

# 甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症大鼠额叶乙酰胆碱、munc-18 的影响

蔡瑶俊<sup>1</sup>, 查小雪<sup>1</sup>, 宁丹<sup>1</sup>, 王囡<sup>1</sup>, 贾雪梅<sup>2</sup>, 朱德发<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察甲状腺素联合多奈哌齐对成年期甲状腺功能减退症(简称甲减)大鼠额叶内乙酰胆碱含量以及 munc-18 表达的影响,探讨甲减脑额叶损伤及恢复的可能分子机制。方法 采用给予含 0.05% 丙基硫氧嘧啶的饮用水 6 周建立大鼠甲减模型。自第 5 周起,给予多奈哌齐、甲状腺素或甲状腺素联合多奈哌齐治疗 2 周,采用放射免疫法检测血清甲状腺激素水平,碱性羟胺比色法测定额叶内乙酰胆碱含量,免疫组化法检测额叶内 munc-18 的分布与表达。结果 甲减组、多奈哌齐治疗组大鼠血清三碘甲状腺原氨酸(T<sub>3</sub>)、四碘甲状腺原氨酸(T<sub>4</sub>)水平显著减低、促甲状腺激素(TSH)水平明显增加( $P < 0.01$ ),甲状腺素治疗组、联合治疗组 T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、TSH 水平与正常对照组相比差异无统计学意义;甲减组大鼠额叶内乙酰胆碱含量下降( $P < 0.05$ ),多奈哌齐治疗组、甲状腺素治疗组、联合治疗组乙酰胆碱含量均恢复至正常水平,其中联合治疗组有进一步恢复趋势;甲减组、多奈哌齐治疗组大鼠 munc-18 在额叶内 II、III、IV、V 层表达下降( $P < 0.05$ )。其中,以 III/V 层下降最为显著( $P < 0.01$ ),甲状腺素治疗组 munc-18 表达仍下降( $P < 0.05$ ),联合治疗组额叶内 munc-18 表达正常。结论 多奈哌齐可以改善甲状腺功能减退引起的额叶内乙酰胆碱含量改变;甲状腺素联合多奈哌齐治疗有利于成年期甲状腺功能减退造成的额叶内胆碱含量改变和突触蛋白损伤的恢复。

**关键词** 甲状腺功能减退症;额叶;乙酰胆碱;munc-18;左旋甲状腺素;多奈哌齐

中图分类号 R 581.2; R 322.81; R 446.6-3; R 977.14

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0025-05

成年期甲状腺功能减退症(简称甲减)可引起脑部额叶损害,额叶皮质是对学习记忆很重要的脑部结构<sup>[1-2]</sup>。研究<sup>[3-4]</sup>表明甲减可以损伤额叶内突触相关蛋白的表达及胆碱能系统。脑内乙酰胆碱是中枢神经系统最重要的神经递质之一,在其释放过程中有多种突触相关蛋白的参与。munc-18 是一种

突触前膜内蛋白,参与乙酰胆碱的释放<sup>[5]</sup>,在突触囊泡“胞外排”方式分泌神经递质过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。研究<sup>[3]</sup>表明甲减大鼠生理剂量的甲状腺素替代治疗后,脑内突触相关蛋白的损伤未完全恢复。多奈哌齐作为一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,在改善认知功能以及神经保护方面起重要作用<sup>[7]</sup>。该研究旨在观察成年期甲减大鼠额叶内乙酰胆碱含量、munc-18 表达变化以及探讨甲状腺素联合多奈哌齐治疗的恢复效果。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 40 只健康成年雄性 SD 大鼠,普通级,体重 260 ~ 300 g,购自南京实验动物中心。常规条件下饲养,自然采光,自由接受标准锯齿类动物食物以及饮水。实验遵循《安徽医科大学实验用动物管理和使用指南》。

## 1.2 主要仪器及试剂

**1.2.1 仪器** DXM1200F 光学显微镜(日本 Nikon 公司);DFM296 型 16 管放射免疫计数器(合肥众成机电技术开发有限公司);JEDR 801D 形态学图像分析系统(江苏捷达科技发展有限公司);酶标仪(美国 Biote 仪器有限公司)。

**1.2.2 试剂** 丙基硫氧嘧啶(propylthiouracil, PTU)、左旋甲状腺素(levothyrocine, L-T<sub>4</sub>)、多奈哌齐(美国 Sigma 公司);三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T<sub>3</sub>)、四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T<sub>4</sub>)、促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司);DAB 染色试剂盒、SP-0022 生物素标记羊抗兔 IgG SP 超敏试剂盒(北京博奥森公司);抗 munc-18 蛋白多克隆抗体(美国 BD 公司)。

**1.3 动物模型建立** 大鼠适应性喂养 1 周,随后将其随机均分为 5 组:正常对照组、甲减组、多奈哌齐治疗组、甲状腺素治疗组、联合治疗组。正常对照组自由饮水,余下 4 组给予含 0.05% PTU 饮用水 6 周制备甲减模型。第 5 周起,多奈哌齐治疗组每日在

2014-09-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272152)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院老年内分泌科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学基础医学院综合实验室,合肥 230032

作者简介:蔡瑶俊,男,硕士研究生;

朱德发,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: zdfa0168@sina.com

饮用水中加 0.005% 多奈哌齐,甲状腺素治疗组每日腹腔注射给予 L-T4 6 μg/100 g 体重,联合治疗组每日予饮用水中加入 0.005% 多奈哌齐以及腹腔注射 L-T4 6 μg/100 g 体重。同时,正常对照组、甲减组、多奈哌齐治疗组每日腹腔注射给予等量的无菌生理盐水。各组大鼠每周称重 1 次,根据体重调整给药剂量,治疗时间 2 周。

**1.4 标本制备** 腹主动脉采血待测 T3、T4、TSH。取血后将大鼠断头处死,于冰台迅速取分离大脑额叶部位组织,左侧额叶放置于 -80 °C 冰箱储存待测乙酰胆碱含量,右侧额叶浸泡于 4% 的多聚甲醛溶液中固定待做免疫组化。

**1.5 甲状腺激素水平测定** 血清 T3、T4、TSH 采用放射免疫法测定,严格按照放射免疫试剂盒说明书操作。

**1.6 乙酰胆碱含量测定** 采用碱性羟胺比色法测定额叶内乙酰胆碱含量,根据 BCA 试剂盒操作步骤进行测定。

**1.7 免疫组化染色** 超敏 SP 法行免疫组化法检测。应用光学显微镜分别拍摄额叶各层:分子层(I层)、外颗粒层(II层)、外锥体细胞层(III层)、内颗粒层(IV层)、内锥体细胞层(V层),随后应用形态学图像分析系统分析 I、II、III、IV、V 层 munc-18 的免疫反应产物的光密度值,取其平均光密度值(average optical density AOD)。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步分析采用 LSD 法进行多重比较。

**2 结果**

**2.1 各组大鼠血清甲状腺激素水平** 与正常对照组相比,甲减组、多奈哌齐治疗组的大鼠血清 T3、T4 水平均显著减低、TSH 水平明显增加,差异有统计学意义( $F = 5.14, 33.84, 24.40, P < 0.01$ );甲状腺素治疗组、联合治疗组血清 T3、T4、TSH 与正常对照组比较差异无统计学意义,见表 1。

表 1 各组大鼠血清 T3、T4、TSH 水平( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	T3( nmol/L)	T4( nmol/L)	TSH( μmol/L)
正常对照	0.83 ± 0.10	50.10 ± 4.01	0.96 ± 0.25
甲减	0.61 ± 0.06**	18.20 ± 4.89**	21.27 ± 9.90**
多奈哌齐治疗	0.58 ± 0.05**	19.10 ± 3.12**	21.02 ± 11.10**
甲状腺素治疗	0.80 ± 0.25	51.28 ± 5.16	1.33 ± 0.98
联合治疗	0.82 ± 0.22	54.53 ± 6.05	1.02 ± 0.37

与正常对照组比较: \*\* $P < 0.01$

**2.2 各组大鼠额叶中乙酰胆碱含量** 与正常对照组相比,甲减组大鼠额叶内乙酰胆碱含量明显降低( $F = 2.71, P < 0.05$ ),而多奈哌齐治疗组、甲状腺素治疗组、联合治疗组大鼠额叶内乙酰胆碱含量与正常对照组相比,差异无统计学意义;与甲减组额叶内乙酰胆碱含量相比,甲状腺素治疗组差异无统计学意义,而联合治疗组有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠额叶内乙酰胆碱含量(μg/mg  $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	乙酰胆碱
正常对照	23.43 ± 5.81
甲减	17.58 ± 2.70*
多奈哌齐治疗	20.61 ± 3.24
甲状腺素治疗	20.00 ± 4.24
联合治疗	23.37 ± 4.49#

与正常对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与甲减组比较: # $P < 0.05$

**2.3 大鼠额叶各层 munc-18 表达变化** 肉眼观察大鼠脑切片,额叶结构清晰,呈棕黄色。光镜下观察正常对照组:munc-18 在额叶各层内广泛表达;I 层水平纤维较多,细胞结构少;II 层主要见颗粒状排列致密的神经细胞;III 层可见排列松散大小不等的棕黄色锥体细胞,其中有少量的星形细胞;IV 层可见少量小锥体细胞和大量排列密集的棕黄色星形细胞;V 层由大量的棕黄色大锥体细胞和少量的小星形细胞组成。各组额叶内 munc-18 免疫反应的阳性颗粒分布相似,甲减组和多奈哌齐治疗组额叶内锥体细胞的长度增加,树突棘的密度下降,以 III/V 层明显;甲状腺素治疗组和联合治疗组锥体细胞恢形态正常,见图 1。形态学图像分析系统量化各组大鼠额叶 I、II、III、IV、V 层内 munc-18 免疫反应产物的 AOD 值:甲减组、多奈哌齐治疗组大鼠额叶 II、III、IV、V 层的 AOD 值与正常对照组相比均明显降低( $F = 3.08, 10.45, 4.28, 7.33, P < 0.05$ ),以 III/V 层显著( $P < 0.01$ );甲状腺素治疗组的 munc-18 免疫反应产物的 AOD 值仍然偏低( $P < 0.05$ ),联合治疗组的 AOD 值恢复至正常对照组水平。见图 1、表 3。

**3 讨论**

本研究显示成年期甲减组大鼠额叶内乙酰胆碱含量减少,给予多奈哌齐、甲状腺素或联合治疗后,乙酰胆碱含量均恢复正常,其中甲状腺素联合多奈哌齐治疗有进一步恢复趋势。甲减可以损害额叶中与学习记忆功能密切相关胆碱能系统,本研究也证

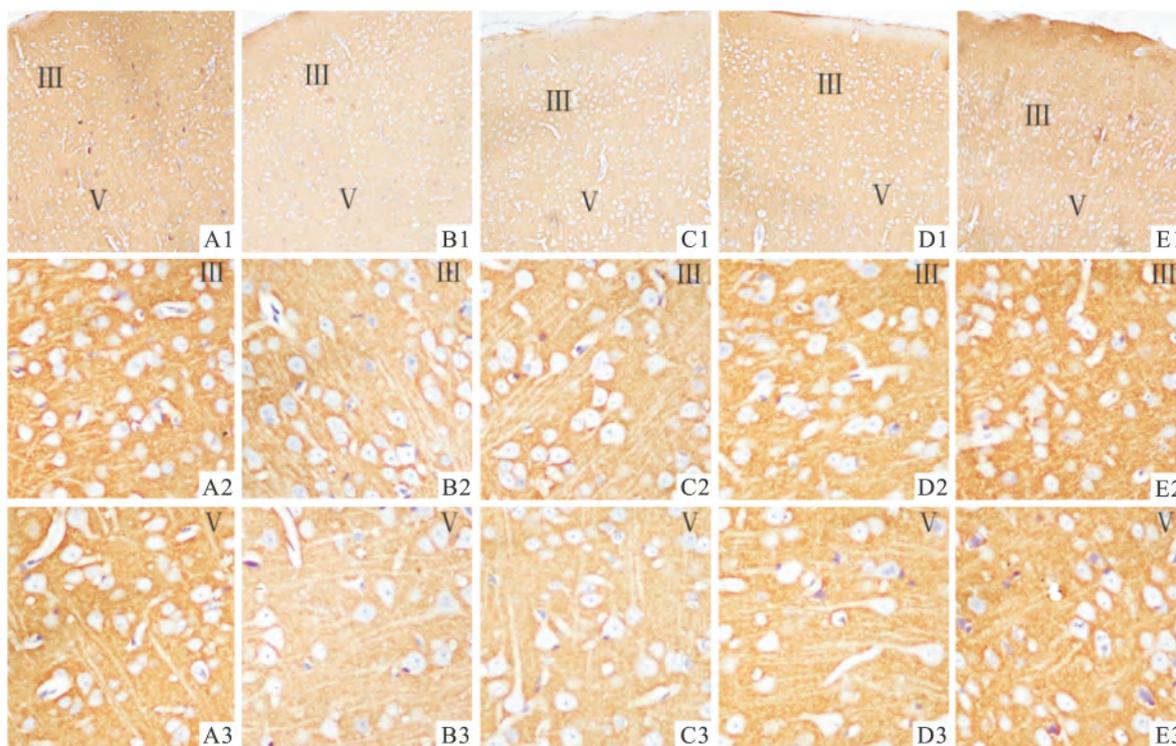


图1 munc-18 免疫反应产物在额叶Ⅲ、V层的表达

A: 正常对照组; B: 甲减组; C: 多奈哌齐治疗组; D: 甲状腺素治疗组; E: 联合治疗组; 1: SP × 100; 2: SP × 400; 3: SP × 400

表3 各组大鼠额叶内 munc-18 表达情况 (n = 8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	I层	II层	III层	IV层	V层
正常对照	17.49 ± 2.42	17.12 ± 2.11	12.93 ± 2.65	9.50 ± 3.62	12.12 ± 3.35
甲减	15.58 ± 3.84	12.67 ± 3.77**	7.16 ± 4.14**	5.13 ± 2.28*	5.38 ± 3.54**
多奈哌齐治疗	15.21 ± 4.08	13.87 ± 3.92*	8.10 ± 1.07**	5.77 ± 1.94*	5.27 ± 2.03**
甲状腺素治疗	17.48 ± 1.94	14.55 ± 2.18	10.04 ± 1.56*	8.80 ± 3.86	8.01 ± 2.99*
联合治疗	18.93 ± 1.94	16.98 ± 3.31	13.75 ± 2.06	10.53 ± 3.59	10.83 ± 3.99

与正常对照组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

实了这点,其原因可能与甲减影响胆碱能神经元的数量和形态有关<sup>[8]</sup>,也可能通过损害 syntaxin-1、SNAP-25 等突触相关蛋白的表达影响神经递质的释放<sup>[3]</sup>。另外,有研究<sup>[5]</sup>证实鼠类大脑中 munc-18 参与乙酰胆碱的释放,甲减大鼠乙酰胆碱含量减少可能与 munc-18 表达下降有关。给予多奈哌齐治疗 2 周后,额叶内乙酰胆碱含量恢复,这与文献<sup>[9]</sup>报道相符。多奈哌齐联合甲状腺素治疗后,与单独多奈哌齐治疗或甲状腺素治疗相比,额叶内乙酰胆碱含量有进一步恢复趋势。以上结果提示应用多奈哌齐可改善甲减大鼠额叶内乙酰胆碱的含量异常,特别是在甲状腺素替代治疗的基础上。

免疫组化结果显示成年期甲减大鼠额叶 munc-18 表达减少,其中以 III/V 层最为显著。Carageorgiou et al<sup>[10]</sup> 研究显示甲状腺素可以调节脑内蛋白

质的合成。munc-18 是神经元胞内蛋白,其表达减少可能与血清甲状腺激素水平低下有关。其中,额叶各层的损伤程度表现不一致,III/V 层内甲状腺激素缺乏对 munc-18 表达的影响最为明显,可能与这两层内绝大部分区域为锥体细胞有关。有文献<sup>[11-12]</sup>报道甲减损伤海马和额叶内的锥体细胞明显,其所在区域是比较容易损伤、改变的区域。

甲状腺素替代治疗是临床治疗甲减的标准疗法。本研究显示甲减大鼠生理剂量的甲状腺素治疗 2 周后,额叶内 munc-18 的表达没有恢复到正常水平。额叶内 munc-18 表达未完全恢复或许与治疗时间有关。Alzoubi et al<sup>[13]</sup> 发现生理剂量的甲状腺素治疗 6 周可以逆转海马内的神经颗粒素、钙调蛋白等突触蛋白表达异常,替代治疗时间较短可能是 munc-18 表达不完全恢复的一个重要因素;额叶内

munc-18 表达未完全恢复也可能与替代治疗剂量不足有关。既往有文献<sup>[14]</sup>指出:血清中甲状腺激素浓度远远高于其在中枢神经系统中的浓度,激素替代治疗后,血清甲状腺激素水平可以恢复至一个比较宽的正常范围,这时中枢神经系统中的激素水平可能尚未达到正常。

先前一项尝试给予大剂量甲状腺素治疗至亚甲亢水平的研究<sup>[12]</sup>,发现甲减大鼠 2 周激素替代治疗后海马内 munc-18 表达恢复正常。大剂量甲状腺素治疗有诱导甲亢的风险,本研究在常规甲状腺素治疗基础上加用多奈哌齐,发现甲状腺激素水平正常后额叶 munc-18 表达也恢复正常。多奈哌齐作为一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,近年来动物实验研究<sup>[7]</sup>表明其有神经保护的作用,联合治疗组中大鼠额叶 munc-18 恢复正常可能是多奈哌齐神经保护作用的体现。

综上所述,甲减可引起额叶内乙酰胆碱含量改变和 munc-18 异常表达,单独甲状腺素替代治疗至甲状腺激素水平正常时,上述损害未完全恢复,甲状腺素联合多奈哌齐恢复,提示甲状腺素与多奈哌齐联合治疗可能有利于甲减脑额叶损害恢复。

### 参考文献

- [1] He X S, Ma N, Pan Z L, et al. Functional magnetic resource imaging assessment of altered brain function in hypothyroidism during working memory processing [J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164 (6): 951 - 9.
- [2] Sui L, Wang F, Li B M. Adult-onset hypothyroidism impairs paired-pulse facilitation and long-term potentiation of the rat dorsal hippocampo-medial prefrontal cortex pathway *in vivo* [J]. *Brain Res*, 2006, 1096 (1): 53 - 60.
- [3] Yang H Y, Sun C P, Jia X M, et al. Effect of thyroxine on SNARE complex and synaptotagmin-1 expression in the prefrontal cortex of rats with adult-onset hypothyroidism [J]. *J Endocrinol In-*

- vest, 2012, 35(3): 312 - 6.
- [4] 刘俊霞,朱德发,王 芬,等. 甲状腺激素对大鼠额叶乙酰胆碱的影响 [J]. *中国临床保健杂志*, 2012, 14(6): 608 - 10.
- [5] Gengyo-Ando K, Kitayama H, Mukaida M, et al. A murine neural-specific homolog corrects cholinergic defects in caenorhabditis elegans unc-18 mutants [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(21): 6695 - 702.
- [6] Okamoto M, Südhof T C. Mints, Munc18-interacting proteins in synaptic vesicle exocytosis [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(50): 31459 - 64.
- [7] Yoshiyama Y, Kojima A, Ishikawa C, et al. Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 22(1): 295 - 306.
- [8] Gould E, Butcher L L. Developing cholinergic basal forebrain neurons are sensitive to thyroid hormone [J]. *J Neurosci*, 1989, 9 (9): 3347 - 58.
- [9] Akasofu S, Kimura M, Kosasa T, et al. Study of neuroprotection of donepezil, a therapy for Alzheimer's disease [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 175(1-3): 222 - 6.
- [10] Carageorgiou H, Pantos C, Zarros A, et al. Changes in antioxidant status, protein concentration, acetylcholinesterase, ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-, and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in the brain of hyper- and hypothyroid adult rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2005, 20(2): 129 - 39.
- [11] Elston G N. Pyramidal cells of the frontal lobe: all the more spinous to think with [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(18): RC95.
- [12] 叶启宝,朱德发,贾雪梅,等. 成年期甲减大鼠海马 Munc18 表达及甲状腺素的治疗效应 [J]. *安徽医科大学学报*, 2009, 44(4): 423 - 6.
- [13] Alzoubi K H, Gerges N Z, Alkadhhi K A. Levothyroxin restores hypothyroidism-induced impairment of LTP of hippocampal CA1: electrophysiological and molecular studies [J]. *Exp Neurol*, 2005, 195(2): 330 - 41.
- [14] Van Doorn J, Roelfsema F, Van der Heide D. Concentrations of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine at 34 different sites in euthyroid rats as determined by an isotopic equilibrium technique [J]. *Endocrinology*, 1985, 117(3): 1201 - 8.

## Effect of thyroxine and donepezil on acetylcholine content and munc-18 expression in the frontal cortex of rats with adult-onset hypothyroidism

Cai Yaojun Zha Xiaoxue Ning Dan et al

(Dept of Geriatrics Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the thyroxine and donepezil on acetylcholine concentration and munc-18 expression in the frontal lobe of adult-onset hypothyroid rats and clarify the possible molecular mechanism of frontal lobe lesions of hypothyroidism. **Methods** The models of hypothyroidism were established by induction with adding propylthiouracil drinking water for 6 weeks, and since the fifth week, the hypothyroid rats received a two-week treatment of levothyrocine (L-T4), donepezil or a combination of both drugs. The levels of serum triiodothyronine (T3),

# 老龄帕金森病模型小鼠氧化应激相关基因的表达差异

马晓伟 张忠霞 王彦永 李晓丽 王铭维

**摘要** 目的 探讨老龄帕金森病(PD)模型小鼠行为学改变及黑质纹状体系统氧化应激相关基因的表达差异。方法 10月龄快速老化P8系(SAMP8)小鼠16只,随机均分为对照组和模型组。模型组小鼠背部皮下注射1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制成急性损伤模型,对照组小鼠给予同量生理盐水。给药后72h进行行为学测试,高效液相色谱法检测黑质多巴胺(DA)含量,PCR Array检测其纹状体氧化应激相关基因的表达。结果 与对照组相比,模型组小鼠DA水平下降,行为学成绩下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );环氧化酶-2、可诱导型一氧化氮合酶2、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶基因表达上调;而谷胱甘肽过氧化物酶3、6、8等9种基因明显下调(改变倍数 $> 2$ )。结论 老龄PD模型小鼠氧化应激相关的基因发生上调或下调,导致氧化应激反应的发生。

**关键词** 老龄;帕金森病;氧化应激;SAMP8;MPTP

中图分类号 R 742.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)01-0029-04

老化是导致帕金森病(parkinson disease, PD)的主要危险因子之一。随着社会的老龄化,PD的发

病率也逐年增长。快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse, SAM)是应用于老化相关性疾病研究的常用模型<sup>[1]</sup>,尤其是其中的P8系小鼠(senescence-accelerated mouse prone 8, SAMP8),寿命短(10~17个月),老化早发(4~6个月即开始出现衰老特征),更加有助于PD病理机制的研究<sup>[2]</sup>。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine, MPTP)可以导致黑质纹状体系统多巴胺能神经元的退行性变<sup>[3]</sup>,诱发PD几乎所有的症状,包括运动不能、肌僵直、震颤、步调与姿势异常等<sup>[4]</sup>,并且这些行为缺陷可以通过治疗PD的经典方法多巴胺(dopamine, DA)的替代治疗缓解<sup>[5]</sup>。这些优点使MPTP成为制作PD模型的经典毒素。该研究在应用MPTP的基础上,选用老龄SAMP8代替传统的C57BL/6小鼠制备PD模型,同时兼具环境毒素与老化的影响,与临床PD的发病及病理情况更接近。通过PCR Array检测模型组与对照组小鼠氧化应激相关基因的差异表达,为寻找PD的诊断指标与临床治疗靶点提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SAMP8小鼠,雌性,10月龄,共16只,26~30g,清洁级,由香港中文大学解剖学系惠赠。

**1.2 主要试剂与仪器** MPTP(美国Sigma公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);RNeasy Mini Kit; RT2 First Strand Kit; RT2 SYBR Green Master Mix

2014-09-24 接收

基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划(编号:20110302、20130272)

作者单位:河北医科大学第一医院神经内科,河北省脑老化与认知神经科学实验室,石家庄 050031

作者简介:马晓伟,女,硕士,副主任医师;

王铭维,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wmw@hebmu.edu.cn

tetraiodothyronine(T4), thyroid-stimulating hormone(TSH) were measured by radioimmunoassay kits, acetylcholine concentration in frontal lobe was determined by alkaline hydroxylamine colorimetry and the expression and distribution of munc-18 in frontal cortex were evaluated by immunohistochemistry. **Results** In the hypothyroid rats, the levels of serum T3 and T4 decreased with the increase of TSH( $P < 0.01$ ), the content of acetylcholine in frontal lobe was significantly decreased( $P < 0.05$ ), and the expression of munc-18 was at significantly lower levels in the II, III, IV, V layers of frontal cortex( $P < 0.05$ ). In addition, donepezil treatment reversed the content of acetylcholine to normal values. L-T4 monotherapy normalized the level of serum thyroid hormone and acetylcholine content while the expression of munc-18 was not. Munc-18 was normalized completely by co-administration of L-T4 and donepezil. **Conclusion** The alteration of acetylcholine content and expression of munc-18 in the frontal lobe of a dult-onset hypothyroidism can be better ameliorated by co-administration of L-T4 and donepezil.

**Key words** hypothyroidism; frontal cortex; acetylcholine; munc-18; levothyrocine; donepezil