

第十三屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA13-027

作品名稱：魚類藥物餵食載體之機制

——以餵食斑馬魚為例

姓名：陳琦

關鍵字：斑馬魚、海藻酸、口服

魚類藥物餵食載體之機制—以餵食斑馬魚為例

摘要

傳統上在進行魚類生物的投藥主要有直接浸泡於化學試劑中及腹膜注射法。前者給藥方式缺點主要是面臨不確定之吸收率及藥物定量上的困難，而後者則是造成魚體的傷害與操作上的不便。

儘管已有越來越多研究發展出不同的口服藥物傳遞系統，但只有少數報告指出利用海藻酸鹽此一具有良好生物相容性之聚合物來作為藥物餵食載體之機制。

本研究目的是希望發展一種新型魚類藥物餵食載體之機制，以提供未來各式魚類疾病模式中加速中藥篩選過程。本研究以斑馬魚為實驗對象，探討在不同海藻酸鈉濃度、氯化鈣濃度、不同飼料和中藥量等因素影響下，如何以蠕動泵法來尋找製備中藥海藻酸微粒的最佳形成條件和斑馬魚的適口性。

研究初步結果證實中藥海藻酸微粒穩定，能適合做為魚類藥物餵食載體之工具，且可以吸引斑馬魚主動前來覓食。相關方法目前進行相關專利申請中。

研究動機

近年來，對於某些疾病仍無具體的醫療相關對策(如癌症、愛滋病、B 型肝炎等) 加上現代醫療對於疾病的治療具有一定程度的副作用，促使民眾普遍願意嘗試找尋其他的替代療法，並使用中醫藥保健食品來預防疾病。然而對民眾而言，強調中醫藥的安全與功效性的驗證，卻也是使用中醫藥重要的考慮因素⁽¹⁾。因此如何找出中醫藥治療各式疾病的科學證據及治療機轉更有需要許多研究來探討。在一次學校辦的中醫科學演講活動中，我有幸進一步請教中醫師，得知中藥是一種多成份的複雜體系組成，它而難以在細胞模式中以觀察培養的方式進行中藥療效篩選，同時實驗動物(如小鼠、大鼠、豬等)的飼養週期長、疾病動物模式的建立時間又長、成本高，種種成因皆造成難以進行大規模的中藥篩選模式。

本研究由相關文獻中發現，斑馬魚 (zebrafish) 又名藍條魚、花條魚、斑馬擔尼魚 (Brachydanio rerio)，原產於印度和孟加拉。在遺傳基因上與人類相似度高達 87%，加上性成熟期短，可利用機械性或化學方法來產生變種以提供研究，因此近年來在全世界廣泛用於研究脊椎動物的胚胎發育、疾病研究、藥物篩選及毒物測試⁽²⁾。在過去 20 年間，由於斑馬魚具有光週期誘發產卵，體外受精，一次排出的卵數甚多。胚胎發育時間相當快速，受精卵於 72 小時後脫卵而出即發育成為幼魚，而且卵及胚胎透明，在光學顯微鏡下容易觀察發育過程，故可做連續性的觀察不需犧牲。此外，斑馬魚胚胎發育上的機制與調控蛋白表現與哺乳類動物非常相似，近來已成為研究脊椎動物胚胎發育的重要模式動物⁽³⁾。

由於斑馬魚的許多優點與和脊椎動物的相似性，它被廣泛應用做為心血管疾病、神經系統疾病、造血系統疾病、眼科疾病、腎病、骨骼相關疾病的模式生物⁽⁴⁾。而且斑馬魚腫瘤在基因學、組織病理和遺傳性方面與人類腫瘤具有高度的相似性，許多實驗室偏好將它們用誘發方式、轉植基因方式、移植方式和血管生成

方式以建構斑馬魚成為腫瘤研究的模式動物⁽⁵⁾。例如:在 2012 年底，中研院吳金洌教授研究團隊更發展出 B 型和 C 型肝炎病毒蛋白誘發肝癌之斑馬魚模式⁽⁶⁾。

雖然斑馬魚做為疾病篩選的模式動物有獨特的優勢，但是斑馬魚的給藥方式與人的給藥方式不同。現行斑馬魚給藥方式有直接浸泡法和腹腔注射法兩種。直接浸泡法主要缺點是藥物吸收率不確定、不易定量並且不適用於不溶於水的藥劑，而腹腔注射法則對魚體容易造成傷害且操作不便，而且藥劑使用量上有一定限制⁽⁴⁾。也因為如此，許多研究都已經發展出不同的口服藥物傳遞系統，例如幾丁聚糖(chitosan)、聚酯纖維(polyester)、麵筋(gluten)和海藻酸鹽(alginate)^(7,8,9)，以改善直接浸泡法和腹腔注射法的缺點。

其中海藻酸鹽是由海藻中提煉的天然多醣類高分子化合物，海藻酸鹽是無水甘露糖醛酸的聚合物，其具有良好的生物相容性。在二價陽離子(大多數為鈣離子)存在下，可以交聯形成網狀開放晶格的水凝膠。而此水凝膠具有良好親水性，能使包埋在凝膠中的物質(如 insulin)可以有效經由口服路徑而進入大鼠體內作用。但是只有少數報告指出可能可以利用海藻酸鹽包覆中藥來做為藥物口服傳遞系統⁽¹⁰⁾。因此本次研究希望發展出一種新型斑馬魚中藥口部投藥系統平台，以加速中藥在斑馬魚疾病動物模式中之篩選時程。

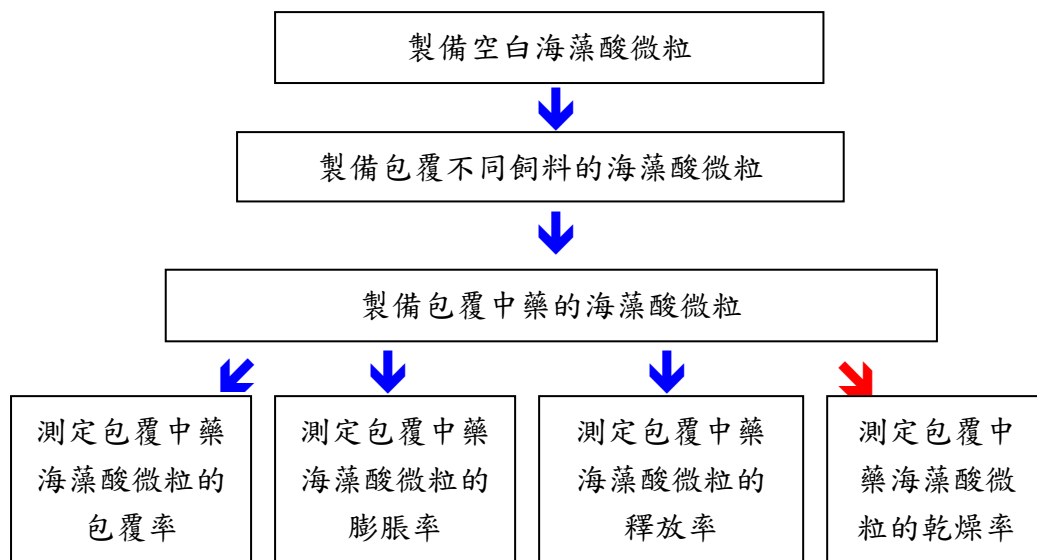
研究目的

一、研究目的：

(一). 以斑馬魚為受測對象，找尋製備包服中藥的海藻酸微粒的最佳條件。

(二). 進行測試包覆中藥海藻酸微粒的包覆率、膨脹率、釋放率和斑馬魚適口性實驗，如下研究架構流程圖，藍色箭頭是原先規劃的實驗方向，之後考量海藻酸微粒的乾燥時間的問題，因此增加了乾燥率分析如下圖紅色箭頭標示位置。

二、研究架構：



圖一：研究架構流程圖

研究方法

一、斑馬魚養殖

斑馬魚(Danio rerio, AB)成魚飼養於循環過濾系統缸，每天光照 14 小時、水溫控制在 26~29°C。每天早、晚餵食兩次，餵食飼料(福壽牌)及豐年蝦（美國紅牌），每次餵食的量約為 5 分鐘內可食完。



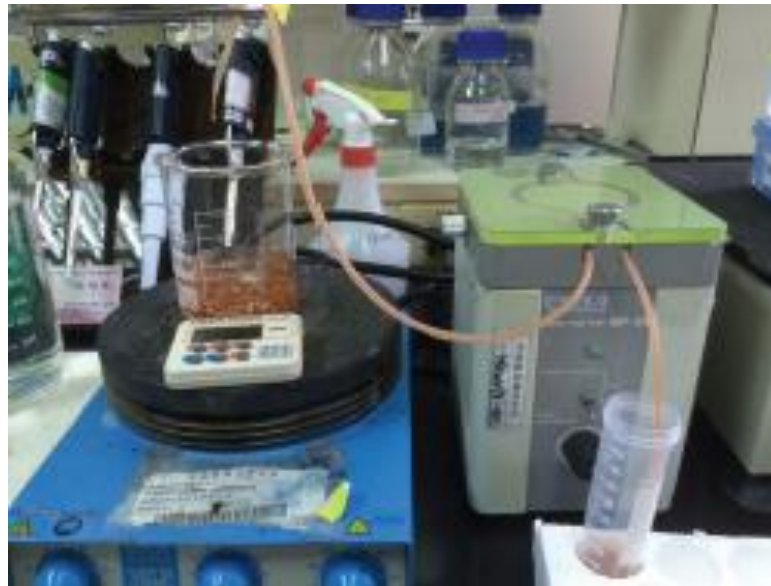
圖二：斑馬魚飼養箱及循環過濾系統缸與飼料圖

二、中藥與試劑 (Traditional Chinese medicine and reagents)

我們選用的中藥是川芎 (Chuanxiong Rhizoma)，中藥的來源是委託 GMP 港香蘭藥廠股份有限公司製備並鑑定。海藻酸鈉 (sodium alginate)、氯化鈣 (calcium chloride; CaCl_2)、磷酸鹽 (sodium phosphate) 和阿魏酸 (Ferulic acid) 購自於 Sigma 公司。Acetonitrile 和甲醇 (methanol) 則購自於 Merck 公司。T 熱帶魚顆粒飼料 (T-tropical fish feed pellets) 產地為德國。豐年全蝦 (brine shrimp) 和豐年蝦卵 (brine shrimp eggs) 產地為 Sanders®。

三、製備空白海藻酸微粒 (blank alginate-coated micropellets)

將 3% 海藻酸鈉溶液分別配置成 2 ml 不同濃度的海藻酸溶液 (0.5%、1%、1.5% 及 2%)，利用蠕動泵將配置好的海藻酸鈉溶液分別滴入 50 ml 不同濃度的氯化鈣溶液中 (0.5%、2.5%、5%、10% 和 20%)，滴完後將空白海藻酸微粒在溶液中靜置 2 hr。取出空白海藻酸微粒後，先在吸水紙上去除多餘溶液後秤重。再任意取 10 顆空白海藻酸微粒為一組，用電子游標尺 (Mitutoyo) 測量大小，總共測量 6 組。之後將空白海藻酸微粒放置於 40°C 烘箱中乾燥，分別在乾燥 24 小時和 48 小時後測量大小。以了解何種條件下，可以製備圓整、光滑和成型性最好的乾燥空白海藻酸微粒。



圖三：海藻酸微粒製備實驗圖

四、製備包覆不同飼料的海藻酸微粒 (coated with different feeds of alginate micropellets)

製備 1.5% 的海藻酸鈉溶液，放置充分使其溶解膨脹約 24 小時備用。取不同重量的飼料 (顆粒 0.5 克、豐年蝦卵 0.5 克或豐年全蝦 1 克) 加入 5 ml 的海藻酸鈉溶液，利用蠕動泵將配置好的海藻酸鈉溶液分別滴入 100 ml 1.5% 或 2.5% 濃度的氯化鈣溶液中。包覆不同飼料的海藻酸微粒立即形成。取出製備成型的微粒後，先在吸水紙上去除多餘溶液。再任意取 10 顆微粒為一組，用

電子游標尺測量大小，共測量 6 組。之後將包覆不同飼料的海藻酸微粒放置於 40°C 烘箱中乾燥，分別在乾燥 24 小時和 48 小時後測量大小。



圖四：不同飼料成份的海藻酸微粒

五、製備包覆中藥的海藻酸微粒

首先製備 1% 的海藻酸鈉溶液，放置充分使其溶解膨脹約 24 小時備用。取 1g 顆粒飼料加入 0.5 克或 1 克的中藥(川芎)，加入 15 ml 的海藻酸鈉溶液，利用蠕動泵將配置好的海藻酸鈉溶液，滴入 100 ml 20% 氯化鈣溶液中，包覆中藥海藻酸微粒立即形成。取出包覆中藥的海藻酸微粒後，先在吸水紙上去除多餘溶液。再任意取 10 顆微粒為一組，用電子游標尺測量大小，共測量 6 組。之後將包覆中藥海藻酸微粒放置於 40°C 烘箱中乾燥，在乾燥 24 小時後測量其大小。

六、斑馬魚投藥適口性試驗

將包覆不同飼料的海藻酸微粒或包覆中藥的海藻酸微粒給予斑馬魚，以觀察其適口性。實驗前一天將斑馬魚置於小型魚缸中(每缸 5 隻斑馬魚)，當天早上

9 點和下午 5 點分別餵食斑馬魚不同包覆飼料的海藻酸微粒或包覆中藥的海藻酸微粒，每缸投予 10 顆包覆不同飼料的海藻酸微粒或包覆中藥的海藻酸微粒，並在當天中午 12 點和下午 4 點觀察斑馬魚進食狀況，連續觀察 24 小時或 4 天並錄影記錄。

七、高效能液相層析儀分析(HPLC analysis)

製備中藥的標準品濃度為 100 ug/ml (阿魏酸(Ferulic acid))，以 50 % 甲醇 (methanol) 稀釋為不同質量濃度以製作標準曲線。將待測物溶於 100 % 甲醇，每次注射 50 ul，在流動相為 acetonitrile/ 1% acetic acid (1~18 min. 19:81, v/v; 18~60 min. 60:40, v/v)，體積流量為 1ml/min 的條件下，於 320 nm 為偵測波長以進行分析。

八、測定包覆中藥海藻酸微粒的藥物濃度

將 30 顆包覆中藥海藻酸微粒加入 pH 值 7.5 的磷酸鹽緩衝溶液 (1.5 ml 0.1M) 後，靜置過夜後，以均質機研磨 2 次 (5000 rpm, 30 秒 2 次，中間暫停 10 秒)，以 12000 rpm 離心 5 分鐘後取出 200 ul 上清液加入 200 ul 甲醇混合後再以 12000 rpm 離心 5 分鐘，取出通過 0.45 um 過濾膜的上清液，以高效能液相層析儀 (HPLC) 測定釋放出的中藥濃度，如此可以得知中藥的包覆率。

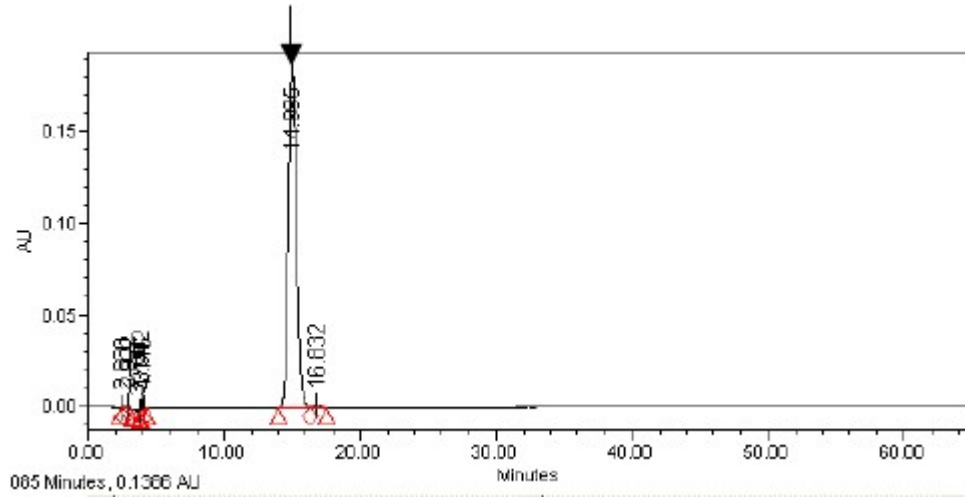
九、測定包覆中藥海藻酸微粒的膨脹率與釋放率

取出包覆中藥海藻酸微粒 10 顆置於 1 ml 人工腸液 (37°C, pH 值 6.8 磷酸鹽緩衝溶液) 或水中，分別於 0、3、6、9、12、24 小時後取出包覆中藥海藻酸微粒用電子游標尺測量大小(代表包覆中藥海藻酸微粒的膨脹率)，收集溶液並通過 0.45 um 過濾膜，之後以高效能液相層析儀 (HPLC) 測定釋放出的中藥濃度，如此可以得知包覆中藥海藻酸微粒的中藥釋放率。

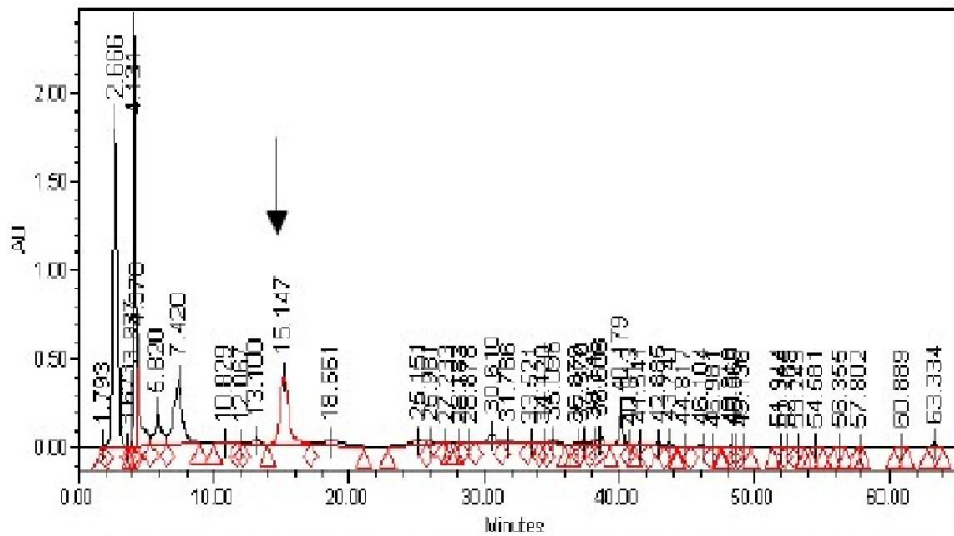
實驗結果

一、建立中藥標準品和中藥的高效能液相層析儀圖譜

在上述 HPLC 的條件下，我們完成建立中藥標準品 (Ferulic acid; 25 ug/ml in 50% methanol) 與川芎 (100 mg/ml in 50 % methanol) 的 HPLC 圖譜，結果分別如圖五 A 和圖五 B。



圖五 A: 中藥萃取物 (川芎; B) 的 HPLC 圖譜



圖五 B: 中藥萃取物 (川芎; B) 的 HPLC 圖譜

二、空白海藻酸微粒的特性

表一顯示使用不同海藻酸濃度和氯化鈣濃度下，形成空白海藻酸微粒的情形。經由實驗結果發現（0 小時），隨著氯化鈣濃度的增加，形成海藻酸微粒的粒徑大小也隨之增加，其中以 10%氯化鈣濃度的粒徑達到最大。而在不同氯化鈣濃度下，隨著海藻酸濃度的增加形成海藻酸微粒的粒徑也隨之增加。在形成空白海藻酸微粒之後，將空白海藻酸微粒放置於 40°C 烘箱中乾燥，分別在乾燥後 24 小時和 48 小時測量大小。我們發現在 1.5 % 海藻酸鈉和 2.5 %氯化鈣的條件下（如圖六），形成海藻酸微粒經 40°C 乾燥 24 小時，可以製備成型性最好的乾燥空白海藻酸微粒（10.29±0.50 mm/10 粒）。

表一、不同海藻酸鈉和氯化鈣濃度，在乾燥後不同時間形成空白海藻酸微粒的粒徑大小

0 小時		氯化鈣濃度				
		0.5 %	2.5 %	5 %	10 %	20 %
海藻酸鈉 濃度	1%	23.65±0.42	24.12±0.27	24.98±0.37	24.15±0.25	22.80±0.72
	1.5%	25.05±0.91	23.73±0.88	24.78±0.68	25.41±0.76	23.31±0.32
	2%	26.07±0.47	26.73±0.41	26.85±0.88	27.35±0.56	27.30±0.41

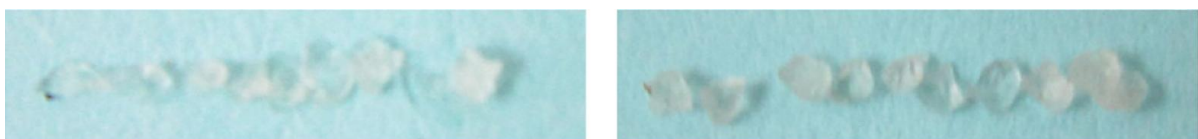
24 小時		氯化鈣濃度				
		0.5 %	2.5 %	5 %	10 %	20 %
海藻酸鈉 濃度	1%	10.00±0.86	11.63±0.30	12.00±0.27	13.66±0.47	16.26±0.42
	1.5%	8.84±0.39	10.29±0.50	11.28±0.88	13.38±0.55	15.91±0.50
	2%	9.57±0.46	9.63±0.48	12.17±0.43	14.40±0.35	17.32±0.51

48 小時		氯化鈣濃度				
		0.5 %	2.5 %	5 %	10 %	20 %
海藻酸鈉 濃度	1%	9.71±1.13	10.61±0.77	11.95±0.26	13.00±0.63	16.28±0.44
	1.5%	8.47±0.57	10.06±0.51	11.04±0.56	12.23±0.68	15.91±0.51
	2%	9.32±0.43	9.83±0.67	13.07±0.73	13.80±0.30	17.32±0.53

單位：mm.

1% 海藻膠 + 0.5% 氯化鈣

1% 海藻膠 + 2.5% 氯化鈣



圖六：乾燥空白海藻酸微粒圖

三、 包覆不同飼料的海藻酸微粒之特性和斑馬魚適口性

接著我們試著在不同條件下包覆不同飼料(一般飼料、豐年蝦卵或豐年全蝦)所形成的海藻酸微粒，以及包覆飼料的海藻酸微粒的斑馬魚適口性為何。由表二結果顯示：在 1.5% 海藻酸鈉下無論 1.5% 或 2.5% 的氯化鈣濃度下，除了包覆豐年蝦卵的海藻酸微粒比較大，其包覆顆粒飼料或豐年全蝦的海藻酸微粒，在形成後乾燥 24 小時或 48 小時皆有相當適當的粒徑大小 ($10.03 \pm 0.57 \sim 12.51 \pm 0.33$ mm./10 粒)。而斑馬魚適口性試驗方面：在 1.5% 氯化鈣濃度下包覆顆粒飼料或豐年全蝦海藻酸微粒，經乾燥 24 小時後餵食斑馬魚分別有最佳 35% 和 70% 的斑馬魚適口性。而包覆豐年蝦卵的斑馬魚適口性則不佳。然而驚訝的是餵食包覆豐年全蝦海藻酸微粒的斑馬魚，則發生 40% 斑馬魚死亡的情形。

表二、不同飼料在不同氯化鈣濃度下形成海藻酸微粒後，在不同乾燥時間後的粒徑大小和斑馬魚適口性

	氯化鈣濃度	
	1.5 %	2.5 %
0 小時		
顆粒飼料	23.94±0.53	25.39±0.44
豐年蝦卵	29.37±0.71	29.71±0.41
豐年全蝦	27.98±0.67	28.13±0.67
24 小時		
顆粒飼料	11.33±0.49 (35) *	12.03±0.82 (25) *
豐年蝦卵	15.10±0.51 (25) *	15.57±0.77 (25) *
豐年全蝦	10.03±0.57 (70) **	11.10±0.30 (30) **
48 小時		
顆粒飼料	11.21±0.75 (15) *	12.51±0.33 (5) *
豐年蝦卵	15.10±0.76 (15) *	16.17±0.65 (0) *
豐年全蝦	10.28±0.71 (30) **	11.42±0.62 (0) *

單位：mm.

*和**代表包覆不同飼料的海藻酸微粒的斑馬魚適口性，單位是(%)。

**亦表示斑馬魚死亡率有 40%。

四、 包覆中藥海藻酸微粒的膨脹率

餵食斑馬魚包覆豐年全蝦海藻酸微粒後，造成斑馬魚死亡的情形。我們推論可能原因是包覆豐年全蝦海藻酸微粒經斑馬魚攝入後，海藻酸微粒的膨脹率造成斑馬魚死亡。實驗結果觀察：我們發現隨著降低海藻酸濃度至 1% 和增加氯化鈣

濃度至 20%，可以降低海藻酸微粒的膨脹率。也因此我們選擇以 1% 海藻酸鈉和 20 % 氯化鈣濃度來包覆 1 克顆粒飼料和不同重量的川芎中藥。

表三、不同海藻酸鈉和氯化鈣濃度下，包覆不同重量川芎的海藻酸微粒膨脹率和
包覆率

海藻酸濃度/ 氯化鈣濃度 (% / %)	川芎(g)	平均膨脹率/粒(%)*		包覆率(%)
		水中	腸液中	
1.5/1.5	0.5	120.8	245.7	72.2
	1.0	139.7	196.0	48.3
1/1.5	0.5	134.1	0	62.8
	1.0	135.8	0	54.1
1/10	0.5	114.8	126.2	64.6
	1.0	119.5	126.1	50.2
1/20	0.5	115.2	118.7	59.5
	1.0	115.7	119.5	39.7
1/40	0.5	117.2	116.3	58.6
	1.0	110.6	105.8	48.1

*每粒包覆中藥海藻酸微粒在浸泡水中或人工腸液中 76 小時的平均膨脹率。

五、 包覆中藥的海藻酸微粒之特性和斑馬魚適口性

製備包覆海藻酸微粒後，觀察斑馬魚是否會受到包覆中藥海藻酸微粒的吸引。結果如表四所示，包覆 0.5 克川芎的海藻酸微粒，連續餵食斑馬魚 4 天的適口率達 61.4%。

表四、不同重量川芎的海藻酸微粒，在不同乾燥時間的粒徑大小和斑馬魚適口性

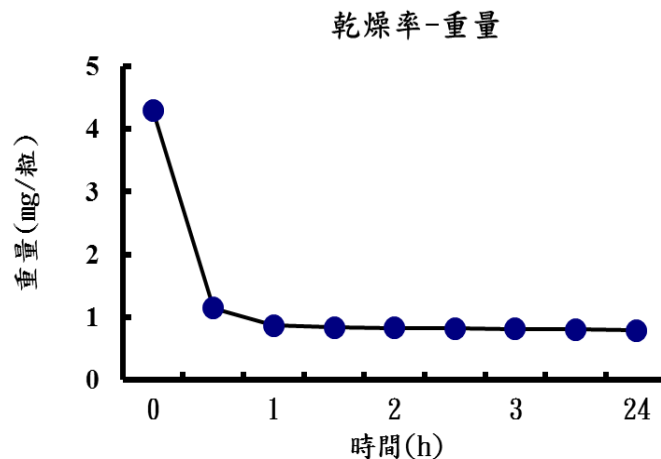
1 克顆粒飼料、1 % 海藻酸鈉和 20% 氯化鈣濃度	
0 小時	
0.5 克川芎	25.68±0.74
1.0 克川芎	25.63±0.49
24 小時	
0.5 克川芎	15.38±0.89(61.4)
1.0 克川芎	16.79±0.51(25.7)

單位：mm

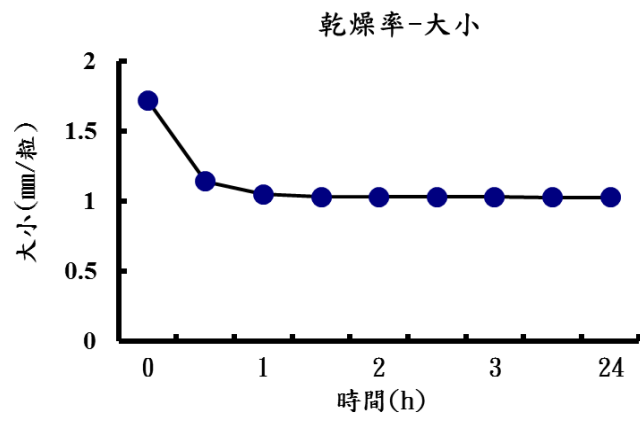
*代表包覆不同重量中藥的海藻酸微粒給予斑馬魚後連續觀察 4 天的適口性。單位是 (%)。

六、 包覆中藥的海藻酸微粒之乾燥率

製備包覆中藥之海藻酸微粒後，每隔半小時測量海藻酸微粒的中亮與大小的改變，得到表五之結果(如圖七及圖八)。此實驗發現其重量與大小大約在 1.5 小時即不再改變。



圖七：乾燥率 V.S. 重量變化圖



圖八: 乾燥率 V.S. 海藻酸微粒大小變化圖

討論

本次研究初步利用海藻酸鈉和氯化鈣包覆飼料和中藥以形成海藻酸微粒，並且可以吸引斑馬魚快速覓食，實際減少強迫餵食造成對動物的傷害。

由本研究的實驗觀察發現：在相同條件下（2% 海藻酸溶液和中藥投藥量，但是未包含任何飼料），形成最佳川芎海藻酸微粒的最佳氯化鈣溶液濃度是 2%（含先前本研究已完成且未發表的實驗）。而形成影響海藻酸微粒形成的主要原因有海藻酸鈉濃度、氯化鈣濃度、氯化鈣溶液 pH 值和中藥與海藻酸鈉比例等四種因素，其中以海藻酸鈉濃度和氯化鈣濃度對形成中藥海藻酸微粒的影響最大，而中藥投藥量的多寡影響最小。

先前參考的研究指出，包覆大黃酸的海藻酸微粒的最佳處方條件是 2.5% 海藻酸鈉、3% 氯化鈣、pH 值 4 的氯化鈣濃度和大黃酸：海藻酸鈉比例是 1:15⁽¹⁰⁾。而我們先前實驗結果觀察也大致符合此條件，不同之處在於即使中藥萃取物與海藻酸鈉溶液比例達 1:1 仍舊能形成海藻酸微粒而被斑馬魚吸引而覓食。由此觀察結果說明氯化鈣溶液的濃度是形成最佳中藥海藻酸微粒的主要因素。因此在製備不同中藥海藻酸微粒時，需要考慮不同氯化鈣溶液濃度對中藥海藻酸微粒形成的影響。測試不同中藥海藻酸微粒對斑馬魚疾病模式（如肝癌）的治療效果為何，需要長時間餵食斑馬魚。因此希望進一步試著尋找將顆粒飼料或豐年全蝦包覆在海藻酸微粒中的最佳條件。

結果發現包覆顆粒飼料或豐年全蝦海藻酸微粒的最佳條件是 1.5 % 海藻酸鈉和 1.5 % 氯化鈣，而斑馬魚適口性也是以此為最佳條件（表二）。但是在斑馬魚適口性實驗發現：餵食包覆豐年全蝦海藻酸微粒時，雖然有相當高的適口率（70%），但是卻發生斑馬魚因攝食豐年全蝦海藻酸微粒而脹死的情形（表二）。

因此認為需要將中藥海藻酸微粒在魚體膨脹率的因素考慮進去。發現隨著降低海藻酸濃度至 1% 和增加氯化鈣濃度至 20%，可以降低海藻酸微粒的膨脹率。故選擇以 1% 海藻酸鈉和 20 % 氯化鈣濃度來包覆 1 克顆粒飼料和 0.5 克川芎中藥以製備中藥海藻酸微粒。在此條件下，包覆 1 克顆粒飼料和不同重量的川芎中藥所形成的中藥海藻酸微粒皆能形成適當的粒徑大小和大約 50 % 的中藥包覆率。然而包覆 0.5 克川芎的海藻酸微粒，相對於包覆 1 克川芎的海藻酸微粒，經連續觀察 4 天餵食斑馬魚中藥海藻酸微粒有較佳的斑馬魚適口性 (61.4% vs 25.7 %) (表四)。

然而，為了解決適口性無法達到 100%的問題，以及斑馬魚進食後死亡之現象，我們根據膨脹率實驗(表三)，發現到海藻酸濃度 1%和氯化鈣濃度 1.5%條件下的膨脹率為 0%，此因海藻酸微粒在人工腸液已經瓦解，故無法測得其值。因此，在新增的實驗中改以此條件進行，成功的將原先約 60%的適口率提升到幾近 100%的適口率。

另外，為了縮短製備海藻酸微粒的時間，另增加乾燥率實驗，發現海藻酸微粒的重量和大小在大約 1.5 小時便幾乎不再改變。故將原先乾燥的 24 小時和 48 小時調整至 2.5 小時，改善以往過久的乾燥時間。

綜合以上結果和討論，本研究實驗已經初步建立可用於斑馬魚之中藥口部投藥系統操作模式並進行相關技術專利申請中。而海藻酸微粒是近幾年來發展的新型劑型，它們被應用於口服藥物的釋放載體已受到廣泛討論。然而不同的中藥或方劑製備成中藥海藻酸微粒而應用於斑馬魚的口部投藥系統，其中藥在斑馬魚體內的吸收率或釋放率，則有待日後進一步的實驗研究。

參考文獻

- 1、 2010 台灣各產業景氣趨勢調查報告-中草藥產業(200912).
- 2、 黃政鎮、游正博。利用斑馬魚作為人類疾病模型及藥物篩選。中央研究院週，第 1050 期。
- 3、 廖欽峰、廖有地。中華實驗動物學會。(2010) 實驗動物管理與使用指南。第 22 章斑馬魚與牛蛙。181-186。行政院農業委員會，台北。
- 4、 王佑華、黎响、楊彬睿、張倫青、周昕、許貝文、李銘源。(2012) 斑馬魚模型在中醫藥研究中的應用現狀。中西醫結合學報，1189-1197。
- 5、 方薇、曾靜、王付利。(2010)。模式生物斑馬魚在人類疾病研究中的應用。醫學信息，337-338。
- 6、 Liu W, Chen JR, Hsu CH, Li YH, Chen YM, Lin CY, Huang SJ, Chang ZK, Chen YC, Lin CH, Gong HY, Lin CC, Kawakami K, Wu JL. A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver. *Hepatology*. 2012; 56(6):2268-2276.
- 7、 Qurrat-ul-Ain, Sharma S, Khuller GK, Garg SK. Alginate-based oral drug delivery system for tuberculosis: pharmacokinetics and therapeutic effects. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51(4):931-8.
- 8、 林曉華、黃宗海、俞金龍。(2013)。海藻酸纖維的研究發展及生物醫學應用。中國組織工程研究，2218-2224。
- 9、 Zang L, Morikane D, Shimada Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel protocol for the oral administration of test chemicals to adult zebrafish. *Zebrafish*. 2011; 8(4):203-10. doi: 10.1089/zeb.2011.0726.
- 10、 趙一潔、張丹參、張力、張夏微、金燦。(2013)。大黃酸腸溶緩釋微丸的制備及體外釋放度考察。中成藥，35(6)，1199-1203。

致謝

本次研究特別感謝中國醫藥大學中醫學院中醫系和學士後中醫學系，提供實驗場地及方法。特與致謝！