



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของผู้ป่วย  
กล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโพแทสเซียมต่ำ

โดย นายแพทย์บรรยง ภัคดีกิจเจริญ

กรกฎาคม 2551

สัญญาเลขที่ RMU4880029

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของผู้ป่วยกล้ามเนื้ออ่อน  
แรงจากโพแทสเซียมต่ำ

นายแพทย์บรรยง ภัคดีกิจเจริญ  
หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## ABSTRACT

**Project Code:** RMU4880029

**Project Title:** Na-K ATPase in muscle of hypokalemic periodic paralysis patients

**Investigator:** Bunyong Phakdeekitcharoen, M.D.

Division of Nephrology, Department of medicine,  
Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Thailand

**E-mail Address:** [rabpd@mahidol.ac.th](mailto:rabpd@mahidol.ac.th)

**Project Period:** August 2005 – July 2008

**Background:** Thyroid hormone regulates specific  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  - ATPase isoforms in rodent skeletal muscles. No study has examined this relationship in human tissues. This study investigated the effect of hyperthyroid status on the expression of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  - ATPase.

**Methods:** The vastus lateralis muscles from 8 hyperthyroid patients were biopsied before and after treatment. Ten age-matched euthyroid subjects served as controls.

**Results:** In hyperthyroid patients, the average T3 level was 3-times higher in pre-treatment compared to post-treatment ( $262 \pm 75$  versus  $86 \pm 21$  ng/dl,  $P = 0.001$ ). The relative mRNA expression of the  $\alpha_2$ , but not  $\alpha_1$  or  $\alpha_3$ , subunit was increased  $\sim 3$  folds in pre-treatment ( $2.98 \pm 0.52$  versus  $0.95 \pm 0.40$ ,  $P < 0.01$ ) whereas that of  $\beta_1$ , not  $\beta_2$  or  $\beta_3$ , subunit was increased  $\sim 2.8$  folds in pre-treatment ( $2.83 \pm 0.38$  versus  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ). The relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were positively correlated with the serum T3 ( $r = 0.75$ ,  $P = 0.001$  and  $r = 0.66$ ,  $P = 0.003$ , respectively). Immunohistochemistry studies revealed an increase in protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$ , but not  $\alpha_1$  or  $\beta_2$ , subunits in the plasma membrane of muscle fibers of hyperthyroid patients which decreased after treatment.

**Conclusions:** This provides the first evidence that, in human skeletal muscles, thyroid hormone up regulated the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  - ATPase protein expression at least, in part, at mRNA level and the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits play the important role in this regulation.

**Key words:**

Hyperthyroid,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  - ATPase isoforms, skeletal muscle

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU4880029

ชื่อโครงการ: โครงการการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของผู้ป่วยกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโพแทสเซียมต่ำ

ชื่อนักวิจัย: นายแพทย์บรรยง ภักดีกิจเจริญ  
หน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์  
คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: [rabpd@mahidol.ac.th](mailto:rabpd@mahidol.ac.th)

ระยะเวลาโครงการ: ศ.ค. 2548 - ก.ค. 2551

วัตถุประสงค์: ศึกษารายละเอียดของ Na-K ATPase isoform อย่างจำเพาะในกล้ามเนื้อลายหนู ยังไม่เคยมีการศึกษาความสัมพันธ์นี้ในกล้ามเนื้อลายมนุษย์ การศึกษานี้ศึกษาผลของภาวะธัยรอยด์เป็นพิษต่อการแสดงออกของ  $\alpha$  และ  $\beta$  subunit ของ Na-K ATPase

วิธีทดลอง: กล้ามเนื้อ vastus lateralis จากผู้ป่วยธัยรอยด์เป็นพิษ 8 ราย ได้รับการตัดชิ้นเนื้อก่อนและหลังการรักษา กล้ามเนื้อของคนที่มีภาวะธัยรอยด์ปกติ 10 คน ที่มีอายุเท่ากันเป็นกลุ่มควบคุม

ผลการทดลอง: ในผู้ป่วยธัยรอยด์เป็นพิษ ค่าเฉลี่ยของระดับธัยรอยด์ T3 เป็น 3 เท่าในภาวะก่อนการรักษาเทียบกับหลังการรักษา ( $262 \pm 75$  versus  $86 \pm 21$  ng/dl,  $p = 0.001$ ) ค่า relative mRNA expression ของ  $\alpha_2$  (แต่ไม่ใช่  $\alpha_1$  หรือ  $\alpha_3$ ) subunit เพิ่มขึ้น  $\sim 3$  เท่า ก่อนรักษา ( $2.98 \pm 0.52$  versus  $0.95 \pm 0.40$ ,  $p < 0.01$ ) ในขณะที่  $\beta_1$  (ไม่ใช่  $\beta_2$  หรือ  $\beta_3$ ) subunit เพิ่มขึ้น  $\sim 2.8$  เท่าก่อนการรักษา ( $2.83 \pm 0.38$  versus  $1.10 \pm 0.27$  ng/dl,  $p = 0.01$ ) ค่า relative mRNA expression ของ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับธัยรอยด์ T3 ( $r = 0.75$ ,  $p = 0.001$  และ  $r = 0.66$ ,  $p = 0.003$  ตามลำดับ) การศึกษาทาง immunohistochemistry พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  แต่ไม่ใช่  $\alpha_1$  และ  $\beta_2$  ใน plasma membrane ของใยกล้ามเนื้อในผู้ป่วยธัยรอยด์เป็นพิษ และลดลงหลังการรักษา

สรุป: การทดลองนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าในกล้ามเนื้อลายมนุษย์ธัยรอยด์ฮอร์โมนควบคุมการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Na-K ATPase อย่างน้อยที่สุดหรือส่วนหนึ่งในระดับ mRNA และ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit เป็นตัวการสำคัญในการควบคุมนี้

## คำหลัก

Hyperthyroid,  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  isoforms, skeletal muscle

## Executive summary

### วัตถุประสงค์

1. Identify ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้
  - Familial hypokalemic periodic paralysis
  - Thyrotoxic periodic paralysis
  - Grave's disease (hyperthyroid)
  - Primary hyperaldosteronism
2. ดูการเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Grave's disease ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ Hyperthyroid & Euthyroid
3. ดูการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Grave's disease ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ Hyperthyroid & Euthyroid
4. ดูความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของ Na-K ATPase mRNA กับ การเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆของผู้ป่วย thyrotoxic periodic paralysis

### สิ่งที่ดำเนินงานและค้นพบ

#### โครงการที่ 1

ได้ Characterize Na-K ATPase antibody ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  และ  $\beta 2$ ) ที่ซื้อมาจากต่างประเทศ แล้วนำ antibody นั้นมาเปรียบเทียบกับ positive control และ negative control รวมทั้งผู้ป่วย Grave's disease with hyperthyroid and without hyperthyroid (post-treatment) ดังภาพที่ 2 พบว่า Na-K ATPase  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit มีการเปลี่ยนแปลงตามระดับ thyroid hormone ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ  $\alpha 1$  และ  $\beta 2$  subunit ดังนั้นจะเห็นได้ว่า  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit ของ Na-K ATPase มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ thyroid hormone โดยเฉพาะ T3

ผลจากการทำ western blot analysis เข้าได้กับผลของ immunohistochemistry ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ  $\alpha 2$  subunit (~ 100-100 KDa) และ  $\beta 1$  subunit (~45-52 Kda) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ  $\alpha 1$  (~100-105 Kda) หรือ  $\beta 2$  (~ 45-52 KDa) subunit ในผู้ป่วย hyperthyroid และการเพิ่มขึ้นของ  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit จะกลับมาเป็นปกติหลังจากการรักษา (รูปที่ 3) ไม่มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีน  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit ระหว่างผู้ป่วยที่เป็น euthyroid และกลุ่มผู้ป่วย controls

## โครงการที่ 2

นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการเก็บที่  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อเตรียมใช้ในการตรวจทาง mRNA expression ของ ยีน  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  และ  $\beta_1$  และ  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) แล้วนำ mRNA expression ของแต่ละยีนนั้นมา เปรียบเทียบโดยมี positive control, negative control รวมทั้งผู้ป่วย Grave's disease with hyperthyroid and without hyperthyroid (post-treatment) ดังภาพที่ 1 พบว่า Na-K ATPase mRNA  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit มีการเปลี่ยนแปลงตามระดับ thyroid hormone ในขณะที่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$  และ  $\beta_3$  subunit ไม่พบการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังรักษา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า mRNA expression ของ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit ของ Na-K ATPase มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ thyroid hormone โดยเฉพาะ T3 ดังภาพที่ 1

สรุป: การทดลองนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าในกล้ามเนื้อลายมนุษย์ร้อยละ 50 ควบคุม การเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Na-K ATPase อย่างน้อยที่สุดหรือส่วนหนึ่งในระดับ mRNA และ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit เป็นตัวการสำคัญในการควบคุมนี้

## เนื้อหางานวิจัย

### บทนำ

จากการศึกษาในโครงการ “กล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโพแทสเซียมต่ำในประเทศไทย” ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจาก ส.ก.ว. พบว่ากลุ่มโรคที่เป็นสาเหตุและพบบ่อยในประเทศไทยสามารถจำแนกเป็น 3 กลุ่มโรค ดังต่อไปนี้

1. Familial hypokalemic periodic paralysis (HypoPP)
2. Thyrotoxic periodic paralysis (TPP)
3. Renal tubular acidosis (RTA)

แต่ละโรคมีรายละเอียดของด้านคลินิกและการตรวจห้องปฏิบัติการรวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรม ดังรายงานที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้ว [1]

ในกลุ่มโรค Thyrotoxic periodic paralysis (TPP) ซึ่งมีลักษณะทางคลินิกคล้ายคลึงกับโรค Familial hypokalemic periodic paralysis (Familial HypoPP) แต่ไม่มีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมทางคลินิก ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง [1] และพบมากในประเทศแถบเอเชียเช่น ไทย จีน เกาหลี ฮองกง [2-5] ขณะเกิดอาการผู้ป่วยจะมีอาการ hyperthyroidism ร่วมกับมี hypokalemia ร่วมด้วยทุกครั้ง เมื่อรักษาภาวะ Hyperthyroid ดีแล้ว อาการแขนขาอ่อนแรงก็จะไม่เกิดขึ้นอีก [2-5]

มีรายงานพบว่า Thyroid hormone สามารถ up regulate expression ของ Na-K ATPase ใน skeletal muscle ของหนูได้ [6-10] อย่างไรก็ตามไม่เคยมีการศึกษา Na-K ATPase expression ในกล้ามเนื้อของผู้ป่วยที่เป็น hyperthyroid ในคนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วย TPP

Na-K ATPase pump เป็น enzyme และเป็น protein ที่อยู่บนผิวเซลล์ (cell membrane) ของ cell ต่าง ๆ ในร่างกายแทบทุกชนิด เป็น membrane protein ที่ใช้พลังงานจาก ATP และมีความสำคัญอย่างมากอย่างหนึ่งในการดำรงชีวิต [11-13] หน้าที่หลักของ pump นี้คือแลกเปลี่ยน  $\text{Na}^+$  และ  $\text{K}^+$  ระหว่าง intracellular และ extracellular ที่เซลล์กล้ามเนื้อ pump นี้มีหน้าที่ดูด  $\text{K}^+$  เข้า cell และขับเอา  $\text{Na}^+$  ออกจาก cell

ลักษณะทางกายวิภาค pump นี้ประกอบด้วย  $\alpha$  &  $\beta$  subunit แต่ละอวัยวะก็จะมีลักษณะโครงสร้าง subunit และ isoform ที่แตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ตามข้อมูลต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ subunit และ isoform ยังไม่ชัดเจนนัก เช่นที่ใดจะมี  $\alpha_1$  &  $\beta_1$  เด่น [14] แต่ที่กล้ามเนื้อ  $\alpha_2$  &  $\beta_1$  จะเป็น subunit ที่เด่น [15-18]

มีการศึกษาพบว่าถ้าเอาหนูที่เป็น hypothyroid มา induce ให้เกิด euthyroid หรือ hyperthyroid โดยฉีดยา thyroid hormone ( $\text{T}_3$ ) แล้วตัดกล้ามเนื้อของหนูนั้นมาตรวจ จะพบว่า expression ของ  $\alpha_2$  และ  $\beta_2$  subunit ของ Na-K ATPase pump ของหนูในภาวะ hyperthyroid เพิ่มขึ้นเทียบกับภาวะ euthyroid หรือ hypothyroid [6] นอกจากนั้นแล้วยังมี

การศึกษาทางด้าน biochemistry พบว่าจำนวน pump ของ Na-K ATPase ในกล้ามเนื้อของมนุษย์เพิ่มขึ้นในภาวะ hyperthyroid และลดลงในภาวะ hypothyroid และสัมพันธ์กับระดับ thyroid hormone ที่เปลี่ยนไปในเลือด [19] ยิ่งไปกว่านั้นมีการศึกษาพบว่า subunit ที่มีความสำคัญในกล้ามเนื้อของมนุษย์คือ Isoform  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit [15] และยังพบต่อไปว่า การออกกำลังกายและการให้ insulin สามารถทำให้เกิดการ translocation ของ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit จาก cytoplasm ไป plasma membrane ใน cell กล้ามเนื้อของมนุษย์ได้ [16-18]

เมื่อนำข้อมูลมารวมกันจึงมีความเป็นไปได้ว่า ภาวะ hyperthyroid อาจจะมีผลกระตุ้นทำให้จำนวนและการทำงานของ Na-K ATPase pump เพิ่มขึ้น มีผลทำให้กล้ามเนื้อซึ่งเป็น storage ของ  $K^+$  ที่มากที่สุดดูดเอา  $K^+$  เข้า cell จึงทำให้เกิดภาวะ hypokalemic ตามมาได้ อย่างไรก็ตามคำถามที่สำคัญคือ ทำไมผู้ป่วย hyperthyroid ทุกรายไม่เกิดภาวะ hypokalemia ? มีกลไกอะไรบ้างเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด hypokalemia และนำไปสู่การเกิดโรค TPP ตามมาจึงเป็นคำถามที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป?

มีข้อมูลต่อมาอีกว่าภาวะ hypokalemia ลด expression ของ Na-K ATPase pump [20] จึงมีความน่าสนใจว่าภาวะ hypokalemia จากสาเหตุของโรคต่างๆเช่น TPP, HypoPP, Hyperaldosteronism จะมี expression ของ Na-K ATPase ต่างกันหรือไม่อย่างไร ?

ในประเทศไทยรวมทั้งต่างประเทศไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบ expresstion ของ Na-K ATPase ใน

1. ในผู้ป่วยที่เป็น hyperthyroid เทียบกับกลุ่ม euthyroid
2. การเปลี่ยนแปลงของ expression ของ Na-K ATPase ในผู้ป่วย hyperthyroid ใน step ต่าง ๆ (ก่อนการรักษา และหลังการรักษา)



**โครงการที่ 1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทาง immunohistochemistry & western blot analysis ของ protein Na-K ATPase expression ใน Grave's disease และ thyrotoxic periodic paralysis**

**วัตถุประสงค์**

1. Identify ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้
  - Grave's disease (hyperthyroid)
  - Normal controls
2. ดูการเปลี่ยนแปลงของ protein Na-K ATPase expression ใน stage ต่าง ๆ เฉพาะของผู้ป่วย Grave's disease ในภาวะต่าง ๆ เช่น ภาวะ Hyperthyroid & Euthyroid

**วิธีดำเนินงานวิจัย (ระเบียบวิธีการวิจัย ขอบเขตงานวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ)**

1. คัดเลือกผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค hyperthyroid ตาม criteria คือตรวจพบ TFT (thyroid function test) มีค่าสูงผิดปกติ  
คัดเลือกผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค Grave's disease (hyperthyroid) & control
2. ตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยชิ้นเล็ก ๆ บริเวณต้นขา (Vastus lateralis) ขณะที่ผู้ป่วยมีอาการแขนขาอ่อนแรงร่วมกับ hypo K<sup>+</sup>  
(ทั้งนี้การตัดชิ้นเนื้อผู้ป่วยจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเรียบร้อยแล้ว)
3. ทำการตรวจชิ้นเนื้อซ้ำเฉพาะในผู้ป่วย Grave's disease & TTP (thyrotoxic periodic paralysis) ขณะที่ผู้ป่วยหายจากอาการไทรอยด์เป็นพิษ (hyperthyroidism) และเข้าสู่ภาวะไทรอยด์ปกติ (euthyroidism) โดยยาด้านไทรอยด์หรือการผ่าตัด thyroid ซึ่งปกติจะใช้เวลาประมาณ 3-6 เดือน
4. นำชิ้นเนื้อที่ได้มาเก็บที่ -80°C เพื่อเตรียมใช้ในการตรวจทาง immunohistochemistry
5. Characterize Na-K ATPase antibody ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  และ  $\beta 2$ ) ที่ซื้อมาจากต่างประเทศเพื่อดูว่าสามารถจะย้อมติด muscle ของคนได้หรือไม่โดยใช้ muscle จาก case ผ่าตัดทาง orthopedic ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว โดยทดลองปรับ dilution ของ antibody และ condition ต่าง ๆ
6. เมื่อได้ condition แล้วนำ antibody นั้นมาเปรียบเทียบกับ positive control ได้แก่ skeleton muscle บริเวณตำแหน่งเดียวกันจาก  
6.1 case ผ่าตัดทางจากผู้ป่วยทาง Orthopedic ที่มีการทำ amputation ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว

6.2 ผู้ป่วย Hyperthyroid ที่ไม่มี muscle weakness ซึ่งจะต้องได้รับการยืนยัน ยอมจากผู้ป่วยเช่นกัน

Negative control ได้แก่

6.3 การย้อมโดยไม่ใช่ primary antibody (ใส่แต่ secondary antibody)

6.4 การย้อม tissue อื่นๆ ที่ไม่ express Na-K ATPase

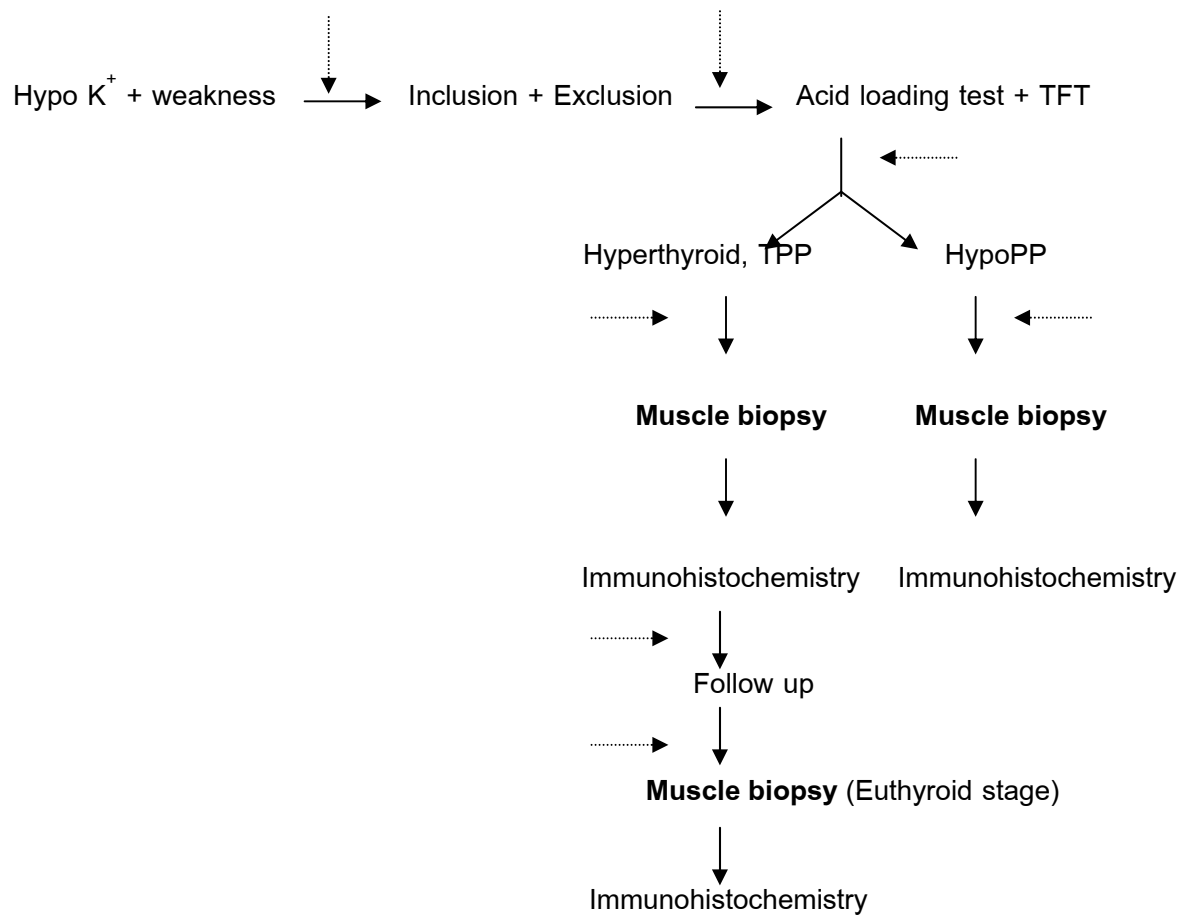
7. เมื่อ verify antibody เรียบร้อยแล้ว เราจะทำการทดสอบ expressive ของ Na – K ATPase ในภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้

Expression of muscle Na-K ATPase ของผู้ป่วย Grave's disease ใน stage ต่างๆ

7.1 Hyperthyroid stage (before treatment)

7.2 Euthyroid stage (after treatment)

# Protocol Flow Chart (for TPP & HypoPP)



↓ = blood for investigation

## วิธีการทำ Muscle Biopsy

1. การทำ muscle biopsy จะทำที่ห้องผ่าตัดเล็ก ณ ตึกห้องฉุกเฉินโดย นพ.ชูศักดิ์ กิจคุณาเศียร (Chusak Kijkunasathian, M.D.) ซึ่งเป็นอาจารย์ภาควิชา Orthopedic
2. กล้ามเนื้อบริเวณต้นขา (Vastus lateralis) ที่ทำ biopsy ต้องมีลักษณะดังนี้
  - 2.1 กล้ามเนื้อที่อยู่บริเวณตอนกลาง ไม่ค่อนข้างไปทาง origin หรือ insertion
  - 2.2 เป็นกล้ามเนื้อที่ถูก involvement ปานกลาง (ไม่ใช่เบา หรือ รุนแรงจนเกินไป)
  - 2.3 ไม่ถูกเข็ม E.M.G. ปัก ภายในระยะเวลาอย่างน้อย 7 วัน ก่อนทำ biopsy
3. ฉีดยาชาด้วย 1% xylocain without adrenaline ที่บริเวณผิวหนัง และ subcutaneous tissue
4. ใช้มีดเปิดผิวหนัง และเนื้อเยื่อ จนถึงกล้ามเนื้อ แล้วเลาะกล้ามเนื้อ ให้ได้ขนาดยาว 2 cm. กว้าง 0.5 cm. และสูง 0.5 cm. จากนั้นผูกด้วยเชือกที่บริเวณหัวท้าย ตัดกล้ามเนื้อ ให้เชือกอยู่ในตัวผู้ป่วยเพื่อป้องกันเลือดออกหลังผ่าตัด
5. หักกล้ามเนื้อที่ได้ ด้วยผ้าก๊อซชุบด้วย NSS พอหมาด แล้วนำส่งห้องปฏิบัติการ ตรวจชิ้นเนื้อ ภายใน 15 นาที muscle จะถูกแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ
  - 4.1 ส่วนที่ 1 เก็บเป็น Snap Freeze
  - 4.2 ส่วนที่ 2 Fix 10% buffer Neutral formalin ทำ permanent slide
  - 4.3 ส่วนที่ 3 Fix ด้วย glutaraldehyde สำหรับตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (E.M.)
6. การเขียนใบ Request ให้ใช้แบบส่งชิ้นเนื้อของ pathology เขียนรายละเอียดต่างๆ (ประวัติ, ตรวจร่างกาย, investigation, progression และการรักษาที่ได้รับ)

## การย้อม immunohistochemistry

### วิธีทำ

1. นำ slides จากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ วางบน staining chamber
2. หยด 3% normal horse serum จนท่วม section และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที
3. ชับน้ำ normal horse serum ออก หยด primary antibody แล้ว incubate ที่ 4 overnight
4. ล้าง slide ด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. ชับน้ำส่วนเกินออก หยด secondary antibody (Biotinylated secondary antibody ที่จำเพาะเจาะจงกับ primary antibody)
6. ล้าง slides ด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
7. ชับน้ำส่วนเกินออก หยด streptavidin และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที
8. ล้าง slides ด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9. หยด chromogen (DAB สีน้ำตาล หรือ AEC สีแดง) นาน 3-5 นาที
10. ล้างน้ำก็อก นาน 5 นาที
11. ย้อมสี hematoxylin นาน 3 นาที
12. ล้างน้ำก็อก นาน 5 นาที
13. ถ้าใช้ AEC ก็ mount ด้วย glycerin ได้เลย แต่ถ้าใช้ DAB ให้ผ่านขบวนการ dehydrate ก่อน แล้ว mount ด้วย permount

### การทำ Western blot analysis

Muscle samples of 30 mg were homogenized on ice in a buffer as previously published (23). 20  $\mu\text{g}$  ( $\beta_1$  and  $\beta_2$ ) or 40  $\mu\text{g}$  ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ) of protein was loaded in 10 % separating gel. After electrophoresis, the protein was transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with blocking buffer [5% non-fat milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST)]. Membranes were incubated overnight at 4° C in primary antibodies diluted in blocking solution. The dilutions of anti- $\alpha_1$  and anti- $\alpha_2$  antibodies were 1:2,000, anti- $\beta_1$  and anti- $\beta_2$  1:5,000. Membranes were washed and incubated for 1 h in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat anti-mouse or goat anti-rabbit immunoglobulins) diluted 1: 10,000 in TBST solution. After 3 washes, membranes were incubated with chemiluminescent substrate (Pierce SuperSignal, West Pico, IL). The signal was detected and imaged (Pierce CL-X Posure, West Pico, IL). Resulting autoradiographs were densitometrically scanned and quantified.

### ผลงานวิจัยที่ได้รับ

ขณะนี้ได้รวบรวมชิ้นเนื้อผู้ป่วยเป็นโรคตาม criteria ได้ทั้งสิ้นดังต่อไปนี้

- Familial hypokalemic periodic paralysis ได้ทั้งสิ้น 2 คน
- TPP (thyrotoxic periodic paralysis) ได้ทั้งสิ้น 5 คน
- Grave's disease (hyperthyroid) ตาม criteria ได้ทั้งสิ้น 8 คน
- Primary hyperaldosteronism ได้ทั้งสิ้น 2 คน
- Normal control subject case ซึ่งเป็นผู้ป่วยผ่าตัดทางจากทาง Orthopedics 14 คน (ใช้ชิ้นเนื้อไปแล้ว 7 รายเหลืออีก 7 ราย)

-

ได้ Characterize Na-K ATPase antibody ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  และ  $\beta 2$ ) ที่ซื้อมาจากต่างประเทศ และเริ่มได้ condition แล้ว นำ antibody นั้นมาเปรียบเทียบโดยมี positive control และ negative control ดังภาพที่ 2 จะเห็นว่า Na-K ATPase antibody ทั้ง 4 ตัวย้อมไม่ติดอะไรกรณีไม่ใส่ secondary antibody (figure 1 A, E, I, M) และย้อมติดกรณีใส่ทั้ง primary & secondary antibody โดยย้อมติด plasma membrane ของ skeletal muscle fiber เป็นส่วนใหญ่ (figure 1 B, F, J, N) แสดงว่า antibody มีความจำเพาะต่อ protein  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  และ  $\beta 2$  subunit ของ Na-K ATPase อย่างไรก็ตามมี nonspecific staining พบเป็นจุดสีเขียว (secondary antibody for monoclonal antibody) และส้มขาว (secondary antibody for polyclonal antibody) ใน control samples ที่ใส่เฉพาะ secondary antibody (figure 1 A, E, I, M) ในผู้ป่วย Hyperthyroid จะพบว่า  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit จะมี expression มากขึ้นที่ plasma membrane (ติดสีเข้มขึ้น) เมื่อเทียบกับ control (G & K VS F & J) และกลับมาเป็นปกติเมื่อ hyperthyroid ได้รับการรักษาแล้ว (H & L VS F & J) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ  $\alpha 1$  และ  $\beta 2$  subunit (C & O VS B & N) ดังนั้นจะเห็นได้ว่า  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit ของ Na-K ATPase มีการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับ thyroid hormone โดยเฉพาะ T3

ผลจากการทำ western blot analysis เข้าได้กับผลของ immunohistochemistry ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ  $\alpha 2$  subunit (~ 100-100 KDa) และ  $\beta 1$  subunit (~45-52 Kda) แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ  $\alpha 1$  (~100-105 Kda) หรือ  $\beta 2$  (~ 45-52 KDa) subunit ในผู้ป่วย hyperthyroid และการเพิ่มขึ้นของ  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit จะกลับมาเป็นปกติหลังจากการรักษา (รูปที่ 3) ไม่มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีน  $\alpha 2$  และ  $\beta 1$  subunit ระหว่างผู้ป่วยที่เป็น Euthyroid และกลุ่มผู้ป่วย controls

## โครงการที่ 2

### การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ **Na-K ATPase mRNA expression** ในกล้ามเนื้อผู้ป่วย **hyperthyroid**

#### วิธีดำเนินงานวิจัย

1. นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการเก็บที่  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อเตรียมใช้ในการตรวจทาง mRNA expression
2. Total RNA จะถูก extract โดย FastRNA reagents (BIO 101, Vista, CA, USA)
3. RNA pellet was dissolved in EDTA-treated water and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$
4. Total RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm.
5. For each sample, 1  $\mu\text{g}$  of RNA was transcribed into cDNA using the Promega AMV Reverse Transcription Kit (kit A3500; Promega, Madison, WI, USA) and was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent analysis.
6. Primer and probe optimization and validation of amplification efficiency were carried out.
7. The ABI 7700 real-time PCR system was used for relative quantification
8. Triplicate wells were run for each sample.
9. Measurements included a no-template control, as well as a human muscle sample endogenous control.
10. Primer and probe sequences ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  และ  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) were designed from published sequence

Gene	$\alpha 1$ Na-K ATPase
Forward Primer	5'- GCC AAT GTG CCG GAA GG - 3'
Reverse Primer	5'- CAT GCG TTT GGC AGT AAG TGT C- 3'
Probe	5'- TTG CTG GCC ACT GTC ACG GTC TG- 3'
Gene	$\alpha 2$
Forward Primer	5'- GAA TGA GAG GCT CAT CAG CAT G - 3'
Reverse Primer	5'- CAA AGT AGG TGA AGA AGC CAC CC - 3'
Probe	5'- CCT ACG GAC AGA TCG GGA TGA TCC AG - 3'
Gene	$\alpha 3$
Forward Primer	5'- GGT GGC TAT GAC AGA GCA CAA G- 3'

Reverse Primer	5'- TGC ACA CAG TGT GTG TTG TAT TTC C- 3'
Probe	5'- CAAAGCCCAGGAGATCC - 3'
Gene	$\beta_1$
Forward Primer	5'- TCA GTG AAT TTA AGC CCA CAT ATC A - 3'
Reverse Primer	5'- CTT CTG GAT CTG AGG AAT CTG TGT T - 3'
Probe	5'- CGA GTG GCC CCG CCA GGA T - 3'
Gene	$\beta_2$
Forward Primer	5'- CCT GCC AAT TCA ACC GGA - 3'
Reverse Primer	5'- CTG TAA CCA TAG TGG GTG GAG TCC- 3'
Probe	5'- CAGCCCTGTGTCTTCA - 3'
Gene	$\beta_3$
Forward Primer	5'- AGT CTG TCC TGA TGG AGC ACT TT- 3'
Reverse Primer	5'- GCA TGC TTG AAG TAA TGA AAT AGG AA- 3'
Probe	5'- CTGCATGCTTGAAGTAATGA - 3'

11. เมื่อได้ condition แล้วนำ mRNA นั้นมาเปรียบเทียบกับ

**positive control** ได้แก่ skelaton muscle บริเวณตำแหน่งเดียวกันจาก

11.1 Case ผ่าตัดทางจากผู้ป่วยทาง Orthopedic ที่มีการทำ amputation ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยแล้ว

11.2 ผู้ป่วย Hyperthyroid ที่ไม่มี muscle weakness ซึ่งจะต้องได้รับการยินยอมจากผู้ป่วยเช่นกัน

**Negative control** ได้แก่

11.3 การทำ Real-time PCR โดยไม่ใส่ template (ใส่แต่ reagents)

12 เมื่อ verify condition เรียบร้อยแล้ว เราจะทำการทดสอบ mRNA expressive ของ Na-K ATPase ในภาวะต่างๆ ดังต่อไปนี้

(I) mRNA expression of muscle Na-K ATPase ในภาวะต่างๆ

1. muscle คนปกติที่ euthyroid (ได้จาก case ผ่าตัดทาง orthopedic)
2. muscle คนที่มี hyperthyroid
3. muscle คนที่มี TPP (hyperthyroid + hypo  $K^+$ )
4. muscle คนที่มี HypoPP (euthyroid + hypo  $K^+$ )



5. muscle คนที่มี euthyroid + hypo  $K^+$  จากสาเหตุอื่นเช่น  
Hyperaldosteronism

(II) mRNA expression of muscle Na-K ATPase ของผู้ป่วย thyrotoxic periodic paralysis ใน stage ต่างๆ

1. TPP in hyperthyroid stage (before treatment)
2. TPP in euthyroid stage (after treatment)

## ผลงานวิจัยที่ได้รับ

เมื่อได้ condition real-time PCR ของยีนทั้ง 6 ยีนเรียบร้อยแล้ว แล้วนำ mRNA expression ของแต่ละยีนนั้นมาเปรียบเทียบโดยมี positive control, negative control รวมทั้งผู้ป่วย Grave's disease with hyperthyroid and without hyperthyroid (post-treatment) ดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 จะเห็นว่า relation mRNA expression ของ Na-K ATPase  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit จะสูงขึ้นในผู้ป่วย hyperthyroid ก่อนรักษาประมาณ 3 เท่าเทียบกับ control และกลับสู่ค่าปกติหลังจากรักษาภาวะ hyperthyroid แล้ว (รูป 1B, 1C) ในขณะที่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$  และ  $\beta_3$  submit ไม่พบการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังรักษา ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า mRNA expression ของ  $\alpha_2$  และ  $\beta_1$  subunit ของ Na-K ATPase มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ thyroid hormone โดยเฉพาะ T3

## Results

The characteristics of the patients are shown in **Table 1**. The duration of the treatment of hyperthyroid to reach the euthyroid status ranged from 10-24 months (mean = 13.3 months).

In hyperthyroid patients, the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  subunit of the  $Na^+ - K^+ - ATPase$  was increased  $\sim 3$  folds in pre-treatment compared to post-treatment ( $2.98 \pm 0.52$  versus  $0.95 \pm 0.40$ ,  $P < 0.01$ ) and was different compared to the normal controls ( $2.98 \pm 0.52$  versus  $1.0 \pm 0.23$ ,  $P = 0.02$ ) (Figure 1). There was no difference in the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  subunit between the post-treatment patients (euthyroid) and the control subjects ( $0.95 \pm 0.40$  versus  $1.0 \pm 0.23$ ,  $P = 0.95$ ). For the  $\beta_1$  subunit, the relative mRNA expression in hyperthyroid patients was also increased  $\sim 2.8$  folds before treatment ( $2.83 \pm 0.38$  versus  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ) and was also

different compared to the normal controls ( $2.83 \pm 0.38$  versus  $1.0 \pm 0.28$ ,  $P < 0.01$ ).

There was no difference in the relative mRNA expression of the  $\beta_1$  subunit between euthyroid patients and control subjects ( $1.10 \pm 0.27$  versus  $1.0 \pm 0.28$ ,  $P = 0.74$ ) (Figure 1).

For the  $\alpha_1, \alpha_3, \beta_2$  and  $\beta_3$  subunits, there were no differences in the relative mRNA expression between pre- and post-treatment in hyperthyroid patients. There were also no differences in the relative mRNA expression of the  $\alpha_1, \alpha_3, \beta_2$  or  $\beta_3$  subunits between hyperthyroid patients and control subjects (Figure 1).

### **Correlations between thyroid hormone and the relative mRNA expression of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$**

In hyperthyroid patients and control subjects, the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were positively correlated to serum T3 ( $r = 0.75$ ,  $P = 0.001$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.66$ ,  $P = 0.003$  for  $\beta_1$ ), T4 ( $r = 0.63$ ,  $P = 0.006$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.48$ ,  $P = 0.04$  for  $\beta_1$ ) and FT4 ( $r = 0.64$ ,  $P = 0.005$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.58$ ,  $P = 0.01$  for  $\beta_1$ ). No correlation was found between the relative mRNA expression of the  $\alpha_1, \alpha_3, \beta_2$  or  $\beta_3$  subunits and serum T3, T4, or FT4.

### **Effects of thyroid hormone on human skeletal muscle membrane $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ expression**

The immunofluorescent staining of the  $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$  and  $\beta_2$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  using antibody recognized human skeletal muscle  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  protein largely in the plasma membranes of muscle fibers. However, there was also some non-specific FITC and TRITC labeling (observed as bright yellow and bright orange staining) as this was also present in muscle sections incubated with secondary antibody alone (Figure 2A, E, I, M). The plasma membrane staining was negative using only secondary antibody in control muscle fibers (Figure 2A, E, I, M). The membrane protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were increased in muscle fibers of hyperthyroid patients (Figure 2 G and K) and decreased after treatment (euthyroid) (Figure 2 H and L). There was no difference in membrane protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits in muscle fibers of euthyroid patients and control subjects (Figure 2 H vs. F and L vs. J). In contrast, there was no difference in membrane protein abundance of both  $\alpha_1$  and  $\beta_2$  subunits in muscle fibers between hyperthyroid and euthyroid patients (Figure 2 C

**vs. D and O vs. P).** There was also no difference in membrane protein abundance of both  $\alpha_1$  and  $\beta_2$  subunits in muscle fibers between hyperthyroid patients and control subjects (**Figure 2 C vs. B and O vs. N**). These results were consistent with the results from western blot analysis that showed the increase in the expression of the  $\alpha_2$  (~ 100-105 kDa) and  $\beta_1$  (~ 45-52 kDa), but not  $\alpha_1$  (~ 100-105 kDa) or  $\beta_2$  (~ 45-52 kDa), subunits in hyperthyroid patients and decrease after treatment (Figure 3). There was no difference in protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits in muscle fibers of euthyroid patients and control subjects.

## Discussion

The present study demonstrated, for the first time, that thyroid hormone up regulates  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase } \alpha_2$  - and  $\beta_1$  - mRNA and protein expression in human skeletal muscles of hyperthyroid patients and the expression of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  returns to normal level after treatment of hyperthyroidism. In this study, the expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  mRNA correlated well with thyroid hormone levels especially T3 levels. In hyperthyroid patients, the average T3 level increased 3 folds in pre-treatment compared to post-treatment whereas the average relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits increased  $\sim 3$  and  $\sim 2.8$  folds, respectively. The elevation of mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits was confirmed in protein levels by both immunoblotting and immunohistochemical studies. Immunohistochemical study showed that the intensity of plasma membrane staining of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were higher in pre-treatment and decreased after treatment. The correlation of thyroid hormone and both mRNA and protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  implied that thyroid hormone up regulates the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  protein expression at least, in part, at mRNA level. These results were in agreement with a previous study by Horowitz et al. and Azuma et al. who reported the increase in the  $\alpha_2$ , not  $\alpha_1$ , mRNA and protein abundance during transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscles. For the  $\beta$  subunit, we observed an increase in  $\beta_1$ , not  $\beta_2$ , mRNA and protein abundance when patients were hyperthyroid and a decrease to normal level after treatment. These results contrasted to the previous study by Azuma et al. who reported the coordinate increase in  $\beta_2$ , not  $\beta_1$ , mRNA and protein abundance with that of  $\alpha_2$  isoform in transition from hypothyroid to hyperthyroid in rat skeletal muscles. In the previous study, the investigators used the skeletal muscle from the whole hind limb whereas vastus lateralis was used in this study. It is known that  $\beta$  subunit in rat skeletal muscles is muscle-type specific. Hundal et al. reported that pooled membrane from muscle enriched in slow twist oxidative fibers express  $\beta_1$ , not  $\beta_2$ , whereas pooled membranes from muscles composed of fast twist glycolytic fibers express  $\beta_2$ , not  $\beta_1$ . It is possible that the difference in the results of  $\beta$  subunit expression in this study and the previous one might be due to the difference in the tissue used in the particular experiment or related to the difference in isoform expression of the muscles between rodents and humans.

In human skeletal muscle disease, thyrotoxic periodic paralysis (TPP) is typically seen in hyperthyroid males developing hypokalemia due to shift of  $\text{K}^+$  from extracellular

water space and paralysis during the disease attacks . Thyroid hormone up regulates the number of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  pump in human skeletal muscles . However, most of the hyperthyroid patients, except TPP, do not have hypokalemia. It is possible that there might be some defects related to the quantity or quality of the pump in muscles of TPP patients. Studies in the effect of thyroid hormone on the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  in muscles of TPP patients may provide knowledge to answer the above questions.

In summary, our study demonstrates that thyroid hormone up regulates mRNA and protein expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  in human skeletal muscles and this regulation is operated at least, in part, at mRNA level.

### **Acknowledgements**

Our grateful appreciation is extended to all patients who participated in our studies. This work was supported by The Thailand Research Fund. The authors thank Professor Rajata Rajatanavin and Dr. Chagriya Kitiyakara for many helpful discussions, and Dr. Atiporn Ingsathit for statistical analysis in this manuscript.

## บทวิจารณ์เพิ่มเติม

ปัจจุบันคณะผู้วิจัยยังได้เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรค TPP, conn's syndrom และ hypokalemia periodic paralysis ซึ่งผู้ป่วยดังกล่าวมีลักษณะสำคัญที่คล้ายคลึงกันคือมี hypokalemia และ muscle weakness แต่เนื่องจากเงินทุนและเวลาไม่เพียงพอที่จะใช้ในการศึกษา คณะผู้วิจัยจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะได้รับการสนับสนุนในการขอทุนวิจัยในครั้งต่อไป เพื่อคณะผู้วิจัยจะได้มีโอกาสศึกษาโรคต่างๆดังกล่าวได้ละเอียดลึกซึ้งขึ้น และนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานการแพทย์ เป็นชื่อเสียงของประเทศ และนำไปสู่การคิดค้นยา หรือ วิทยาการใหม่ในการรักษาหรือป้องกันโรคซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่ผู้ป่วยในที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

1. Phakdeekitcharoen B, Ruangraksa C, Radinahamed P. Hypokalemia and paralysis in the Thai population. *Nephrol Dial Transplant* 19:2013-8, 2004
2. Satoyoshi E, Murakami K, Kowa H, et al. Periodic paralysis in hyperthyroidism. *Neurology* 13:746-752, 1963
3. McFadzean AJS, Yeung R. Periodic paralysis complicating thyrotoxicosis in Chinese. *Br Med J* 1:451-455, 1967
4. Ko Ko GTC, Chow CC, Yeung VTF, Chan HHL, Li JKY, Cockram CS. Thyrotoxic periodic paralysis in a Chinese population. *Q J Med* 89:463-468, 1996
5. Dias da Silva MR, Cerutti JM, Tengan CH, Furuzawa GK, Vieira TC, Gabbai AA, Maciel RM. Mutations linked to familial hypokalaemic periodic paralysis in the calcium channel alpha1 subunit gene (Cav1.1) are not associated with thyrotoxic hypokalaemic periodic paralysis. *Clin Endocrinol* 56:367-375, 2002
6. Azuma KK, Hensley BC, Tang MJ, McDonough AA. Thyroid hormone specifically regulates skeletal muscle Na-K-ATPase  $\alpha_2$ - and  $\beta_2$ -isoforms. *Am J Physiol* 265: 880-887, 1993
7. Asano Y, Liberman UA, Edelman IS. Thyroid thermogenesis. Relationships between  $\text{Na}^+$ -dependent respiration and  $\text{Na}^+ + \text{K}^+$  - adenosine triphosphatase activity in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 57:368-379, 1976
8. Biron RA, Burger A, Chinet A, Clausen T, Dubois-Ferriere R. Thyroid hormones and the energetics of active sodium-potassium transport in mammalian skeletal muscle. *J Physiol Lond* 297: 47-60, 1979
9. Kjeldsen K, Everts ME, Clausen T. The effects of thyroid hormones on  $^3\text{H}$ -ouabain binding site concentration, Na,K-contents and  $^{86}\text{Rb}$ -efflux in rat skeletal muscle. *Pfluegers Arch* 406: 529-535, 1986
10. Lin MH, Akera T. Increased  $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase concentrations in various tissues of rats caused by thyroid hormone treatments. *J Biol Chem* 253: 723-726, 1978
11. Sweadner KJ, Goldstein SM. Active transport of sodium and potassium ions. *N Eng J Med* 302:777-83, 1980
12. Vasilets LA, Schwarz W. The Na/K pump: structure and function of the alpha-subunit. *Cellular physiology and Biochemistry* 4: 81-95, 1994
13. Schmalzing G, Gloor S. Na/K-pump beta subunit: structure and function. *Cellular physiology and Biochemistry* 4: 96-114, 1994

14. Mc Donough AA, Schmitt C. Comparison of subunits of cardiac, brain, and kidney  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. ***Am J Physiol*** 248 (*cell physio* 17): C247-C251, 1985
15. Hundal HS, Maxwell DL, Ahmed A, Darakhshan F, Mitsumoto Y, Klip A: Subcellular distribution and immunocytochemical localization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase subunit isoforms in human skeletal muscle. ***Mol Mem Biol*** 11: 255-262, 1994
16. Juel C, Nielsen JJ, Bangsbo J. Exercise-induced translocation of Na-K pump subunits to the plasma membrane in human skeletal muscle ***Am J Physiol*** 278: 1107-1110, 2000
17. Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramla T, Blostein R, Klip A. Insulin induces translocation of the  $\alpha_2$  and  $\beta_2$  subunits of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. ***J Biol Chem*** 267: 5040-5043, 1992
18. Lavoie L, Roy D, Ramlal T, Dombrowski L, Martin-Vasallo P, Marette A, Carpentier J, Klip A. Insulin-induced translocation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase subunits to the plasma membrane is muscle fiber type specific ***Am J Physiol*** 270 (*cell physio* 39): C1421-C1429, 1996
19. Kjeldsen K, Gottsche CO, Norgaard A, Thomassen A, Clausen T. Effect of thyroid function on number of Na-K pumps in human skeletal muscle. ***Lancet*** 2: 8-10, 1984.
20. Azuma KK, Hensley BC, Putnam DS, McDonough AA. Hypokalemia decreases  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_2$ - but not  $\alpha_1$ -isoform abundance in heart, muscle, and brain. ***Am J Physiol*** 260(*cell physio* 29): C958-C964, 1991



**Table 1:** The clinical features and thyroid hormones in 8 Grave's disease patients and 10 control subjects

	Grave's disease		<i>P</i> -value Hyper. VS Eu.	Controls	<i>P</i> -value	
	Hyperthyroid	Euthyroid			Hyper. VS Con.	Eu. VSCon.
Age (year)	37.4 ± 8.7			39.9 ± 6.1	0.5	
Weight (Kg)	59.4 ± 6.1			59.8 ± 6.3	0.9	
Body mass index (Kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 1.2			23.2 ± 0.7	0.5	
T3 (normal 80-160 ng/dl)	262 ± 75	86 ± 21	0.001	89 ± 8	0.001	0.7
Free T4 (normal 0.9-2.0 ng/dl)	3.4 ± 0.8	1.2 ± 0.3	0.001	1.3 ± 0.2	0.001	0.5
T4 (normal 4.0-12.0 µg/dl)	12.1 ± 0.3	5.2 ± 1.5	0.005	5.2 ± 0.9	0.001	0.9
TSH (normal 0.3-4.0 µIU/ml )	<0.01	1.2 ± 0.3	0.001	1.2 ± 0.5	0.001	0.9

Notes. Hyper. = hyperthyroid, Eu. = euthyroid, Con. = control, T3 = 3,5,3' -triiodothyronine, T4 = thyroxine, TSH = thyroid stimulating hormone

## Figure legends

**Figure 1:** The changes of the relative mRNA abundance of the  $\alpha_1$  (A),  $\alpha_2$  (B),  $\beta_1$  (C), and  $\beta_2$  (D) isoforms of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  to the house keeping gene (GAPDH) in skeletal muscles of hyperthyroid patients (Hyper, N=8) and euthyroid patients (Eu, N=8) compared to the control subjects (Con, N=10). The expression level obtained in control samples was set as 1 for comparison. The values are showed in mean  $\pm$  SE (bars). Paired *t*-tests were used for comparison (*P* values) between hyper- and euthyroid patients and unpaired *t*-tests were used for comparison between control and hyperthyroid or euthyroid patients. \* *P* < 0.05 greater than euthyroid, # *P* < 0.05 greater than control.

- Hyperthyroid patients
- Euthyroid patients
- Control subjects

**Figure 2:** Immunohistochemistry of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  in 10  $\mu\text{m}$  transverse sections of the vastus lateralis muscle samples from Grave's disease patients and control subjects. Muscle sections were fixed and either treated with no primary antibody (negative control) or with specific antibody followed by secondary antibody. The specific antibodies included anti- $\alpha_1$ , anti- $\alpha_2$ , anti- $\beta_1$ , and anti- $\beta_2$  antibodies as described in the in the Method. All images were visualized at a magnification of x 200. Neg, Skeletal muscle samples from control subjects treated with only secondary antibody (no primary antibody)

Con, Skeletal muscle samples from control subjects treated with specific primary antibody

Hyper, Skeletal muscle samples from hyperthyroid patients treated with specific primary antibody

Eu, Skeletal muscle samples from euthyroid patients treated with specific primary antibody

**Figure 3:** The representative of immunoblotting analysis and the relative protein expression of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits of the  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  in skeletal muscles of hyperthyroid patients (Hyper), euthyroid patients (Eu) and control subjects (Con).

Arrows indicated the molecular weight of the protein. kDa, kilodalton.

The bars on the right show the relative protein expression in each group.

Data are mean  $\pm$  SE (bars);  $n = 8$  for hyperthyroid and euthyroid patients,  $n = 10$  for control subjects. All results were normalized against controls.

\*  $P < 0.05$  greater than euthyroid group. #  $P < 0.05$  greater than control group.

- Hyperthyroid patients
- Euthyroid patients
- Control subjects

## Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. **Phakdeekitcharoen B**, Phudhichareonrat S, Pookarnjanamorakot C, Kijkunasathian C, Tubtong N, Kittikanokrat W, Radinahamed P. Thyroid hormone increases mRNA and protein expression of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase } \alpha_2 -$  and  $\beta_1$  - subunits in human skeletal muscles. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 353-358, 2007
2. Phakdeekitcharoen B, Kreepala C, Liratpong S. Urine indices to determine the cause of hypokalemia during treatment.  
(in preparation)

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ

1. โครงการนี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานการแพทย์ของโรคกลุ่มกล้ามเนื้อผิดปกติ ซึ่งเป็นกลุ่มโรคที่มีความชุกสูงในประเทศไทย การศึกษาโรคในกลุ่มดังกล่าวจะนำไปสู่องค์ความรู้ใหม่ ซึ่งจะเป็นชิ้นส่วนของภาพเล็กๆที่จะประกอบเป็นภาพใหญ่ที่จะนำไปสู่ความเข้าใจใน muscle physiology ในระดับ molecular level ซึ่งจะนำไปสู่การคิดค้นยาหรือวิธีการต่าง ๆ ที่จะนำไปสู่การรักษาหรือป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกลุ่มโรคดังกล่าวหรือโรคอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กันที่มีพื้นฐานทางด้าน muscle physiology เดียวกัน
2. ตอบสนองนโยบายมหาวิทยาลัยเพื่อให้เกิดผลงานวิจัยในระดับสากลเพื่อองค์ความรู้ใหม่ๆ และการประยุกต์ใช้ ทำให้ประเทศไทยสามารถที่จะแข่งขันทางด้านวิจัยกับต่างประเทศได้ภายใต้ข้อจำกัดต่าง ๆ ทางด้านกำลังคน ทุนวิจัยและเทคโนโลยี การศึกษาโรคดังกล่าวในบ้านเราจะทำให้เกิดความได้เปรียบทั้งทางด้านการศึกษาทางคลินิกและการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน
3. นำเอาความรู้ที่ได้ไปใช้ในการวินิจฉัยดูแลรักษาผู้ป่วยโรคนี้ การศึกษาโรคดังกล่าวมีความสำคัญเพราะเป็นปัญหาของผู้ป่วยในประเทศไทยโดยตรง ซึ่ง

ยังไม่มีใครศึกษาโรคนี้ในแง่มูมนี้มาก่อน การศึกษาดังกล่าวจะนำมาสู่  
ประโยชน์ต่อการวินิจฉัยและดูแลผู้ป่วยโรคกลุ่มนี้ในที่สุด

4. นำความรู้ต่างๆ ที่ได้มาพัฒนาเพื่อการเรียนการสอนแก่แพทย์รุ่นหลัง ทำให้  
เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางด้านการแพทย์เพื่อถ่ายทอดแก่แพทย์รุ่นหลังและเป็น  
ประโยชน์ต่อการดูแลผู้ป่วยโรคกลุ่มนี้ในที่สุด
5. พัฒนาเทคนิคการตรวจเพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในทาง clinic ในที่สุด  
สามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจดังกล่าวมาวินิจฉัยแยกโรคในกรณีที่มีปัญหา  
จากการวินิจฉัยโรคกล้ามเนื้ออ่อนแรงจากโปรแตสเซียมต่ำได้

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

1. Phakdeekitcharoen B. Hypokalemic periodic paralysis (Editorial review) in: Pipop  
Jirapinyo Editor. **Siriraj Medical Journal** 60(1): 1-3, 2008

## ภาคผนวก

## BRIEF REPORT

# Thyroid Hormone Increases mRNA and Protein Expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha_2$ and $\beta_1$ Subunits in Human Skeletal Muscles

Bunyong Phakdeekitcharoen, Suchart Phudhichareonrat, Chathchai Pookarnjanamorakot, Chusak Kijkunasathian, Nattha Tubtong, Wassana Kittikanokrat, and Piyanuch Radinahamed

Division of Nephrology, Department of Medicine (B.P., P.R.), and Departments of Orthopedics (C.P., C.K.) and Pathology (N.T.), Research Center (W.K.), Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand; and Department of Pathology (S.P.), Prasat Neurological Institute, Bangkok 10400, Thailand

**Context:** Thyroid hormone regulates specific Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase isoforms in rodent skeletal muscles. No study has examined this relationship in human tissues.

**Objective:** This study investigated the effect of hyperthyroid status on the expression of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

**Design:** The vastus lateralis muscles from eight hyperthyroid patients were biopsied before and after treatment. Ten age-matched euthyroid subjects served as controls.

**Results:** In hyperthyroid patients, the average T<sub>3</sub> level was three times higher in pretreatment compared with posttreatment ( $262 \pm 75$  vs.  $86 \pm 21$  ng/dl,  $P = 0.001$ ). The relative mRNA expression of the  $\alpha_2$ , but not  $\alpha_1$  or  $\alpha_3$ , subunit was increased approximately 3-fold in

pretreatment ( $2.98 \pm 0.52$  vs.  $0.95 \pm 0.40$ ,  $P < 0.01$ ), whereas that of  $\beta_1$ , not  $\beta_2$  or  $\beta_3$ , subunit was increased approximately 2.8-fold in pretreatment ( $2.83 \pm 0.38$  vs.  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ). The relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits was positively correlated with the serum T<sub>3</sub> ( $r = 0.75$ ,  $P = 0.001$  and  $r = 0.66$ ,  $P = 0.003$ , respectively). Immunohistochemistry studies revealed an increase in protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$ , but not  $\alpha_1$  or  $\beta_2$ , subunits in the plasma membrane of muscle fibers of hyperthyroid patients, which decreased after treatment.

**Conclusions:** This provides the first evidence that, in human skeletal muscles, thyroid hormone up-regulates the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase protein expression at least, in part, at mRNA level, and the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits play the important role in this regulation. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 353–358, 2007)

THE Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is an integral membrane protein responsible for maintaining transmembrane ionic and electrochemical gradients (1). The enzyme is comprised of two subunits that are present in an equimolar ratio (2) that is a heterodimeric molecule consisting of a catalytic  $\alpha$ -subunit and a glycosylate  $\beta$ -subunit (3, 4). Different species and different tissues have different isoforms of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits (5, 6). In mammals, the  $\alpha$ -subunit exists in at least four isoforms,  $\alpha_1$ – $\alpha_4$  (7, 8). By immunological and biochemical studies,  $\alpha_2$  is the major catalytic isoform expressed in rodent skeletal muscles (2, 9, 10). Hundal *et al.* (11) have also shown that the  $\alpha_2$  subunit is a prominent subunit in human skeletal muscles. In contrast, the  $\beta$ -subunit exists in at least three isoforms,  $\beta_1$ – $\beta_3$  (8, 12), and appears to be important for the preservation of the stability of the  $\alpha$ -subunits and transport of mature enzyme complexes to the plasma membrane (6, 13, 14). The  $\beta_1$  subunit is an important subunit in rodent (15, 16) and human skeletal muscles (11, 17).

Thyroid hormone regulates the activity (18) and the number

(19) of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pumps in rodent skeletal muscles. In human skeletal muscles, thyroid hormone correlates with the number of the pumps (20). Isoform  $\alpha_2$ - and  $\beta_2$ -mRNA and protein abundance are increased significantly in rat skeletal muscles when there is a transition from the hypothyroid to the euthyroid stage (21). No information is currently available concerning the correlation of thyroid hormone and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase mRNA and protein abundance in human skeletal muscles. Therefore, this study aimed to examine the expression of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and thyroid hormone levels in the skeletal muscle of hyperthyroid patients.

## Subjects and Methods

### Subjects

Six females and two males with first diagnosis of Graves' disease were enrolled for the studies. The diagnosis of Graves' disease was based on symptoms and signs of clinical thyrotoxicosis, laboratory confirmation, and positive antithyroid antibodies. Seven patients had medical treatment with either propylthiouracil or methimazole. One patient was treated with subtotal thyroidectomy. For a control group, 10 age-matched subjects undergoing elective knee or hip surgery with euthyroid were included for the study.

### Muscle biopsy

Muscle biopsies were taken before and after treatment of thyrotoxicosis. After local anesthesia, a small incision was made through the skin

First Published Online October 10, 2006

Abbreviations: GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TPP, thyrotoxic periodic paralysis.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

and fascia. A vastus lateralis muscle sample was then excised and divided into two parts for quantitative mRNA expression assay, and for immunoblotting and immunohistochemical studies. Muscle samples were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For control subjects, only skeletal muscles that showed no sign of necrosis and that were judged to be well perfused and oxygenated were used. All participants gave their written informed consent after receiving oral and written information concerning the study according to the Declaration of Helsinki II. The study protocol was approved by the Ethical Committee for Research Involving Human Subjects of the Ramathibodi Hospital, Mahidol University.

### Real-time RT-PCR study

Muscle samples were weighed and minced into small pieces. Total RNA was extracted from 10–50 mg muscle using a commercially available kit (TRIzol; Life Technologies Inc., Carlsbad, CA). The purity of the RNAs measured by the UV spectrophotometer 260/280 was approximately 1.8–2.0. For each sample, 1  $\mu\text{g}$  of RNA was transcribed into cDNA using the Promega AMV RT kit (Promega, Madison, WI). The cDNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Specific primers and probes as previously published (22) were used to amplify mRNA sequences of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta_1$  subunits. The primer sequences for amplifying the  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  subunits included 5'-AG-ACTGTGTGCAGGGTTTGAC-3' and 5'-TGGCGTGAGTGCGTTAGG-3', 5'-GGACTCCACCCACTATGGTTACA-3' and 5'-CATAGAAGTTG-ATGACCCGGTTCA-3', and 5'-GTCCAGTTTATGTTGTCAGTT-3' and 5'-GGGTTTCCTTGAGAATAGCCAAAATC-3', respectively. Specific probes of  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  were 5'-CAAAGCCCAGGAGATCC-3', 5'-CAG-CCCTGTGTCTTCA-3', and 5'-CTGCATGCTTGAAGTAATGA-3', respectively. Probes were labeled with 6-carboxyfluorescein at the 5' end and 6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine at the 3' end. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA content was determined by using commercially available primers and probes (P/N 4326317E; Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers and probe optimization and validation of amplification efficiency were carried out. The ABI 7000 real-time PCR system was used for relative quantification. The PCR and condition were used as previously published (22). The comparative cycle threshold method (multiplex PCR, same tube) was used to calculate the relative gene expression (Applied Biosystems). The average cycle threshold of GAPDH mRNA in each group was  $27.1 \pm 2.2$  for  $\alpha_1$ ,  $27.2 \pm 2.2$  for  $\alpha_2$ ,  $28.1 \pm 1.4$  for  $\alpha_3$ ,  $28.2 \pm 1.6$  for  $\beta_1$ ,  $26.8 \pm 2.2$  for  $\beta_2$ , and  $27.5 \pm 2.9$  for  $\beta_3$ . There was no statistical difference among the groups ( $P = 0.13$ ).

### Immunohistochemistry study

Muscle samples were fixed with cryomatrix (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA) at  $-20^{\circ}\text{C}$  and were used to generate ultra-thin transverse cryostat sections (10  $\mu\text{m}$ ). Muscle sections were then either treated with no primary antibody or with specific antibodies overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The specific antibodies included anti- $\alpha_1$  monoclonal antibody (lot no. 05369), anti- $\alpha_2$  polyclonal antibody (lot no. 06168), anti- $\beta_1$  polyclonal antibody (lot no. 06170), and anti- $\beta_2$  polyclonal antibody (lot no. 06171; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The dilution of anti- $\alpha_1$  antibody is 1:40, anti- $\alpha_2$  is 1:20, anti- $\beta_1$  is 1:40, and anti- $\beta_2$  is 1:100. After two washes, the sections were incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature and washed again. The secondary antibody for monoclonal and polyclonal antibodies were fluorescein isothiocyanate-conjugated

antimouse IgG dilution 1:100 and tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated antirabbit IgG dilution 1:50 (Dako, Glostrup, Denmark), respectively. All sections were viewed using an inverted Nikon phase/fluorescence microscope and photographed using Fujichrome (ISO 50/18 degree) slide color films.

### Western blot analysis

Muscle samples of 30 mg were homogenized on ice in a buffer as previously published (23). Twenty ( $\beta_1$  and  $\beta_2$ ) or 40  $\mu\text{g}$  ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ) of protein was loaded in 10% separating gel. After electrophoresis, the protein was transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with blocking buffer [5% nonfat milk in Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST)]. Membranes were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in primary antibodies diluted in blocking solution. The dilution of anti- $\alpha_1$  and anti- $\alpha_2$  antibodies was 1:2000, and the dilution of anti- $\beta_1$  and anti- $\beta_2$  was 1:5000. Membranes were washed and incubated for 1 h in horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (goat antimouse or goat antirabbit immunoglobulins) diluted 1:10,000 in TBST solution. After three washes, membranes were incubated with chemiluminescent substrate (Pierce SuperSignal, West Pico, IL). The signal was detected and imaged (Pierce CL-X Posure). Resulting autoradiographs were densitometrically scanned and quantified.

### Statistical analysis

Statistics were analyzed with SPSS 11.0. Numerical data were shown with mean  $\pm$  SD. The relative mRNA expression and protein expression were shown in mean  $\pm$  SE. Comparisons used the two-tailed paired (within group) and unpaired *t* test (between groups). Correlations were determined by linear regression. There was a significant difference if the *P* value was less than 0.05.

## Results

The characteristics of the patients are shown in Table 1. The duration of the treatment of hyperthyroid to reach the euthyroid status ranged from 10–24 months (mean = 13.3 months).

In hyperthyroid patients, the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  subunit of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase was increased approximately 3-fold in pretreatment compared with posttreatment ( $2.98 \pm 0.52$  vs.  $0.95 \pm 0.40$ ,  $P < 0.01$ ) and was different compared with the normal controls ( $2.98 \pm 0.52$  vs.  $1.0 \pm 0.23$ ,  $P = 0.02$ ) (Fig. 1). There was no difference in the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  subunit between the posttreatment patients (euthyroid) and the control subjects ( $0.95 \pm 0.40$  vs.  $1.0 \pm 0.23$ ,  $P = 0.95$ ). For the  $\beta_1$  subunit, the relative mRNA expression in hyperthyroid patients was also increased approximately 2.8-fold before treatment ( $2.83 \pm 0.38$  vs.  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.01$ ) and was also different compared with the normal controls ( $2.83 \pm 0.38$  vs.  $1.0 \pm 0.28$ ,  $P < 0.01$ ). There was no difference in the relative mRNA expression of

**TABLE 1.** The clinical features and thyroid hormones in eight Graves' disease patients and 10 control subjects

	Graves' disease			Controls	<i>P</i> value	
	Hyper	Eu	<i>P</i> value Hyper vs. Eu		Hyper vs. Controls	Eu vs. Controls
Age (yr)	$37.4 \pm 8.7$			$39.9 \pm 6.1$	0.5	
Weight (kg)	$59.4 \pm 6.1$			$59.8 \pm 6.3$	0.9	
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	$23.5 \pm 1.2$			$23.2 \pm 0.7$	0.5	
T <sub>3</sub> (normal 80–160 ng/dl)	$262 \pm 75$	$86 \pm 21$	0.001	$89 \pm 8$	0.001	0.7
Free T <sub>4</sub> (normal 0.9–2.0 ng/dl)	$3.4 \pm 0.8$	$1.2 \pm 0.3$	0.001	$1.3 \pm 0.2$	0.001	0.5
T <sub>4</sub> (normal 4.0–12.0 $\mu\text{g/dl}$ )	$12.1 \pm 0.3$	$5.2 \pm 1.5$	0.005	$5.2 \pm 0.9$	0.001	0.9
TSH (normal 0.3–4.0 $\mu\text{IU/ml}$ )	$<0.01$	$1.2 \pm 0.3$	0.001	$1.2 \pm 0.5$	0.001	0.9

Hyper, Hyperthyroid; Eu, euthyroid.



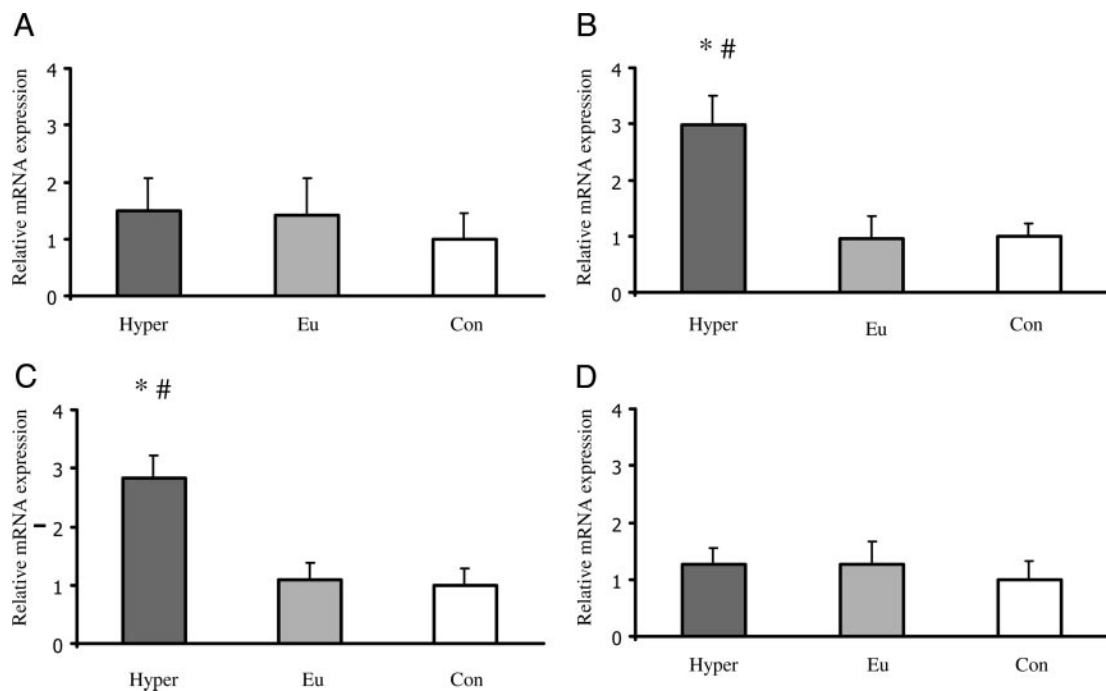


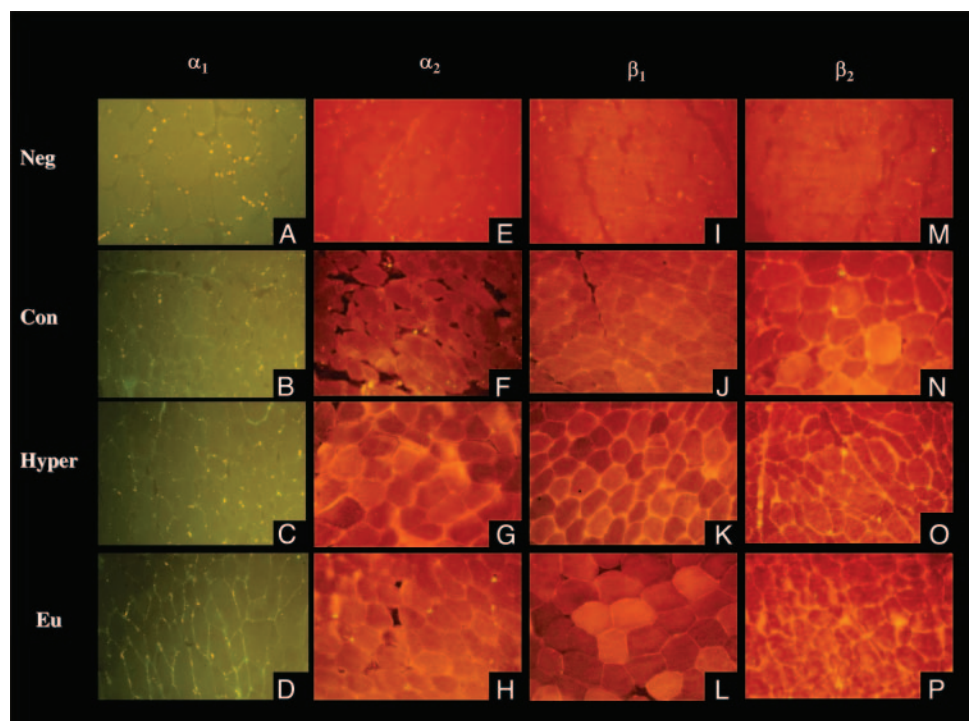
FIG. 1. The changes of the relative mRNA abundance of the  $\alpha_1$  (A),  $\alpha_2$  (B),  $\beta_1$  (C), and  $\beta_2$  (D) isoforms of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase to the housekeeping gene (GAPDH) in skeletal muscles of hyperthyroid patients (Hyper, n = 8) and euthyroid patients (Eu, n = 8) compared with the control subjects (Con, n = 10). The expression level obtained in control samples was set as 1 for comparison. The values are shown in mean  $\pm$  SE (bars). Paired *t* tests were used for comparison (*P* values) between hyperthyroid and euthyroid patients, and unpaired *t* tests were used for comparison between control and hyperthyroid or euthyroid patients. \*, *P* < 0.05 greater than euthyroid; #, *P* < 0.05 greater than control. Dark gray box, Hyperthyroid patients; light gray box, euthyroid patients; white box, control subjects.

the  $\beta_1$  subunit between euthyroid patients and control subjects ( $1.10 \pm 0.27$  vs.  $1.0 \pm 0.28$ , *P* = 0.74) (Fig. 1).

For the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ , and  $\beta_3$  subunits, there were no differences in the relative mRNA expression between pretreat-

ment and posttreatment in hyperthyroid patients. There were also no differences in the relative mRNA expression of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ , or  $\beta_3$  subunits between hyperthyroid patients and control subjects (Fig. 1).

FIG. 2. Immunohistochemistry of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in 10- $\mu$ m transverse sections of the vastus lateralis muscle samples from Graves' disease patients and control subjects. Muscle sections were fixed and treated either with no primary antibody (negative control) or with specific antibody followed by secondary antibody. The specific antibodies included anti- $\alpha_1$ , anti- $\alpha_2$ , anti- $\beta_1$ , and anti- $\beta_2$  antibodies as described in *Subjects and Methods*. All images were visualized at a magnification of  $\times 200$ . Neg, Skeletal muscle samples from control subjects treated with only secondary antibody (no primary antibody). Con, Skeletal muscle samples from control subjects treated with specific primary antibody. Hyper, Skeletal muscle samples from hyperthyroid patients treated with specific primary antibody. Eu, Skeletal muscle samples from euthyroid patients treated with specific primary antibody.



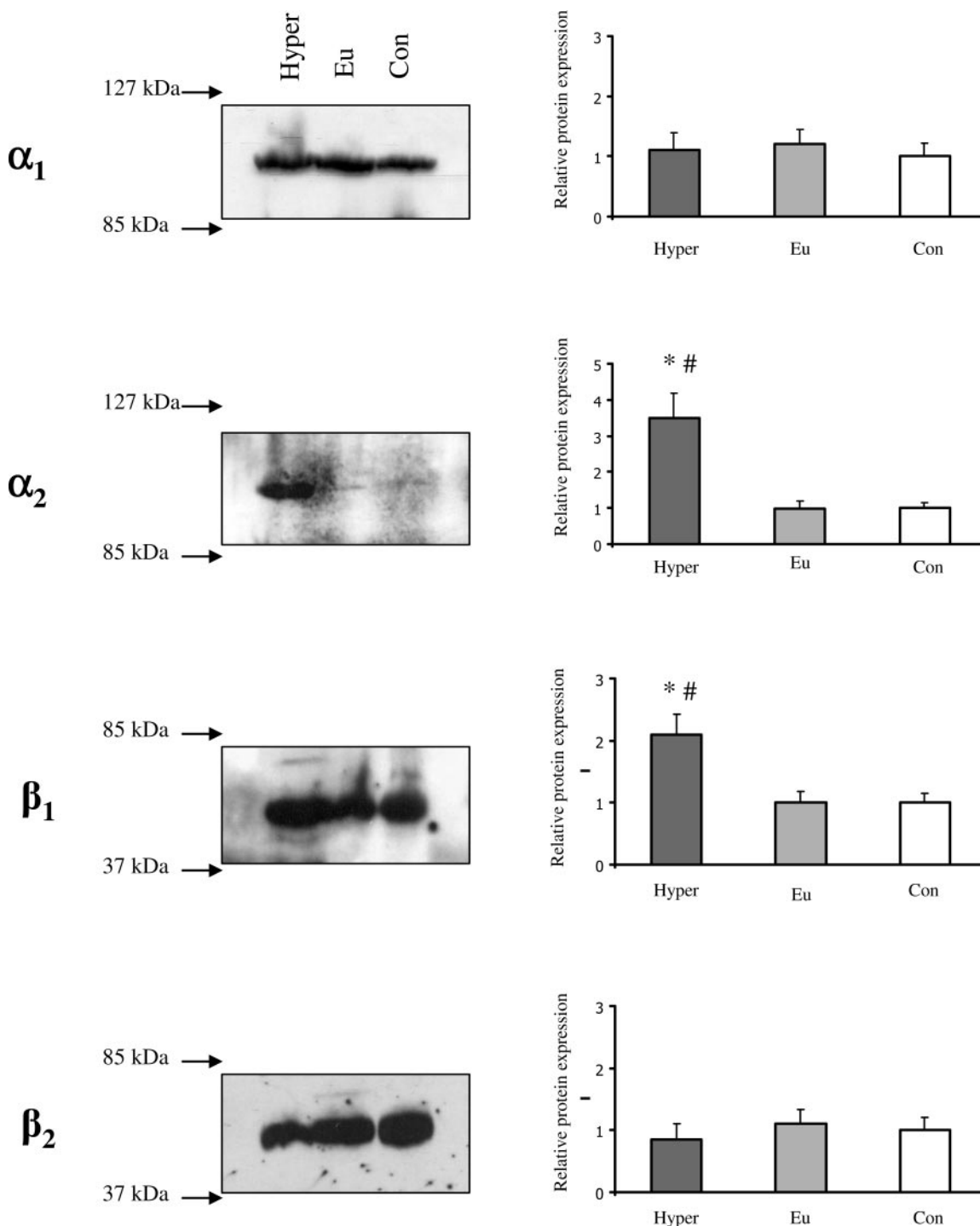


FIG. 3. The representative of immunoblotting analysis and the relative protein expression of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in skeletal muscles of hyperthyroid patients (Hyper), euthyroid patients (Eu), and control subjects (Con). Arrows indicated the molecular weight of the protein. The bars on the right show the relative protein expression in each group. Data are mean  $\pm$  SE (bars); n = 8 for hyperthyroid and euthyroid patients, n = 10 for control subjects. All results were normalized against controls. \*,  $P < 0.05$  greater than euthyroid group; #,  $P < 0.05$  greater than control group. Dark gray box, Hyperthyroid patients; light gray box, euthyroid patients; white box, control subjects.

#### Correlations between thyroid hormone and the relative mRNA expression of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

In hyperthyroid patients and control subjects, the relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were positively correlated to serum T<sub>3</sub> ( $r = 0.75$ ,  $P = 0.001$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.66$ ,

$P = 0.003$  for  $\beta_1$ ), T<sub>4</sub> ( $r = 0.63$ ,  $P = 0.006$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.48$ ,  $P = 0.04$  for  $\beta_1$ ), and free T<sub>4</sub> ( $r = 0.64$ ,  $P = 0.005$  for  $\alpha_2$  and  $r = 0.58$ ,  $P = 0.01$  for  $\beta_1$ ). No correlation was found between the relative mRNA expression of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$ , or  $\beta_3$  subunits and serum T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, or free T<sub>4</sub>.

### Effects of thyroid hormone on human skeletal muscle membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase expression

The immunofluorescent staining of the  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ , and  $\beta_2$  subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase using antibody recognized human skeletal muscle Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase protein largely in the plasma membranes of muscle fibers. However, there was also some nonspecific fluorescein isothiocyanate and tetramethylrhodamine isothiocyanate labeling (observed as bright yellow and bright orange staining) as this was also present in muscle sections incubated with secondary antibody alone (Fig. 2, A, E, I, and M). The plasma membrane staining was negative using only secondary antibody in control muscle fibers (Fig. 2, A, E, I, and M). The membrane protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were increased in muscle fibers of hyperthyroid patients (Fig. 2, G and K) and decreased after treatment (euthyroid) (Fig. 2, H and L). There was no difference in membrane protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits in muscle fibers of euthyroid patients and control subjects (Fig. 2, H *vs.* F and L *vs.* J). In contrast, there was no difference in membrane protein abundance of both  $\alpha_1$  and  $\beta_2$  subunits in muscle fibers between hyperthyroid and euthyroid patients (Fig. 2, C *vs.* D and O *vs.* P). There was also no difference in membrane protein abundance of both  $\alpha_1$  and  $\beta_2$  subunits in muscle fibers between hyperthyroid patients and control subjects (Fig. 2, C *vs.* B and O *vs.* N). These results were consistent with the results from Western blot analysis that showed the increase in the expression of the  $\alpha_2$  (~100–105 kDa) and  $\beta_1$  (~45–52 kDa), but not  $\alpha_1$  (~100–105 kDa) or  $\beta_2$  (~45–52 kDa), subunits in hyperthyroid patients and decrease after treatment (Fig. 3). There was no difference in protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits in muscle fibers of euthyroid patients and control subjects.

### Discussion

The present study demonstrated, for the first time, that thyroid hormone up-regulates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_2$ - and  $\beta_1$ -mRNA and protein expression in human skeletal muscles of hyperthyroid patients and the expression of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase returns to normal level after treatment of hyperthyroidism. In this study, the expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  mRNA correlated well with thyroid hormone levels, especially T<sub>3</sub> levels. In hyperthyroid patients, the average T<sub>3</sub> level increased 3-fold in pretreatment compared with posttreatment, whereas the average relative mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits increased approximately 3- and 2.8-fold, respectively. The elevation of mRNA expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits was confirmed in protein levels by both immunoblotting and immunohistochemical studies. Immunohistochemical study showed that the intensity of plasma membrane staining of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits were higher in pretreatment and decreased after treatment. The correlation of thyroid hormone and both mRNA and protein abundance of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase implied that thyroid hormone up-regulates the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase protein expression at least, in part, at mRNA level. These results were in agreement with previous studies by Horowitz *et al.* (21) and Azuma *et al.* (10), who reported the increase in the  $\alpha_2$ , not  $\alpha_1$ , mRNA and protein abundance during transition from hypothyroid to hyperthyroid state in rat skeletal muscles (10,

21). For the  $\beta$ -subunit, we observed an increase in  $\beta_1$ , not  $\beta_2$ , mRNA and protein abundance when patients were hyperthyroid, and a decrease to normal level after treatment. These results contrasted to the previous study by Azuma *et al.* (10), who reported the coordinate increase in  $\beta_2$ , not  $\beta_1$ , mRNA and protein abundance with that of  $\alpha_2$  isoform in transition from hypothyroid to hyperthyroid in rat skeletal muscles. In the previous study, the investigators used the skeletal muscle from the whole hind limb, whereas vastus lateralis was used in this study. It is known that  $\beta$ -subunit in rat skeletal muscles is muscle-type specific (15, 24, 25). Hundal *et al.* (24) reported that pooled membrane from muscle enriched in slow twitch oxidative fibers express  $\beta_1$ , not  $\beta_2$ , whereas pooled membranes from muscles composed of fast twitch glycolytic fibers express  $\beta_2$ , not  $\beta_1$ . It is possible that the difference in the results of  $\beta$ -subunit expression in this study and the previous one might be due to the difference in the tissue used in the particular experiment (26, 27) or related to the difference in isoform expression of the muscles between rodents and humans.

In human skeletal muscle disease, thyrotoxic periodic paralysis (TPP) is typically seen in hyperthyroid males developing hypokalemia due to shift of K<sup>+</sup> from extracellular water space and paralysis during the disease attacks (28). Thyroid hormone up-regulates the number of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pump in human skeletal muscles (20). However, most of the hyperthyroid patients, except TPP, do not have hypokalemia. It is possible that there might be some defects related to the quantity or quality of the pump in muscles of TPP patients. Studies on the effect of thyroid hormone on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in muscles of TPP patients may provide knowledge to answer the above questions.

In summary, our study demonstrates that thyroid hormone up-regulates mRNA and protein expression of the  $\alpha_2$  and  $\beta_1$  subunits of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in human skeletal muscles and this regulation is operated at least, in part, at mRNA level.

### Acknowledgments

Our grateful appreciation is extended to all patients who participated in our studies. We thank Prof. Rajata Rajatanavin and Dr. Chagriya Kitiyakara for many helpful discussions, and Dr. Atiporn Ingsathit for statistical analysis in this manuscript.

Received March 13, 2006. Accepted October 3, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Bunyong Phakdeekitcharoen, Division of Nephrology, Department of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. E-mail: RABPD@mucc.mahidol.ac.th.

This work was supported by The Thailand Research Fund and a Mahidol University Grant.

Disclosure Statement: All of the authors have nothing to declare.

### References

- Skou JC 1957 The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta* 23:394–401
- Young RM, Lingrel J 1987 Tissue distribution of mRNAs encoding the  $\alpha$  isoforms and  $\beta$  subunit of rat Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 145:52–58
- Lingrel JB, Huyse JV, O'Brien W, Jewell-Motz E, Askow R, Schultheis P 1994 Structure-function studies of the Na,K-ATPase. *Kidney Int* 44:S32–S39
- Sweadner KJ, McGrail KM, Khaw BA 1992 Discoordinate regulation of isoforms of Na,K-ATPase and myosin heavy chain in the hypothyroid postnatal rat heart and skeletal muscle. *J Biol Chem* 267:769–773

5. Vasilets LA, Schwarz W 1994 The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump: structure and function of the  $\alpha$ -subunit. *Cell Physiol Biochem* 4:81–95
6. Schmalzing G, Gloor S 1994 The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump  $\beta$  subunits: structure and function. *Cell Physiol Biochem* 4:96–114
7. Shull GE, Greeb J, Lingrel JB 1986 Molecular cloning of three distinct forms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit from rat brain. *Biochemistry* 25:8125–8132
8. Blanco G, Mercer RW 1998 Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275:F633–F650
9. Gick GG, Hatala MA, Chon D, Ismail-Beigi F 1993 Na,K-ATPase in several tissues of the rat: tissue-specific expression of subunit mRNAs and enzyme activity. *J Membr Biol* 131:229–236
10. Azuma KK, Hensley CB, Tang MJ, McDonough AA 1993 Thyroid hormone specifically regulates skeletal muscle Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 2- and  $\beta$ 2-isoforms. *Am J Physiol* 265:C680–C687
11. Hundal HS, Maxwell DL, Ahmed A, Darakhshan F, Mitumoto Y, Klip A 1994 Subcellular distribution and immunocytochemical localization of Na,K-ATPase subunit isoforms in human skeletal muscle. *Mol Mem Biol* 11:255–262
12. Malik N, Canfield VA, Beckers MC, Gros P, Levenson R 1996 Identification of the mammalian Na,K-ATPase  $\beta$ 3 subunit. *J Biol Chem* 271:22754–22758
13. McDonough AA, Geering K, Farley A 1990 The sodium pump needs its  $\beta$  subunit. *FASEB J* 4:1598–1605
14. Abriel H, Hasler U, Geering K, Horisberger JD 1999 Role of the intracellular domain of the  $\beta$  subunit in Na,K pump function. *Biochim Biophys Acta* 1418:85–96
15. Hundal HS, Marette A, Mitumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A 1992 Insulin induces translocation of the  $\alpha$ 2 and  $\beta$ 1 subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 267:5040–5043
16. Lavoie L, Roy D, Ramlal T, Dombrowski L, Martin-Vasallo P, Marette A, Carpentier J, Klip A 1996 Insulin-induced translocation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase subunits to the plasma membrane is muscle fiber type specific. *Am J Physiol* 270:C1421–C1429
17. Juel C, Nielsen JJ, Bangsbo J 2000 Exercise-induced translocation of Na-K pump subunits to the plasma membrane in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 278:1107–1110
18. Asano Y, Liberman UA, Edelman IS 1976 Thyroid thermogenesis. Relationships between Na<sup>+</sup>-dependent respiration and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase activity in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 57:368–379
19. Kjeldsen K, Everts ME, Clausen T 1986 The effects of thyroid hormones on <sup>3</sup>H-ouabain binding site concentration, Na,K-contents and <sup>86</sup>Rb-efflux in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 406:529–535
20. Kjeldsen K, Gottsche CO, Norgaard A, Thomassen A, Clausen T 1984 Effect of thyroid function on number of Na-K pumps in human skeletal muscle. *Lancet* 2:8–10
21. Horowitz B, Hensley CB, Quintero M, Azuma KK, Putnam D, McDonough AA 1990 Differential regulation of Na,K-ATPase  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, and  $\beta$  subunit mRNA and protein levels by thyroid hormone. *J Biol Chem* 265:14308–14314
22. Nordsborg N, Bangsbo J, Pilegaard H 2003 Effect of high-intensity training on exercise-induced gene expression specific to ion homeostasis and metabolism. *J Appl Physiol* 95:1201–1206
23. Murphy KT, Snow RJ, Petersen AC, Murphy RM, Mollica J, Lee JS, Garnham AP, Aughey RJ, Leppik JA, Medved I, Cameron-Smith D, McKenna MJ 2004 Intense exercise up-regulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase isoform mRNA, but not protein expression in human skeletal muscle. *J Physiol* 556:507–519
24. Hundal HS, Marette A, Ramlal T, Lui Z, Klip A 1993 Expression of  $\beta$  subunit isoforms of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is muscle type-specific. *FEBS Lett* 328:253–258
25. Thompson CB, Dorup I, Ahn J, Leong PK, McDonough AA 2001 Glucocorticoids increase sodium pump  $\alpha$ (2)- and  $\beta$ (1)-subunit abundance and mRNA in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C509–C516
26. Armstrong RB, Phelps RO 1984 Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat* 171:259–272
27. Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Murray TF, Hostler DP 2000 Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem* 48:623–629
28. Ko GTC, Chow CC, Yeung VTF, Chan HHL, Li JKY, Cockram CS 1996 Thyrotoxic periodic paralysis in a Chinese population. *Q J Med* 89:463–468

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.



# Hypokalemic Periodic Paralysis

The group of diseases that cause periodic paralysis are important and still problematic for the Thai population especially in the north-eastern part of the country. Hypokalemic periodic paralysis is one of the subgroups among this group. We can classify this subgroup into 3 diseases as follows:

1. Hypokalemic periodic paralysis (HypoPP)
2. Thyrotoxic periodic paralysis (TPP)
3. Renal tubular acidosis (RTA)

Hypokalemic periodic paralysis (HypoPP) is a genetic disease that causes transient weakness of limb muscles along with a low serum potassium level (hypokalemia).<sup>1</sup> The incidence is reported to be ~ 1/100,000 in the European population. The epidemiologic data in the Thai population is not available. The disease is transmitted by an autosomal dominant trait (AD). It is less penetrance and expression in females. Female patients might not have any clinical signs and symptoms even though there is an abnormality of the gene. The proportion of the disease seen in male: female is expected to be 3:1. A research by Fontaine et al, found that the penetrance in male = 100% and female ~ 80%.<sup>2</sup> The data collected from the Division of Nephrology, Department of Medicine, Ramathibodi Hospital, Bangkok found that this disease is less common in females. The proportion of male to female is 13:2.<sup>3</sup> The genetic transmission has not been clearly documented in the Thai population. Most of the patients do not have familial history.<sup>3</sup> HypoPP can be classified into 2 groups; 1) Familial hypokalemic periodic paralysis (Familial HypoPP) and 2) Sporadic hypokalemic periodic paralysis (Sporadic HypoPP). Familial HypoPP usually occurs in patients with periodic paralysis or proximal muscle weakness and the family history of autosomal dominant traits. Sporadic HypoPP does not have any family history of muscle weakness and is much more frequent in males. The average age of onset of the disease in Sporadic HypoPP is older than Familial HypoPP.<sup>3</sup>

HypoPP occurs in the patients aged between 20-30 years old. Sixty percent of patients will have the first symptoms before the age of 16. However, the author's own experience found that in some patients the onset of disease can occur after the age of 16 or even higher than 30 years old in the Thai population.<sup>3</sup> The provocative factors are; a rest after strenuous exercise, a high carbohydrate meal, stress, cold exposure and alcohol intake. The symptoms usually occur during the patient's sleep and have a paralysis attack when they wake up. The swallowing muscles and eye muscles are usually normal as well as the diaphragm. The intercostal muscle may also be weak. HypoPP does not affect the cardiac muscle, only the ECG change due to hypokalemia can be observed.

The frequency of attack is varied between patients. Some patients might have only one attack in their life time while others may have almost daily attacks, which

cause permanent muscle weakness. The pathology of the muscle is reported to be vacuolar myopathy which is more frequent in patients age 40-50 years old. However, vacuolar myopathy is also found in other muscle diseases such as end-plate myopathy, myotubular myopathy or polymyositis. The data from the author's own observation in Thai patients are listed in Table 1.

Fontaine et al, reported the use of positional cloning with a linkage study in three Portuguese families who had the disease and found positive lod-scores of markers on Chromosome 1 [1q31-32].<sup>2</sup> The following study by Ptacek et al, found that the HypoPP gene is the skeletal muscle voltage gate L-type calcium channel  $\alpha 1$ -subunit gene (*CACNIAS*) or dihydropyridine receptor (DHP) gene.<sup>4</sup> Voltage-gate calcium channel consists of 4 subunits;  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2/\delta$  and  $\beta$  in the proportion 1:1:1:1. The  $\alpha 1$  is the most important part. It acts as the calcium channel independently. If there is a co-expression of  $\alpha 1$  with  $\alpha 2/\delta$  and  $\beta$  subunits in xenopus oocytes, it will activate their functions dramatically.

The  $\alpha 1$ -subunit of the calcium channel consists of 4 homologous transmembrane domains. Each domain consists of 6 transmembranes  $\alpha$  helices (Fig 1). The amino- and carboxy-termini and linker regions between domains are located in cytoplasm. All four domains of the calcium channel are encoded by the *CACNIAS* gene. Each domain is located on the cell membrane and is separated by the membrane pore (Fig 1). The fourth unit of transmembrane ( $S_4$ ) is important for the voltage-dependence of activation. The genetic abnormality in HypoPP patients was found to be a mutation of an amino acid on the  $S_4$  segment of the second and fourth domains of the  $\alpha 1$  subunit, which were changed from arginine to histidine in position 528 and from arginine to histidine or glycine in position 1239, (D2/ $S_4$ , Arg 528  $\rightarrow$  His), (D4/ $S_4$ , Arg 1239  $\rightarrow$  His) and (D4/ $S_4$ , Arg 1239  $\rightarrow$  Gly). The mutation of the calcium channel causing familial hypokalemic periodic paralysis surprised the medical science societies, since the clear mechanism of hypokalemia still cannot be explained by this mutation (Fig 1).

The following study by Bulman, et al found that the mutation of the  $\alpha$ -subunit of sodium channel (*SCN4A*) can also cause HypoPP.<sup>5</sup> The mutation was found on D2/ $S_4$  Arg 669  $\rightarrow$  His and Arg 672  $\rightarrow$  Gly. Both calcium and sodium channel mutations share the same phenotype. Up until now there is no data to explain why the mutation on the sodium channel and calcium channel share the same phenotype and how they can cause hypokalemia and periodic paralysis.

Lastly, Abbott et al, reported on two families with HypoPP that are not related to  $Ca^{2+}$  or  $Na^{+}$  channel mutation.<sup>6</sup> The mutation occurs on the voltage gate  $K^{+}$  channel called *MiRP<sub>2</sub>* (Mink-related peptide-2). The mutation changes the amino acid on position 83 from Arginine to Histidine (R83H).

**TABLE 1.** Summary the clinical features of patients in HypoPP, TPP and dRTA group.

	HypoPP	TPP	dRTA
Numbers	15	11	8
Male : female	13:2	10:1	1:3
Northeastern origin	11 (73%)	3 (27%)	5 (62%)
Positive family history	5 (33%)	1 (9%)	0
Age of first attack (yr)			
11-20	6	1	0
21-40	8	6	5
> 40	1	4	3
Mean age of first attack (yr)	22.4 ± 8.0	31.9 ± 12.4	40.8 ± 11.7
Number of attacks			
1	5 (33%)	3 (27%)	4 (50%)
2-10	6 (40%)	7 (63%)	2 (25%)
> 10	4 (26%)	1 (9%)	2 (25%)
Precipitating causes of first attack			
Exercise/heavy work	8	3	2
High carbohydrate intake	4	3	2
Emotional stress	2	5	0
Alcohol intake	1	0	1
Unknown	0	0	3
Time of first attack			
Day (6 am-6 pm)	3 (20%)	6 (54%)	3 (37.5%)
Night (6 pm-midnight)	3 (20%)	1 (9%)	2 (25%)
During sleep	9 (60%)	4 (36%)	3 (37.5%)
Recovery time after treatment			
< 24 hours	14	9	2
1-3 day	1	2	6
Previous history of hyperthyroidism	0	2 (18%)	0
Exophthalmos	0	2 (18%)	0
Goiter	0	1 (9%)	0
Kidney stone/nephrocalcinosis	0	0	3 (37%)
Serum potassium level at the time of presentation (mmol/L)	2.39 ± 0.46	2.61 ± 0.68	2.36 ± 0.37

HypoPP = hypokalemic periodic paralysis, TPP = thyrotoxic periodic paralysis  
dRTA = distal renal tubular acidosis

The voltage-gate potassium channel controls the passage of K<sup>+</sup> ions. This channel is important in controlling neurons and muscle cells through the changes of action potential. The voltage-gated potassium channel consists of four pore-forming proteins called  $\alpha$  subunits. In order to function properly, it requires the auxiliary peptide subunit called Mink-related peptides (MiRPs). The voltage-gated potassium channel controls the efflux of K<sup>+</sup> at the action potential phase. The abnormal blockage of the efflux of K<sup>+</sup> leads to the abnormal action potential phase and muscle paralysis.<sup>6</sup> Blockage of the K<sup>+</sup> efflux also causes hypokalemia and further weakens the muscle strength. The skeletal muscle  $\alpha$ -subunit protein (pore forming subunit) called Kv 3.4 is the product of the *KCNC4* gene. The auxiliary subunit protein called MiRP2 is derived from the *KCNE3* gene.<sup>6</sup> The mutation on *KCNE3*, which causes the Familial HypoPP in these 2 families was reported by Abbott et al.<sup>6</sup> The same researchers also reported that MiRP2 together with Kv 3.4 forms a potassium channel.<sup>6</sup> Moreover, they also demonstrated that the mutation on MiRP2 can cause the abnormality of potassium current in the cell culture system.<sup>6</sup>

Therefore, there are 3 main genetic abnormalities observed in familial HypoPP.

1. Skeletal muscle voltage gate L-type calcium channel  $\alpha$ 1-subunit gene (*CACNIAS*) or dihydropyridine receptor (DHP receptor) gene mutation on the following positions:  
A. D2/S4 R528H  
B. D2/S4 R1239H/ R1239G

2. Skeletal muscle voltage gate sodium channel gene (*SCN4A*) mutation on:  
D2/S4 R669H & R672H / R672C

3. Skeletal muscle voltage gate potassium channel gene (*KCNE3*) mutation on:  
R83H

The author has studied the genetic description of HypoPP in Thai patients and found that most of HypoPP patients are male and are sporadic cases. Furthermore, the author has screened the reported mutation in familial and sporadic HypoPP in Thai patients and found that there were no common mutations detected in both groups of patients. It is possible that HypoPP in different ethnic backgrounds might have different types of mutations.

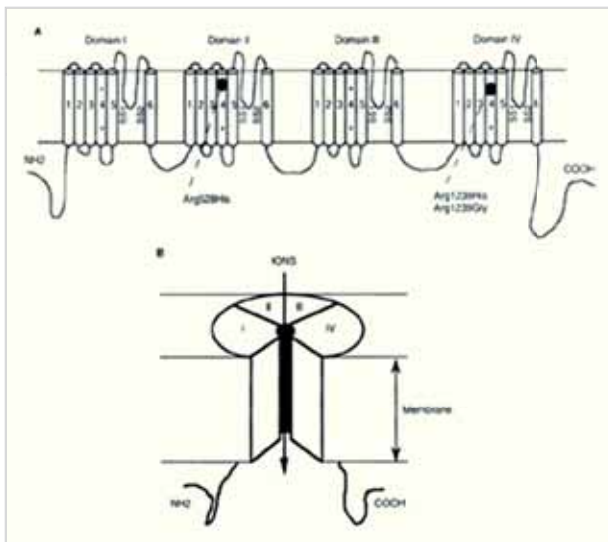
There is another disease that has the same phenotype as HypoPP. Most of the patients do not have a family history of the disease and it is 70 times more frequent in males. This disease is common among Asian countries e.g. China, Korea, Hong Kong and Thailand. The clinical manifestation usually presents with hyperthyroid when the disease attacks. When the hyperthyroid is under controlled, the weakness disappears. The disease is called Thyrotoxic Periodic Paralysis (TPP). The summary of patient characteristic is in Table 1. There were no common mutations of *CACNIAS* gene observed in TPP patients.

In RTA, the difficulties to differentiate this disease from HypoPP and TTP is that it usually co-manifests and shares common characteristics as follows:

1. Some RTA patients present with muscle weakness and hypokalemia. Some proportions of patients have the symptoms on and off.
2. Some RTA patients have familial forms of either AR or AD.
3. The HypoPP in Thailand is sporadic cases and the genetic transmission is unclear.

The author's experience is based on examining 47 patients presented at Ramathibodi Hospital following the criteria of proximal muscle weakness and serum K<sup>+</sup> < 3.0 meq/L during the onset of symptoms. Thirty four patients fall into the criteria and have been followed. Eleven patients had abnormal thyroid function tests, defined as hyperthyroid and were diagnosed as thyrotoxic periodic paralysis (TPP). Eight patients had an acidification defect and were diagnosed as distal RTA and 15 patients were classified as hypokalemic periodic paralysis (Table 1).

In the TPP group, 2 of 11 patients (18%) had a previous history of hyperthyroidism while the rest (82%) never had a thyroid disease before. Seven of eleven patients (63%) had clinically overt hyperthyroidism at presentation while the other four patients (37%) had subtle clinical hyperthyroidism despite biochemical confirmation of thyrotoxicosis. This can lead to the misdiagnosis if the thyroid function test had not been performed.



**Fig 1.** L-type calcium channel  $\alpha 1$ -subunit structure

- (A) Schematic representation of the  $\alpha 1$ -subunit, and localization of the two predominant hypoPP mutations. The  $\alpha 1$ -subunit consists of four homologous repeats (domains I-IV). Each domain contains six spanning  $\alpha$ -helices (S1 - S6). The position of the SS1 and SS2 segments implicated in ion selectivity.
- (B) Schematic representation of the tertiary structure of the  $\alpha 1$ -subunit. Each homologous repeat is located within the membrane surrounding a central transmembrane pore.

In the dRTA group, two patients had spontaneous systemic acidosis. Six patients did not show metabolic acidosis (serum bicarbonate  $< 18$  mmol/L) at presentation, but had abnormal long acid loading tests, which is consistent with incomplete dRTA. Three of 8 dRTA patients presented with nephrocalcinosis. Five out of 8 patients showed neither metabolic acidosis nor stone/nephrocalcinosis despite abnormal urinary acidification. This could be implied that more than half of the dRTA patients who presented with hypokalemia and paralysis might have been misdiagnosed. This finding indicated that an acid loading test should be a part of the investigation for the syndromes of hypokalemia and paralysis.

From the clinical manifestation we can roughly estimate that if the patient is female, the opportunity to be dRTA is high. For male patients, the primary diagnosis will depend on the residential area and age. If the patient came

from northeastern Thailand and is of a young age, HypoPP is more likely. On the other hand, if the male patient did not live in the northeastern area of Thailand and advanced age, the diagnosis is more likely to be TPP.

#### In summary

In Thailand, a syndrome of hypokalemia and severe paralysis may result from HypoPP, TPP, or dRTA. Most HypoPP patients are sporadic and are not associated with any common mutations reported previously. HypoPP in different ethnic backgrounds may have different types of mutations or may result from environmental factors. There are some clinical clues, including age at onset, gender, residence, and associated findings, for the differentiation among HypoPP, TPP and dRTA. However, clinical features alone cannot definitely differentiate one from the others. The absence of any previous history of thyroid disease or clinical thyrotoxicosis does not exclude the diagnosis of TPP. In addition, the absence of stone/nephrocalcinosis or metabolic acidosis does not exclude the diagnosis of dRTA. It is emphasized that awareness of the causes and necessary evaluations are essential for definite diagnosis.

**Bunyong Phakdeekitcharoen, M.D.**

#### REFERENCES

1. Biemond A, Daniels AP. Familial periodic paralysis and its transition into spinal muscular atrophy. *Brain* 1934; 57: 91-5.
2. Fontaine B, Vale-Santos J, Jurkat-Rott K, Reboul J, Plassart E, Rime CS, et al. Mapping of the hypokalaemic periodic paralysis (HypoPP) locus to chromosome 1q31-32 in three European families. *Nat Genet* 1994; 6: 267-72.
3. Phakdeekitcharoen B, Ruangraksa C, Radinahamed P. Hypokalaemia and paralysis in the Thai population. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2013-8.
4. Ptáček LJ, Tawil R, Griggs RC, Engel AG, Layzer RB, Kwieciński H, et al. Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 1994; 77: 863-8.
5. Jurkat-Rott K, McCarthy T, Lehmann-Horn F. Genetics and pathogenesis of malignant hyperthermia. *Muscle Nerve* 2000; 23: 4-17.
6. Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptáček LJ, Goldstein SA. MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 2001; 104: 217-31.
7. Ko GT, Chow CC, Yeung VT, Chan HH, Li JK, Cockram CS. Thyrotoxic periodic paralysis in a Chinese population. *QJM* 1996; 89: 463-8.

The works of the author were supported by The Thailand Research Fund (TRF) and The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).