

KIF23 在食管癌组织中的表达及临床价值

尹 丽,杜鸣宇,樊琰鑫,叶劲军,陈 薇,陈 诚,张 倩,刘雅恬,蒋 鸣,何 侠
(江苏省肿瘤医院,江苏省肿瘤防治研究所,南京医科大学附属肿瘤医院,江苏 南京 210009)

摘要: [目的] 探究驱动蛋白 23(kinesin superfamily 23, KIF23)在食管癌组织中的表达水平,分析其与临床特性的相关性以及对患者预后的影响,进一步探讨 KIF23 在食管癌细胞中的生物学功能。[方法] 利用免疫组化方法检测 70 例食管癌患者癌组织及其癌旁组织中 KIF23 的表达;分析 KIF23 表达与临床病理因素的相关性;利用细胞学实验探究 KIF23 的生物学功能。[结果] 食管癌组织中 KIF23 阳性表达率(57%)高于其对应的癌旁组织(11%)($P<0.01$)。KIF23 表达与临床分期和 T 分期密切相关($\chi^2=7.124, P=0.008$; $\chi^2=4.769, P=0.029$)。生存分析显示高表达 KIF23 组患者的生存时间较表达 KIF23 组明显缩短。COX 回归单因素和多因素结果显示 KIF23 的表达水平是食管癌患者预后的独立危险因素 (HR=4.902, 95%CI: 2.041~11.775, $P<0.001$; HR=6.372, 95%CI: 2.209~18.377, $P=0.001$)。细胞功能学实验表明沉默 KIF23 能够显著抑制食管癌细胞的侵袭与迁移能力。[结论] KIF23 在食管癌组织中高表达,其表达与食管癌患者的肿瘤进程密切相关,可作为食管癌诊断和预后判断肿瘤标志物。

关键词: 食管肿瘤; KIF23; 预后

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)12-1041-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.12.B006

Expression of KIF23 in Esophageal Carcinoma and Its Clinical Significance

YIN Li, DU Ming-yu, FAN Yan-xin, YE Jin-jun, CHEN Wei, CHEN Cheng, ZHANG Qian, LIU Ya-tian, JIANG Ming, HE Xia

(Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of KIF23 in esophageal carcinoma and its relation with clinicopathological features and prognosis of patients. [Methods] Immunohistochemical staining was used to detect the expression of KIF23 in cancer tissue and corresponding adjacent tissues of 70 patients with esophageal carcinoma. The correlation between KIF23 expression and clinicopathological features was analyzed. The KIF23 expression was knocked down in esophageal cancer Eca-109 and TE-1 cells and the cell biological functions were investigated. [Results] The positive expressions of KIF23 in EC tissues was higher than that in corresponding normal tissues (57% vs 11%, $P<0.01$). The expression of KIF23 was correlated with clinical stage and T stage ($\chi^2=7.124, P=0.008$; $\chi^2=4.769, P=0.029$). Kaplan-Meier analysis indicated that the overall survival (OS) of patients with low KIF23 expression was higher than that of patients with high KIF23 expression. Univariate and multivariate analysis showed that high expression of KIF23 was the independent prognostic factor for OS of patients (HR=4.902, 95%CI: 2.041~11.775, $P<0.001$; HR=6.372, 95%CI: 2.209~18.377, $P=0.001$). Transwell assays exhibited that knock-down of KIF23 expression significantly reduced the cell invasion and migration compared with the controls. [Conclusion] KIF23 is highly expressed in esophageal cancer tissues, which is closely related to the esophageal cancer tumor progression. KIF23 might be used as a tumor marker for the diagnosis and prognosis of patients with esophageal cancer.

Subject words: esophageal carcinoma; KIF23; prognosis

食管癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,

通信作者: 蒋鸣,主任医师,本科;江苏省肿瘤医院放疗科,江苏省南京市玄武区百子亭 42 号(210009);E-mail: xiaojiduo@163.com
何侠,副院长,教授,主任医师,博士;江苏省肿瘤医院放疗科,江苏省南京市玄武区百子亭 42 号(210009);E-mail: hexiabm@163.com

收稿日期: 2020-10-15; **修回日期:** 2020-11-09

据 2012 年流行病学统计我国每年因食管癌死亡病例占全球病例总数的一半,是当前威胁我国人民健康的重要杀手^[1-2]。食管癌因早期症状不典型,就诊时很多患者即已经属于中晚期^[2-3]。虽然近年来食管癌的手术治疗技术不断提高,各种新型靶向药物投

入临床使用,但患者的5年生存率依然不容乐观,主要与肿瘤的局部复发和远处转移密切相关^[4-6]。因此寻找提示食管癌肿瘤进程的分子标志物,探究食管癌细胞发生侵袭转移的可能分子机制是当前研究的热点问题。

驱动蛋白(kinesin superfamily, KIFs)是一类依赖ATP的运动蛋白,主要参与稳定微管,细胞内转运与分裂等生物学功能^[7]。KIF23是KIF家族的重要成员之一,其主要负责细胞骨架的重塑,纺锤体的形成^[8-9]。最近越来越多的文献报道证实了KIF23在许多肿瘤的恶性进程中发挥重要的作用,然而,KIF23在食管癌中表达与其生物学功能少见文献报道^[10-12]。因此本研究利用免疫组化方法分析70例食管癌组织及其相对应癌旁组织中KIF23的表达水平,探究KIF23表达水平与临床特征和预后的相关性,并利用细胞功能学实验探讨KIF23的生物学功能。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2015年2月至2019年2月在江苏省肿瘤医院接受治疗的70例食管癌患者,其中男性45例,女性25例,年龄52~94岁,平均(68.5±16.5)岁,采用AJCC/UICC第8版分期标准:I期3例,II期26例,III期39例,IV期2例。纳入标准:①预期生存期>3个月;②经病理证实为食管癌,无合并其他恶性肿瘤或转移性肿瘤;③无其他系统的严重疾病。排除标准:①临床统计资料不完整;②合并消化系统恶性疾病;③合并其他系统肿瘤。组织样本取材于癌组织(病理证实为鳞状细胞癌)及距离癌组织6 cm以上的黏膜组织(病理证实为正常食管黏膜上皮组织)。住院期间患者均接受调强放疗(IMRT),放疗剂量:50.4 Gy/28F~61.2 Gy/34F,5次/周。从出院后开始随访,电话或者微信随访。随访截止至2019年8月1日,随访3~52个月,中位随访时间21个月。无患者失访,死亡28例,均死于食管癌相关的复发或转移。本研究已获得江苏省肿瘤医院伦理委员会批准(2020科-012),所有患者均知情并签署知情同意书。

2株食管癌细胞Eca-109和TE-1均由江苏省肿瘤医院放疗科实验室提供。

1.2 免疫组化

收集食管癌患者的手术或胃镜下切除组织,制成石蜡切片,行二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水后,将切片置于柠檬酸钠抗原修复缓冲液中进行抗原修复,在4℃条件下KIF23一抗孵育过夜。第二天PBS冲洗后,使用生物素化二抗,在室温条件下,摇床上孵育1h。使用DAB封片剂对切片进行显色,蒸馏水冲洗,苏木精进行复染,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂进行封片,最后在显微镜下拍照。

所有切片免疫组化染色的结果均由两名资深病理医师分别选取5个光镜视野阅片评分。采用半定量技术方法,即染色强度与阳性细胞数记分的乘积分析KIF23的表达。(1)染色强度:根据切片中细胞染色的深浅,将染色强度的评分标准划分为:无着色记为0分,淡黄色记为1分,黄色记为2分,棕黄色记为3分;(2)阳性细胞数记分:无阳性细胞记为0分,<25%的阳性细胞记为1分,25%~50%的阳性细胞记为2分,50%~75%的阳性细胞记为3分,≥75%的阳性细胞记为4分。最后将染色强度与阳性细胞数记分相乘即可得到最终染色指数(SI):SI=0为阴性表达,SI<4为低表达,SI≥4为高表达。

1.3 细胞转染

特异性的针对KIF23的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)由广州锐博生物公司提供。将对数生长期的食管癌细胞重悬并接种于六孔板内,当细胞刚好铺满皿底时,开始转染。使用Lipofectamin IMAX分别将si-KIF23与si-NC转染食管癌细胞,转染成功后6h,更换培养液为含血清的普通培养基。

1.4 Western blot 实验

使用RIP裂解液对细胞样品进行裂解,收集裂解后的蛋白,使用BCA法检测蛋白浓度。将15μg来自各个样品的蛋白经SDS-PAGE凝胶进行电泳。随后在4℃条件下,使用300mA恒定电流将蛋白转移至PVDF膜上。使用PBS清洗3次后,封闭液封闭1h,4℃条件下,KIF23一抗孵育液孵育过夜。第二天,PBS清洗后,在室温条件下,使用相应的二抗孵育液在摇床上孵育1h,最后ECL发光显色液对PVDF膜进行显色,在凝胶成像仪中曝光并收集图像。

1.5 Real-time PCR

利用RNA提取试剂盒提取食管癌细胞的RNA,并根据试剂盒操作说明将RNA逆转录成cD-

NA,随后进行荧光定量PCR分析。所得的实验结果按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算出基因的相对表达量。KIF23 引物序列:5'-CTGACCCAGAGCAAAGCTTTC-3',5'-GTTCTAAAGTAAAGTGCATTCTTGC-3'。β-actin 引物序列:5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'和 5'-AGCAC-TGTGTTGGCGTACAG-3'。

1.6 Transwell 侵袭与迁移实验

进行 Transwell 侵袭实验时,需提前 4 小时将 100μl 含有 10μl/matrigel 的无血清培养基加入 Transwell 上室中,温箱内孵育。而 Transwell 迁移实验无需进行上述操作。将转染 2 天后的细胞消化,离心,利用无血清的培养基将细胞悬液配置成浓度为 1×10^5 个/ml。吸取 200μl 的细胞悬液加入铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室或未加 Matrigel 胶的小室内。下室加入 500μl 含有 20%血清的培养基,温箱内孵育。36h 后,取出 Transwell 小室,使用 4%多聚甲醛对 Transwell 小室底部细胞进行固定,接着使用结晶紫对底部细胞进行染色,利用棉签擦去小室内未穿出的细胞。在荧光倒置显微镜下观察,拍照,随机选取 5 个视野进行计数分析。

1.7 统计学处理

使用 SPSS 20.0 进行统计学分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。利用 Pearson χ^2 检验分析 KIF23 表达与食管癌患者临床病理数据的相关性;使用 Kaplan-Meier 法分析患者的 OS,Log-rank 检验明确 KIF23 不同表达组的生存率差异;使用 COX 风险回归模型进行多因素预后分析;两组样本间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KIF23 在食管癌组织中高表达

KIF23 在食管癌组织中的阳性表达率为 57%(40/70),而在对应的癌旁组织中的阳性表达率为 11%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(Figure 1)。

2.2 KIF23 表达与食管癌临床病理特征的相关性

KIF23 高、低表达各 35 例,Pearson 相关性分析显示,KIF23 表达与临床分期、T 分期密切相关($\chi^2=7.124, P=0.008; \chi^2=4.769,$

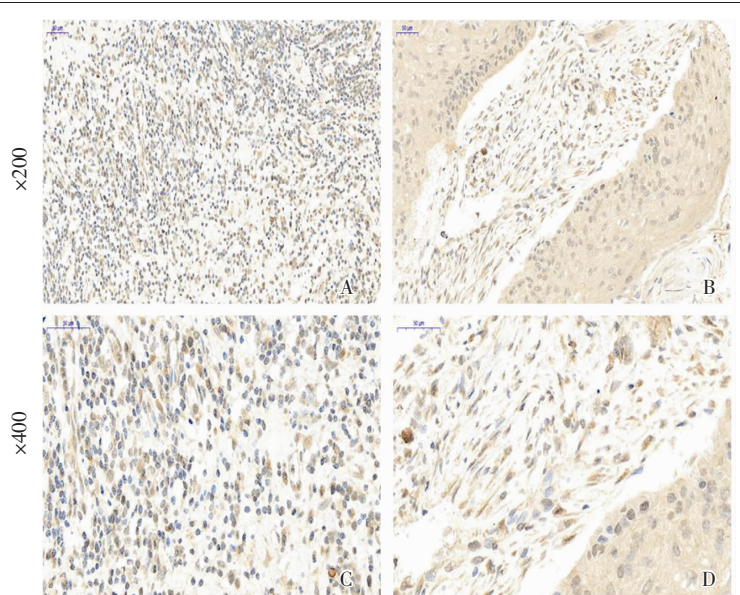
$P=0.029$),而与肿瘤患者的年龄、性别、N 分期无明显相关性(Table 1)。

2.3 KIF23 表达与食管癌患者预后的相关性

Kaplan-Meier 分析结果表明,KIF23 高表达组中位总生存期(overall survival,OS)为 17 个月,而 KIF23 低表达组中位 OS 为 33 个月,差异有统计学意义($P < 0.001$)(Figure 2)。单因素分析结果显示 KIF23 表达与患者预后具有相关性($HR=4.902, 95\%CI=$

Table 1 Correlation between KIF23 expression and clinical characteristics of esophageal cancer patients

Characteristics	N	KIF23		χ^2	P
		Low	High		
Gender					
Female	45	21	24	0.560	0.454
Male	25	14	11		
Age(years)					
≤78	36	19	17	2.059	0.632
>78	34	16	18		
TNM stage					
I~II	29	19	10	7.124	0.008
III~IV	41	16	25		
T classification					
T ₁₋₂	29	19	10	4.769	0.029
T ₃₋₄	41	16	25		
N classification					
N ₀	8	6	2	1.270	0.260
N ₁	62	29	33		



A,B:KIF23 low expression in paired normal tissues,
C,D:KIF23 high expression in esophageal cancer tissues

Figure 1 The expression of KIF23 in different tissues

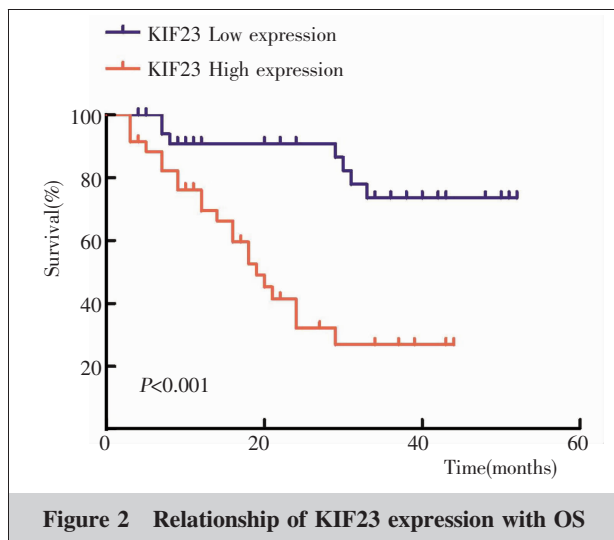


Figure 2 Relationship of KIF23 expression with OS

2.041~11.775, $P<0.001$)。进一步 COX 比例风险回归多因素分析表明 KIF23 是影响食管癌患者预后的独立危险因素 ($HR=6.372$, $95\%CI=2.209\sim18.377$, $P=0.001$) (Table 2)。

2.4 沉默 KIF23 对食管癌细胞的侵袭与迁移能力的影响

转染 siRNA 沉默 KIF23 表达后, 使用 PCR 和 Western-blot 实验检测 Eca-109 和 TE-1 细胞内 KIF23 的表达。结果显示与对照组相比, si-KIF23 组中 KIF23 的表达明显受到了抑制 (Figure 3A, 3B)。

应用 Transwell 侵袭与迁移实验分析沉默 KIF23 后, 食管癌细胞侵袭与迁移能力的变化。在 Transwell 侵袭实验中, Eca-109 细胞中 si-NC 组与 si-KIF23 组侵袭的细胞数目分别为 141.33 ± 8.22 、 75.67 ± 4.11 , 迁移的细胞数目分别为 151.00 ± 8.60 、 83.00 ± 6.16 , 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。而在 TE-1 细胞中, si-NC 组发生侵袭与迁移的细胞数分别为 72 ± 4.32 、 81 ± 5.35 。而 si-KIF23 组则分别为 34.33 ± 4.11 、 40.33 ± 2.87 , 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。表明沉默 KIF23 能够显著抑制食管癌细胞的侵袭与迁移能力 (Figure 3C, 3D)。

3 讨论

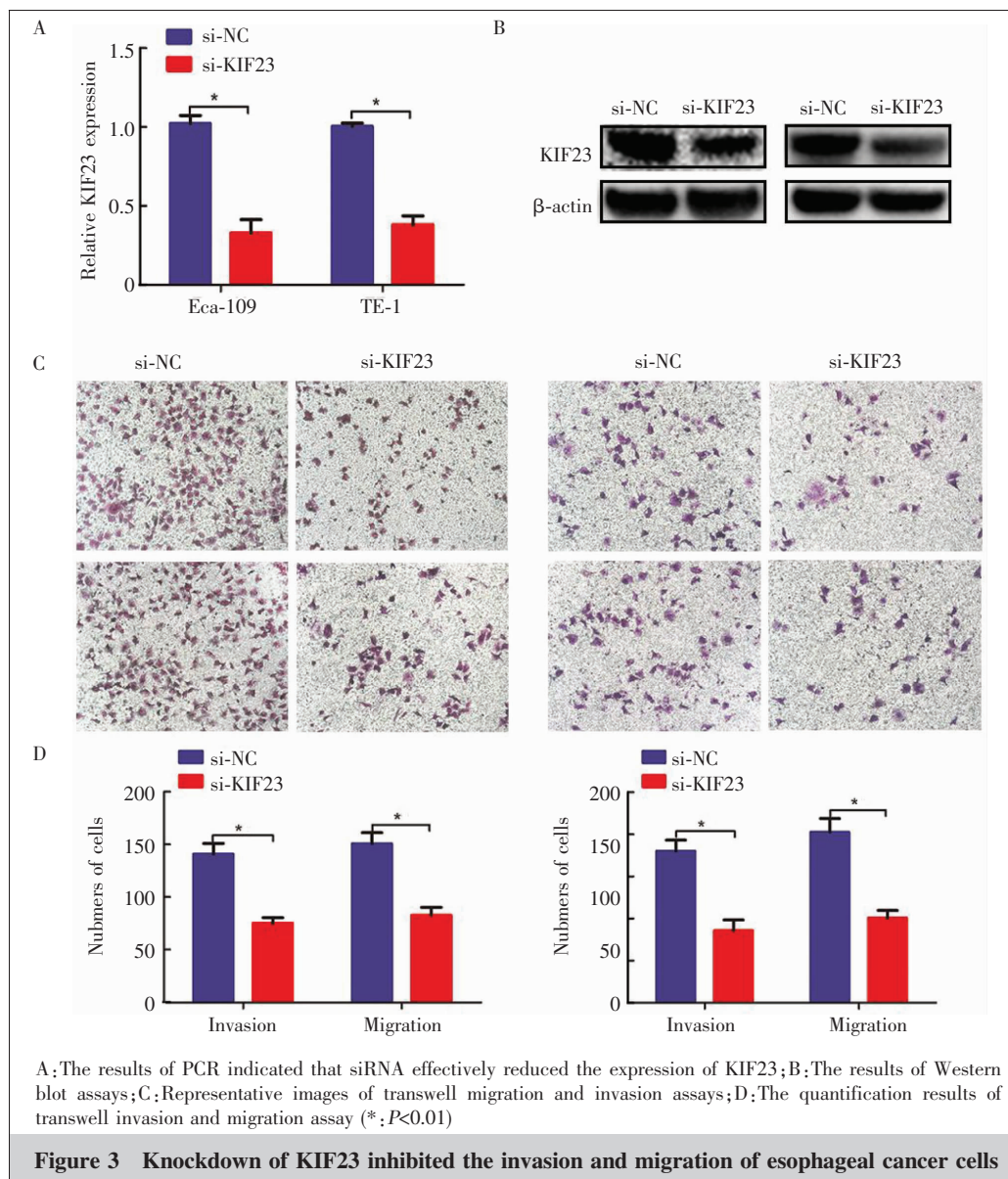
食管癌是一种来源于食管黏膜上皮的恶性肿瘤, 也是我国常见的消化道恶性肿瘤之一^[13]。食管癌组织学病理类型主要为腺癌和鳞状细胞癌, 我国目前主要是鳞状细胞癌^[13]。虽然近年来食管癌的手术治疗技术不断提高, 各种新型靶向药物投入临床使用, 但是食管癌患者的总生存率并未得到明显的改善^[14]。因此寻找能够提示食管癌患者肿瘤进程的分子标志物, 探究其发生侵袭转移的分子作用机制是目前急需解决的关键问题。

驱动蛋白家族是一类具有 ATP 酶活性的分子马达, 可利用 ATP 水解释放的化学能转运分子“货物”,

在细胞有丝分裂, 轴类运输等生物学功能方面发挥重要的作用^[15]。KIF23 作为新发现的 KIF 家族重要一员, 其主要参与细胞骨架的重塑, 物质运输和染色体有丝分裂。KIF23 的异常表达, 可导致染色体分离异常, 是诱发肿瘤的重要危险因素^[16]。近年来越来越多的研究证据表明 KIF23 在许多恶性肿瘤中异常高表达, 是导致肿瘤发生发展的重要危险因素。在非小细胞肺癌的研究中, Kato 等^[17]发现 KIF23 在癌组织中异常高表达, 其表达水平与不良预后紧密相关, 而沉默 KIF23 后能够显著抑制肿瘤细胞的增殖活性, 促进肿瘤细胞发生凋亡, 是预测非小细胞肺癌患者预后

Table 2 Prognostic factors for OS from univariate analysis and multivariate analysis

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
Age(years)				
≤78	1		1	
>78	0.698(0.331~1.470)	0.344	1.292(0.606~2.754)	0.507
Gender				
Female	1		1	
Male	2.003(0.850~4.720)	0.112	0.530(0.222~1.261)	0.151
TMN stage				
I ~ II	1		1	
III ~ IV	1.247(0.395~3.938)	0.707	0.984(0.236~4.102)	0.982
T classification				
T1~2	1		1	
T3~4	1.396(0.649~3.00)	0.393	0.754(0.194~2.934)	0.754
N classification				
N0	1		1	
N1	1.287(0.386~4.283)	0.681	0.501(0.105~2.392)	0.386
KIF23 expression				
Low	1		1	
High	4.902(2.041~11.775)	<0.001	6.372(2.209~18.377)	0.001



的独立危险因素。另一项研究显示 KIF23 同样在结直肠癌中高表达,其表达水平与 T、N、M 分期及临床分期具有明显的相关性,表达水平越高,提示预后越差,无复发生存时间越短^[18]。而在本次研究中,我们发现 KIF23 在食管癌组织中明显高表达,进一步分析发现 KIF23 表达与食管癌患者临床分期、T 分期密切相关,生存分析结果则显示高表达 KIF23 的患者生存时间较低表达 KIF23 患者明显缩短。提示 KIF23 可能在食管癌的肿瘤进程中发挥重要的促进作用。COX 风险回归模型单因素和多因素分析进一步确定了 KIF23 的表达水平是影响食管癌患者预后的独立危险因素。以上证据表明 KIF23 可以作为

一个提示食管癌肿瘤进程的分子标志物,作为临床判断食管癌患者预后的重要依据。

KIF23 作为重要的驱动蛋白,其是参与微管解聚、聚合过程的重要分子,而微管又是导致肿瘤发生侵袭转移的重要因素^[7]。因此我们推测 KIF23 可能参与了食管癌细胞的侵袭与转移过程。本组利用细胞生物学技术沉默了 KIF23 表达,使用 Transwell 侵袭与迁移试验探究了 KIF23 的生物学功能。结果证实 KIF23 能够增强食管癌细胞的侵袭与迁移能力。黄娅芬等^[19]在上皮性卵巢癌中同样证实 KIF23 能够明显促进肿瘤细胞发生侵袭与转移。

我们的研究进一步提示了 KIF23 可能作为癌基因参与食管癌的恶性肿瘤进程。

在本次研究中,受限于样本量偏少,实验数据对 KIF23 在评估食管癌患者预后价值的作用支持较弱。在接下来的研究中,我们将加大临床样本数量,进一步明确 KIF23 可能的分子标志物作用。

综上所述,本研究结果显示 KIF23 在食管癌组织中高表达,其表达水平与临床特征密切相关,表达越高,预后越差,可作为判断食管癌患者预后的独立危险因素。KIF23 在食管癌的肿瘤进程具有重要的促进肿瘤作用,有可能成为将来治疗食管癌的新靶点。

参考文献:

- [1] Wang KB, He BW, Xu J, et al. Expression of TRAP1 and EGF in esophageal cancer and their correlation with clinicopathology[J]. Hainan Medical, 2020, 31(8): 983–986. [王凯斌, 贺伯伟, 徐军, 等. TRAP1、EGF 在食管癌中的表达及其与临床病理的相关性 [J]. 海南医学, 2020, 31(8): 983–986.]
- [2] Zhou Y, Du J, Wang Y, et al. Prediction of lymph node metastatic status in superficial esophageal squamous cell carcinoma using an assessment model combining clinical characteristics and pathologic results: A retrospective cohort study[J]. Int J Surg, 2019, 66: 53–61.
- [3] Luo PF, Han RQ, Yu H, et al. Trends of esophageal cancer incidence and mortality in Jiangsu province 2006–2015[J]. China Cancer, 2020, 29(1): 34–41. [罗鹏飞, 韩仁强, 俞浩, 等. 2015 年江苏省食管癌发病和死亡情况及 2006–2015 年变化趋势[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(1): 34–41.]
- [4] Yamashita H, Jingu K, Niibe Y, et al. Definitive salvage radiation therapy and chemoradiation therapy for lymph node oligo-recurrence of esophageal cancer: a Japanese multi-institutional study of 237 patients[J]. Radiat Oncol, 2017, 12(1): 38.
- [5] Bhatt A, Suneel K, Murthy SC, et al. Multidisciplinary evaluation and management of early stage esophageal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2020, 29(4): 613–630.
- [6] Li C, Liu J, Guan ZY, et al. Expression of TRAP1 in esophageal carcinoma and its influence on the prognosis [J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2017, 33(2): 135–139. [李纯, 刘静, 关正元, 等. TRAP1 在食管癌中的表达及对预后的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2017, 33(2): 135–139.]
- [7] Huszar D, Theoclitou ME, Skolnik J, et al. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1–2): 197–208.
- [8] Nislow C, Lombillo VA, Kuriyama R, et al. A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles[J]. Nature, 1992, 359(6395): 543–547.
- [9] Zhang BH, Yue HY. Tumor kinesin [J]. Gansu Medicine, 2017, 36(7): 536–538. [张百红, 岳红云. 肿瘤的驱动蛋白 [J]. 甘肃医药, 2017, 36(7): 536–538.]
- [10] Wu H, Tian X, Zhu C. Knockdown of lncRNA PVT1 inhibits prostate cancer progression in vitro and in vivo by the suppression of KIF23 through stimulating miR-15a-5p [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 283.
- [11] Kato T, Lee D, Licun W, et al. Kinesin family members KIF11 and KIF23 as potential therapeutic targets in malignant pleural mesothelioma [J]. Int J Oncol, 2016, 49(2): 448–456.
- [12] Sun X, Jin Z, Song X, et al. Evaluation of KIF23 variant 1 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2015, 15: 961.
- [13] Zeng H, Zheng RS, Zhang SW, et al. Esophageal cancer statistics in China, 2011: estimates based on 177 cancer registries[J]. Thorac Cancer, 2016, 7(2): 232–237.
- [14] Wei KR, Liang ZH, Li ZM. Net survival of major cancers in Zhongshan city of Guangdong province from 2003 to 2013[J]. China Cancer, 2020, 29(2): 103–107. [魏矿荣, 梁智恒, 李柱明. 2003–2013 年广东省中山市主要癌症净生存率分析[J]. 中国肿瘤, 2020, 29(2): 103–107.]
- [15] Huang X, Liu F, Zhu C, et al. Suppression of KIF3B expression inhibits human hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Dig Dis Sci, 2014, 59(4): 795–806.
- [16] Lucanus AJ, Yip GW. Kinesin superfamily: roles in breast cancer, patient prognosis and therapeutics [J]. Oncogene, 2018, 37(7): 833–838.
- [17] Kato T, Wada H, Patel P, et al. Overexpression of KIF23 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients [J]. Lung Cancer, 2016, 92: 53–61.
- [18] Ji ZY, Mi AN, Li MM, et al. Expression of KIF23 in colorectal cancer and its clinical significance[J]. Clinical Oncology in China, 2020, 47(7): 338–343. [纪知语, 密奥宁, 李蒙蒙, 等. KIF23 在结直肠癌中的表达及其临床意义 [J]. 中国肿瘤临床, 2020, 47(7): 338–343.]
- [19] Huang YF, Zhou XR, Li XL. Effect of silencing KIF23 gene on proliferation, migration and invasiveness of epithelial ovarian cancer cells[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2019, 26(23): 1771–1776. [黄娅芬, 周栩茹, 李晓兰. KIF23 基因沉默对上皮性卵巢癌细胞增殖与迁移和侵袭影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(23): 1771–1776.]