surgery,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the changes of serum interleukin-15 (IL-15) in patients with knee osteoarthritis (KOA) and healthy controls. **Methods** The peripheral blood of 30 KOA patients and the peripheral blood of 35 healthy adults were selected. The KOA group was divided into two groups, one was the experimental group with IL-15 (10 ng/ml), and the other was without IL-15 as the control group. The HC group was also divided into two groups, one was the experimental group with IL-15 (10 ng/ml), and the other was without IL-15 as the control group. ELISA method was used to detect the level of IL-15 in peripheral blood of KOA group and healthy control

可注射型富血小板纤维蛋白联合封闭式负压引流技术 治疗慢性难愈性创面的应用研究

陈道才¹, 谢娟¹, 李红红¹, 朱邦中¹, 陈增红¹, 娄寅¹, 方颖², 曹东升¹

摘要 目的 探讨可注射型富血小板纤维蛋白(i-PRF)联合封闭式负压引流(VSD)技术治疗慢性难愈性创面的疗效。方法 选取80名慢性难愈创面患者,随机均分为对照组和i-PRF组。对照组予创面清创后行封闭式负压引流治疗,i-PRF组予创面清创后即行创面及创周i-PRF多点分散注射,再行封闭式负压引流治疗,两组患者均以7d为一周期重复上述治疗,达修复标准后修复创面。比较两组患者治疗后第7、14天的细菌培养结果、白细胞计数、C反应蛋白、红细胞沉降率、新鲜肉芽组织生长情况及疼痛评分,记录达修复标准准备时间及创面愈合时间。结果 治疗后第7、14天i-PRF组各项炎症指标及疼痛评分降低较对照组更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$);治疗后第7、14天观察组新鲜肉芽组织覆盖率及细菌转阴率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$);i-PRF组达修复标准准备时间及创面愈合时间均低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 i-PRF联合VSD治疗慢性创面相比于单纯应用VSD技术,能更有效控制创面感染,减轻患者疼痛,加速创面愈合,减少住院时间。

关键词 可注射型富血小板纤维蛋白;封闭式负压引流;慢性难愈性创面;局部注射

中图分类号 R 62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1622-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.022

2021-07-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH282)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院整形外科,合肥 230601

²安庆市立医院整形外科,安庆 246003

作者简介:陈道才,男,硕士研究生;

曹东升,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: 137322289@qq.com

慢性难愈性创面通常指因各种因素引起的经过常规治疗无法在可预期的时间内按正常生物学步骤完全愈合的创面^[1]。其形成机制复杂,治疗周期长,耗费大量医疗资源。封闭负压引流(vacuum sealing drainage,VSD)技术是将封闭式敷料与创面引流技术创造性的结合,被广泛应用于多学科的各类慢性创面,有一定疗效,但在治疗一些复杂慢性创面及促进创面组织再生等方面仍有局限^[2]。Choukroun et al^[3]研究表明降低自体血液浓缩制品制备过程中的离心力与离心速度,能获得性能更为优良的新一代自体血小板浓缩物可注射型富血小板纤维蛋白(injectable platelet-rich fibrin,i-PRF),其中的血小板、生长因子、细胞因子和白细胞含量更高,拥有较强的流动性及抗细菌活性^[4-6],具有促进组织再生及伤口愈合的作用^[7]。i-PRF在慢性难愈创面治疗中罕见报道,该研究旨在探讨i-PRF联合封闭式负压引流技术对比传统单纯负压创面引流治疗在慢性创面治疗中的疗效。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2018年10月至2020年11月在安徽医科大学第二附属医院整形外科收治的80例慢性难愈性创面患者,根据随机数字表法将80例患者分成对照组和i-PRF组,每组各40例,两组患者入院相关临床资料比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表1。本研究经过医院伦理委员会批准,患者均签署了知情同意书。

1.2 纳入与排除标准

group. Flow cytometry was used to detect the effect of IL-15 on the expression of natural killer (NK) cell receptor in peripheral blood of patients with KOA and healthy controls, and the ELISA method was used to detect the effect of IL-15 on the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon γ (IFN- γ) by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Results** The level of serum IL-15 in KOA group was higher than that in control group. IL-15 could enhance the expression of NK cell receptors CD69, CD94 and NKG2D in KOA group. The levels of TNF- α and IFN- γ in the supernatant of KOA group were higher than those of control group. **Conclusion** IL-15 antagonist may become a new treatment option to prevent or delay the progression of KOA.

Key words knee osteoarthritis; IL-15; natural killer cells; TNF- α ; IFN- γ