◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Sep; 31(9): 1200-1213

催乳颗粒通过调控 WTAP-Wnt5a-β-catenin 信号轴改善溴隐亭诱导的大鼠产后缺乳

李　慧[1]，薛秋云[1]，袁美玲[1]，金奇盈[1]，陈嘉庆[1]，
夏艾芯[1]，许晨昊[2,3]，缪成贵[1,2,3,4]

[1]安徽中医药大学中西医结合学院药理学教研室，合肥 230012，安徽；
[2]安徽中医药大学新安医学与中医药现代化研究所，合肥 230012，安徽；
[3]安徽中医药大学中西医结合学院实验（实训）教学中心，合肥 230012，安徽；
[4]香港大学李嘉诚医学院中医药学院，香港 999077，中国

摘要　**目的：**探讨催乳颗粒（Cuiru Keli，CRKL）对溴隐亭诱导的产后缺乳大鼠的疗效以及作用机制。**方法：**在产后缺乳大鼠模型中采用 ELISA 检测乳腺组织（mammary tissue，MT）中催乳素（prolactin，PRL）的水平。体外培养大鼠乳腺上皮细胞（rat mammary epithelial cells，RMECs）。CCK-8 法检测 CRKL 对 RMECs 增殖的影响来确定含药血清剂量。RT-qPCR 和免疫荧光检测乳糖乳脂乳蛋白相关基因的表达。网络药理学预测 CRKL 治疗产后缺乳的信号通路。分子对接和分子动力学验证 CRKL 关键成分与肾母细胞瘤 1 相关蛋白（WTAP）的结合。RNA 免疫沉淀法用于研究 WTAP 与 Wnt5a 间的相互作用。RT-qPCR 和 Western blot 研究 CRKL 对 Wnt/β-catenin 信号通路的调节机制。**结果：**CRKL 显著提高母鼠单小时泌乳量（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。CRKL 升高模型大鼠 MT 中 PRL 水平（$P<0.01$）。含 CRKL 血清促进 PRLR、FASN、CSN2、GLUT1 的表达（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。网络药理学预测 Wnt/β-catenin 信号通路与 CRKL 治疗产后缺乳高度相关。含 CRKL 血清促进 Wnt 信号通路关键基因 CCND1、c-Myc 和 β-catenin 的表达（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。分子对接和分子动力学表明 CRKL 关键成分与 WTAP 的结合能力强。在 RMECs 中过表达 WTAP 干扰了 CRKL 的作用（$P<0.01$）。**结论：**CRKL 通过 WTAP-Wnt5a-β-catenin 信号轴改善溴隐亭诱导的大鼠产后缺乳。

关键词　催乳颗粒；产后缺乳；肾母细胞瘤 1 相关蛋白；Wnt5a；催乳素

中图分类号：R965.2
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)09-1200-14
doi: 10.12092/j.issn.1009-2501.2026.09.006

产后缺乳是指母亲在哺乳期缺乏母乳，甚至无法喂养婴儿，这会影响婴儿的发育[1]。乳汁的合成分泌是复杂的过程，与产妇精神、情绪、营养状况有关[2]。乳汁的合成和分泌与内分泌系统密切相关。怀孕期间，血液中的雌激素水平升高。雌激素和垂体激素共同作用促进乳房发育。分娩后，垂体前叶分泌各种激素作用于发育的乳腺组织（mammary tissue，MT），如催乳素（prolactin，PRL）、促肾上腺皮质激素和生长素，引起乳汁分泌[3]。乳腺上皮细胞（mammary epithelial cells，MEC）从血液中吸收各种营养物质并合成乳汁。乳汁在 MT 中积聚，并通过导管和乳头流出体外[4]。吮吸刺激也是维持泌乳的重要条件。吮吸刺激通过下丘脑神经通路作用于垂体前叶，促进激素

2025-01-10 收稿　2025-02-19 修回
合肥大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项（2023CXMMTCM025）；安徽省重点研究与开发计划（2022e07020028）；安徽省教育厅研究项目（2024AH051026，gxgwfx2022019，2022xnfzkc023，2023jyxm0345）；安徽中医药大学研究项目（2020rcZD001，2022BHTNXA05）；安徽省中医药管理局研究项目（2022CCYB10）
李慧，女，硕士研究生，研究方向：中药治疗产后缺乳。
E-mail: lhui09@126.com
许晨昊，共同通信作者，男，硕士，讲师，研究方向：中西医结合防治风湿病。
E-mail: 935905919@qq.com
缪成贵，通信作者，男，博士，教授，研究方向：中西医结合防治风湿病及产后缺乳。
E-mail: miaocg@ahtcm.edu.cn

分泌[5]。

催乳颗粒(Cuiru Keli, CRKL)是蚌埠丰原涂山制药厂生产的中成药[国家药品标准 WS3-413(Z-085)-2003(Z), 国家药品批准文号: Z1991012], 由黄芪、党参、白术、当归、川芎、柴胡、王不留行、漏芦、萱草根 9 种中草药组成, 是临床产科常用药物。它具备益气养血以及通络下乳的功效, 对治疗产妇产后母乳量少有显著效果。中医认为, 产妇乳汁分泌不足, 大多是由气血亏虚、肝气瘀滞所引发, 所以在治疗时, 应以疏肝解郁、益气养血、通络下乳为主。CRKL 中黄芪可用于治疗全身无力[6]。党参具有健脾益肺、养血的功效[7]。白术是补虚药[8]。当归具有补血作用, 可以改善产后贫血的症状[9]。川芎具有益气养血的功效[10]。柴胡用于舒缓肝脏和缓解抑郁[11]。王不留行、萱草根和漏芦对乳汁潴留和乳房痈肿胀疼痛具有良好的治疗作用[12-13]。临床研究表明, CRKL 能够提升哺乳期产妇血液中 PRL 的水平, 同时降低具有抑制乳汁分泌作用的雌二醇水平, 有效促进乳汁的分泌[14]。对产褥期产妇而言, CRKL 配合母乳喂养有助于促进乳汁分泌、改善不良情绪; 对新生儿来说, CRKL 配合母乳喂养能降低其患病理性黄疸及腹泻的概率。此外, CRKL 不良反应轻微, 不会对正常哺乳造成影响[15]。

β-catenin 介导的 Wnt 信号通路一直备受关注。Wnt/β-catenin 信号通路在乳腺导管的突起、胚胎发育、生长和分化中起着非常重要的作用, 是脂肪生成基因表达、脂肪生成和脂肪去饱和的重要途径[16]。Li 等[17]发现, 激活小鼠 MEC 中的经典 Wnt 信号通路可以促进乳蛋白的产生。

肾母细胞瘤 1 相关蛋白(WTAP)是 N6 甲基腺苷 RNA 甲基化修饰关键酶, 它参与调控 RNA 剪接、细胞增殖及胚胎发育等生物过程[18]。WTAP 具有组织特异性, 在各种类型的肿瘤中升高, 并可影响 Wnt/β-catenin 信号通路的活性[19]。Wnt5a 是 Wnt 配体家族的成员, 通过与 Frizzled 及其共受体的受体复合物结合来激活或抑制 Wnt 信号通路。Wnt5a 在发育、稳态和疾病中起着重要作用, Wnt5a 可以调节巨噬细胞的极化和功能[20]。此外, 在癌症患者血清中发现了 Wnt5a 的异常表达, 这与乳腺肿瘤组织的微血管密度密切相关[21]。

预实验结果发现, WTAP 和 Wnt5a 在产后缺乳大鼠模型的 MT 中异常表达, RNA 免疫沉淀(RIP)实验表明 WTAP 和 Wnt5a 之间存在相互靶向关系。本研究采用 RT-qPCR(real time qPCR)、Western blot、RIP 和免疫荧光等研究方法, 结合网络药理学、分子对接和分子动力学, 在溴隐亭诱导的产后缺乳大鼠模型中, 研究 CRKL 治疗产后缺乳的机制。本研究通过体内外实验验证 WTAP 是否可以作为产后缺乳潜在的新治疗靶点, 探讨 CRKL 是如何通过 Wnt-β-catenin 信号通路改善产后缺乳, 以进一步阐明 CRKL 治疗产后缺乳的作用机制, 为 CRKL 的临床应用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　药物　CRKL 由蚌埠丰原涂山制药有限公司生产[国家药品标准 WS3-413(Z-085)-2003(Z), 国家药品批准文号: Z1991012], 由黄芪、党参、白术、当归、川芎、柴胡、王不留行、漏芦、萱草根 9 种药材组成。多潘立酮购自西安杨森制药有限公司, 批号: LFJ4921。甲磺酸溴隐亭购自 DOPPEL Famaceutici S.r.l.(意大利), 批号: 006。

1.2　试剂　胎牛血清(批号 16140071)、DMEM/F-12 培养基(批号 11965092)、TRizol 试剂(批号 8123029)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; FASN(批号 bs-1498R)、GLUT1(批号 bs-20173R)均购自北京博奥森生物技术有限公司; CSN2(批号 66435-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司; β-catenin(批号 AB32572)、CCND1(批号 AB16663)、c-Myc(批号 AB32072)、β-actin(批号 AB8226)均购自 abcam 公司; 辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG(批号 ZB-2307)、辣根酶标记兔抗山羊 IgG(批号 ZB-2306)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; ECL 化学发光试剂盒(批号 BL520A)、PCR 试剂盒(批号 BL697A)、反转录试剂盒(批号 BL696A)均购自 biosharp 公司; 细胞裂解液(批号 P0013B)、青霉素-链霉素(批号 C0222)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P0015)均购自 Beyotime 生物技术有限公司; PRL(批号 GR20221210)ELISA 试剂盒购自武汉基因美生物科技有限公司。

1.3　仪器设备　酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司, 型号: AU5800); 超净工作台(苏州安泰科技技术有限公司, 型号: SW-CJ-IFD); 超纯水仪(美国 Millipore 公司, 型号: D24UV); 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, 型号: Tanon 5200); 罗氏荧光定量 PCR 仪(上海实维实验仪器技术有

限公司，型号：lightCycler 96）；细胞培养箱（美国 Thermo 公司，型号：Foram 370）；电子分析天平（上海越平科学仪器有限公司，型号：FA2104B）；高速冷冻离心机（德国 Sigma 公司，型号：3K15）；电泳仪（美国伯乐公司，型号：164-5050）；倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司，型号：CX41）；−80 ℃超低温冰箱（美国 Thermo 公司，型号：902-ULTS）；制冰机（日本 SANYO 公司，型号：EC40）。

1.4　动物分组与给药　本实验选用 SPF 级 2 月龄 SD 大鼠，体质量（200±20）g，实验动物购自华创信诺医药有限公司，生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009，动物质量证书编号：202262143。动物在 25 ~ 26 ℃的温度下饲养，自由饮水和进食。本研究已获得安徽中医药大学实验动物伦理委员会的批准（动物伦理编号：AHUCM-rats-2022129）。

体内实验：大鼠经过两天适应性喂养后，雌性和雄性 3:1 交配。分娩后选择分娩时间小于 48 h 的雌性大鼠作为实验对象。将雌性大鼠随机分为正常组、模型组、CRKL 低剂量组（3 g/kg）、CRKL 中剂量组（6 g/kg）、CRKL 高剂量组（9 g/kg）、多潘立酮阳性组（3 mg/kg）和生理盐水组（NC，模型组+生理盐水），每组各有 8 只大鼠。除正常组外，各组大鼠从分娩后第 2 天起每天灌胃甲磺酸溴隐亭（1.6 mg/kg），制备产后缺乳大鼠模型，每天 1 次，连续 10 d[22]。

体外实验：采用组织块培养法培养大鼠乳腺上皮细胞（rat mammary epithelial cell，RMECs）。细胞培养基由 20% 胎牛血清、DMEM/F-12 培养基和 1% 青霉素链霉素溶液组成，实验中使用的细胞是原代培养至第 3 ~ 5 代的细胞。细胞实验分为正常组，模型组，CRKL 低（5% CRKL 含药血清）、CRKL 中（10% CRKL 含药血清）、CRKL 高（20% CRKL 含药血清）剂量组，空白血清对照组（NC，正常组大鼠血清，排除血清对细胞的影响）[23]。

1.5　泌乳量测定　从给药当天开始，每天从雌性大鼠中分离幼鼠 4 h。在隔离之前，称重每窝的重量并记录为 W1。隔离 4 h 后，用手指轻轻挤压幼鼠腹部下部两次，以除幼鼠的尿液，并连续挤压和排尿两次。当幼鼠的体质量没有变化时，完全排除幼鼠的尿液。此时，对幼鼠的体质量进行称重并记为 W2，然后将幼鼠放回母鼠处吮吸乳汁 1 h，然后再次称重并记作 W3。W3−W2+（W1−W2）/4 是大鼠每小时的泌乳量。

1.6　含药血清制备　经过两天的适应性喂养后，雄性和雌性配对（1:3）。交配后，将分娩时间差小于 48 h 的雌性大鼠随机分为正常组、模型组、CRKL 低剂量组、CRKL 中剂量组、CRKL 高剂量组和空白血清对照（NC）组。连续灌胃给药 CRKL 5 d。最后一次给药后，麻醉各组大鼠，采集血样。离心 10 min 取血清，在 56 ℃水浴下灭活 30 min[24]。

1.7　CCK-8 法检测 CRKL 对 RMECs 增殖的影响　将 RMECs 均匀接种到 96 孔板中。待细胞完全黏附在壁上后，每组用含 CRKL 的血清处理 24 h，然后按照 CCK-8 试剂盒的说明进行操作。向每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，在培养箱中孵育 1 h，并用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度[25]。

1.8　网络药理学[26]　通过 TCMSP 平台（https://tcmsp-e.com/tcmsp.php）筛选 CRKL 中药物的活性成分和靶点，并通过 UniProt 平台对靶点进行标准化[27]。通过 GeneCards 数据库（https://www.genecards.org/）收集产后缺乳靶点[28]。利用 String 平台构建蛋白-蛋白相互作用（PPI）网络，并使用 Cytoscape（3.9.1）软件进行可视化[29]。采用基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析，预测 CRKL 治疗产后缺乳的关键途径[30]。

1.9　分子对接和分子动力学　通过分子对接和分子动力学进行验证网络药理筛选出的 CRKL 关键成分与 WTAP 的结合作用。从 AlphaFold 网站下载 WTAP 的 3D 结构（https://alphafold.ebi.ac.uk）以及 TCMSP 网站下载 CRKL 成分的 Mol2 结构。设置对接盒子（Gird box）的坐标为 *X*：53.968、*Y*：27.276、*Z*：−64.732，使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接，使用 PyMol 可视化 WTAP 蛋白和 CRKL 成分的结合位点[31]。然后，使用 Gromacs v2022.03 软件对 WTAP-7-（beta-Xylosyl）cephalomannine_qt、WTAP-picraquassioside C、WTAP-wallichilide 和 WTAP-Cubebin 复合物进行了 100 ns 的分子动力学模拟[32]。最后，使用“MMPBSA.py v.16.0”脚本计算蛋白质小分子复合物的结合自由能[33]。

1.10　ELISA 检测 MT 中 PRL 水平　PRL 水平由 ELISA 试剂盒检测。MT 按比例加入 PBS 后研磨。以 3 000 r/min 离心 10 min，得到上清液。按照 ELISA 试剂盒说明进行实验，酶标仪进行测定。

1.11　RT-qPCR 检测 PRLR、FASN、CSN2、GLUT1、CCND1、c-Myc 的 mRNA 表达　用 TRizol 试剂从 MT 和 RMECs 中提取 RNA。根据逆转录试剂盒的说明，将 RNA 逆转录。使用荧光定量 PCR 试剂盒进行定量 PCR 扩增。以 β-actin 为内参数，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。引入序列表见 Tab.1。

Tab.1　RT-qPCR primer sequences

Gene name (rat)		Primer sequence
PRLR	Forward primer	GAGGCGGATGAGAACAAGCAGATC
	Reward primer	GGAGGGTGGGTTGGAAATGAACTTC
FASN	Forward primer	GTGTGGTAGGCTTGGTGAACTGTC
	Reward primer	GTGAGATGTGCTGCTGAGGTTGG
CSN2	Forward primer	GGTCTTCATCCTTGCCTGCCTTG
	Reward primer	CCTGTCCCATGAGTTTCACCTTCTG
GLUT1	Forward primer	CATCCACCACACTCACCACAC
	Reward primer	GCCTGCCAAAGCGATTAACAAAGAG
CCND1	Forward primer	AGCAGCGACTCTGAAGAAGAACAAG
	Reward primer	GGATGACCCTGACTCGGACCTC
c-Myc	Forward primer	AAGAAGGCTCCACCATCGTTTGAAG
	Reward primer	AGTCTGCGGTTGCTTGAGGTTG
β-actin	Forward primer	CACTATCGGCAATGAGCGGTTCC
	Reward primer	CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGTC

1.12　si-RNA 敲低实验　Wnt5a 基因敲除序列购自上海生工生物工程股份有限公司。转染前，将细胞接种到 6 孔板中，按照 lipofectamine3000 的说明向每个孔添加无抗生素培养基，转染时细胞密度达到 60%～80%。Lipofectamine3000 和 siRNA 在 Opti-MEM 中稀释，轻轻混合，室温孵育 5 min。将稀释后的 lipofectamine3000 和 siRNA 混合，静置，加入细胞培养基中，轻轻摇匀。孔板在培养箱中培养 6 h 后，更换培养基后继续培养 24 h，提取 RNA 和蛋白进行后续实验。

1.13　腺病毒过表达实验　腺病毒过表达系统由汉恒生物科技有限公司（上海）提供。根据产品手册，腺病毒在生物安全柜中稀释。首先，分离并培养 RMECs，扩增培养物，将生长良好的 RMECs 稀释至 3×10^5 个细胞/mL，然后以 500 μL/孔（1.5×10^5 细胞）的标准加入 24 孔板中进一步培养。在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养过夜后，第 2 天提取细胞的原始培养基，加入 1/2 体积的新鲜培养基，并根据探索的 MOI 值加入适当体积的病毒。最后，在感染 4 h 后轻轻混合[每孔病毒量（UL）=MOI×细胞/病毒滴（PFU/mL）×1 000]，补充至完全培养体积[34]。将 RMECs 分为 4 组：正常组（原代培养的正常 RMECs，不处理）、WTAP 过表达组（原代培养的模型 RMECs+WTAP 过表达载体）、WTAP 过表达+CRKL 组（WTAP 过表达组+10% 含药血清）、阴性对照组（原代培养的模型 RMECs+空载体）。

1.14　RIP 实验检测 WTAP 与 Wnt5a 相互作用　向收集的 2×10^7 个细胞样本中加入 4 mL PBS，1 000 r/min 离心 5 min，收集细胞上清液。使用 RIP 检测试剂盒提供的试剂，裂解细胞，并向裂解液中加入 8.5 μL DNase 盐储备溶液和 20 μL DNse（20 U）。然后，将细胞在 37 ℃ 下孵育 10 min 以去除 DNA。对于两组 RIP 样品，制备 40 μL 蛋白 A/G 磁珠，即平衡蛋白 A/G 微球。然后，使用试剂盒（Bersin Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou, China）提供的方法进行 RNA 免疫沉淀和 RNA 提取，并使用定量 PCR 验证 RNA 结合效率[35]。

1.15　Western blot 检测 RMECs 中 CCND1、c-Myc、β-catenin 蛋白表达　加入 RIPA 裂解液和 PMSF 提取蛋白。电泳分离蛋白，电转移后蛋白被转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h。用 β-catenin（1:1 000），CCND1（1:10 000），c-Myc（1:1 000），β-actin（1:10 000）一抗在 4 ℃ 下孵育过夜，洗涤 3 次后将与 HRP 偶联的二抗在室温下孵育 1 h。使用 ECL 试剂盒进行检测，并使用 ImageJ 软件进行灰度值分析。

1.16　统计学处理　实验数据采用 SPSS 26.0 进行统计学分析。所有数据结果均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，独立的两组数据采用两个独立样本

t 检验进行比较，多组比较采用方差分析。*P*< 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRKL 促进溴隐亭诱导的产后缺乳大鼠乳汁分泌 与正常组相比，模型组母鼠单小时泌乳量和崽鼠窝重均明显降低；与模型组相比，CRKL 给药组母鼠单小时泌乳量和崽鼠窝重显著增加（Fig.1A，1B）（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。与正常组相比，模型组 PRL 水平明显降低；与模型组相比，CRKL 各剂量组 PRL 水平明显升高（Fig.1C）（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。

CCK-8 实验确定 CRKL 含药血清的剂量，并最终确定剂量为 5%、10% 和 20%（Fig.1D）。采用 RT-qPCR 检测 PRL 在 RMECs 中的 mRNA 表达，结果显示，与正常组相比，模型组 RMECs 中 PRLR mRNA 表达显著降低；与模型组相比，CRKL 各剂量组 RMECs 中 PRLR 的 mRNA 表达明显升高（Fig.1E）（*P*<0.01）。

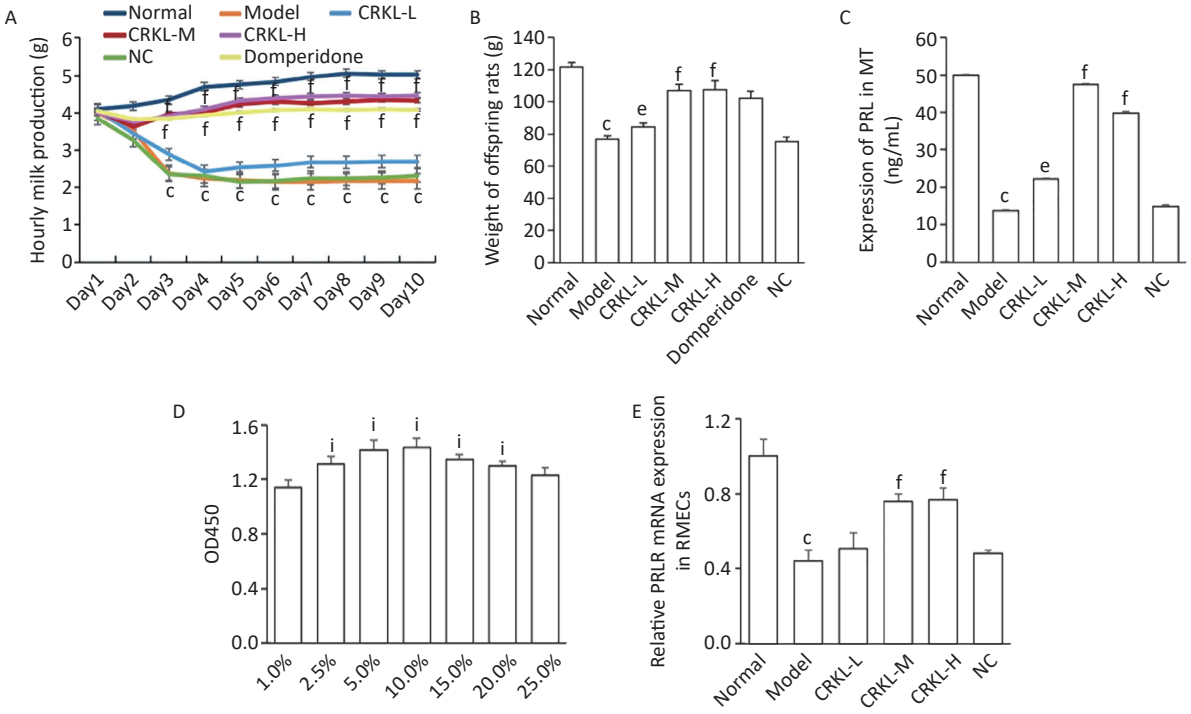


Fig.1 CRKL promotes the secretion of milk in postpartum hypogalactia rats ($\bar{x} \pm s$)

Hourly milk production (A). Weight gain of offspring (B). PRL levels in MT was detected by ELISA (C). CCK8 cell proliferation activity (D). The mRNA expression of PRLR in RMECs was detected by RT-qPCR (E) (A-B, *n*=8; C-E, *n*=3). ^{c}P<0.01, compared with normal; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model. ^{i}P<0.01, compared with 1.0%.

2.2 CRKL 促进 RMECs 乳糖乳脂乳蛋白的合成 RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，模型组细胞 FASN、CSN2、GLUT1 的 mRNA 表达水平明显降低；与模型组相比，CRKL 各剂量组细胞 FASN（Fig.2A）、CSN2（Fig.2B）、GLUT1（Fig.2C）的 mRNA 表达水平升高（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。此外，免疫荧光结果显示，与正常组相比，模型组细胞 FASN、CSN2、GLUT1 的蛋白表达水平显著降低；与模型组相比，CRKL 各剂量组细胞 FASN（Fig.2D）、CSN2（Fig.2E）、GLUT1（Fig.2F）的蛋白表达水平明显升高（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。

2.3 网络药理学预测 利用 OB 和 DL 值筛选了 CRKL 中 78 种潜在的活性成分，并利用 Cytoscape 3.9.1 收集并可视化成草药化合物网络图。基于这 78 种潜在的活性成分，筛选出了 CRKL 的 919 个潜在靶点（Fig.3A）。在 GeneCards 数据库中分析和筛选了 3 006 个产后缺乳靶点。使用 Venn 图工具获得了 464 个重叠基因（Fig.3B）。对重叠基因进行了 PPI 网络分析，并将其导入 Cytoscape 3.9.1 中，进一步获得了相互作用网络（Fig.3C）。通过 MCODE 和 CytoNCA 插件选择了前 13 个高度连接的节点作为核心网络（Fig.3D）。GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析对 13 个关键靶基因进行了分析（Fig.3E，3F）。GO 富集分析显示 CRKL 主要通过生物过程、细胞通信和分子功能发挥作

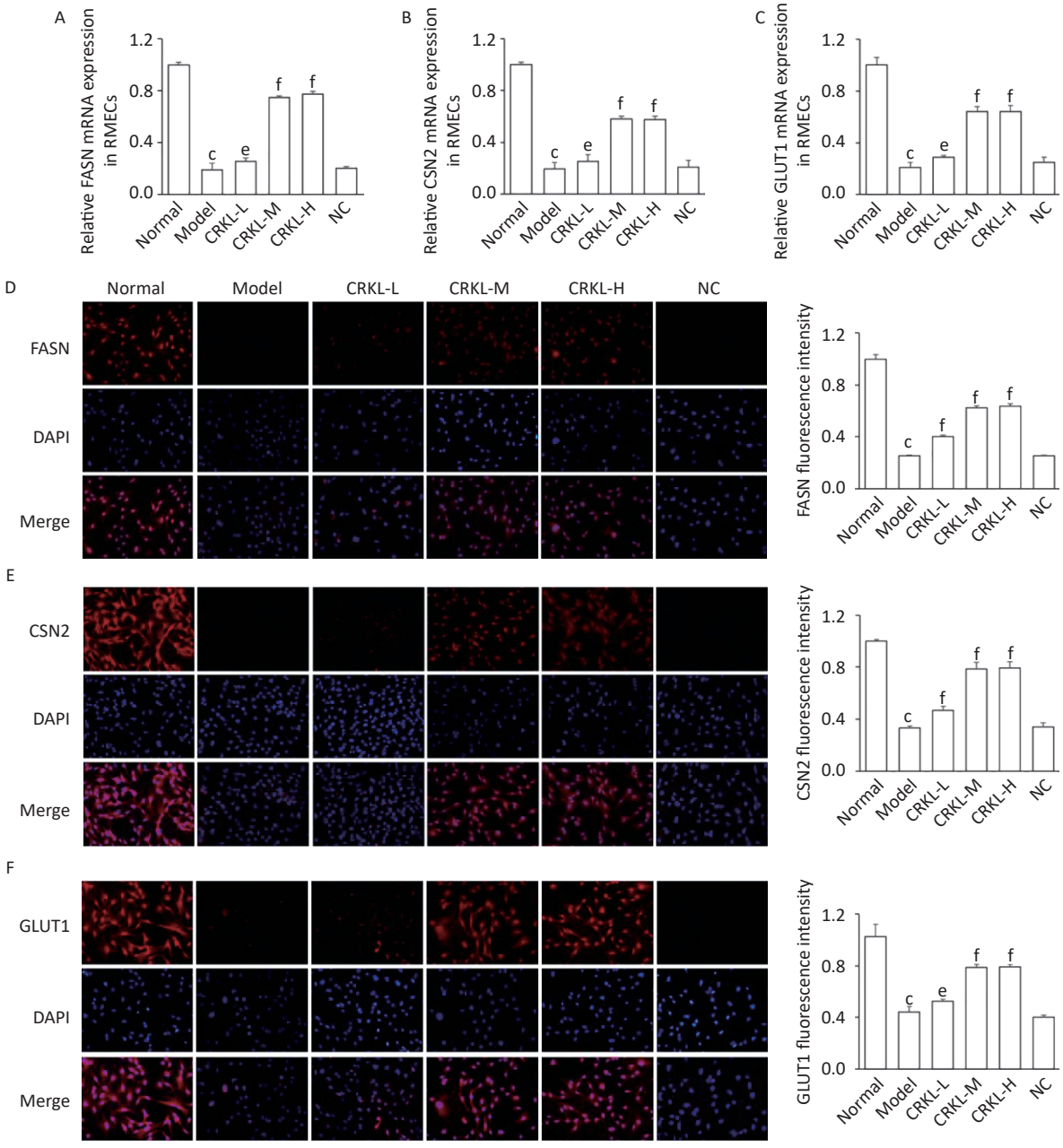


Fig.2　CRKL promotes gene expression of milk lactose, milk fat synthesis, and milk protein in RMECs ($\bar{x} \pm s$)

The mRNA expression of FASN, CSN2, and GLUT1 in RMECs were detected by RT-qPCR (A, B, C). The protein expression of FASN, CSN2, and GLUT1 in RMECs were detected by immunofluorescence (D, E, F) (scale bar=50 μm) (n=3). ^{c}P<0.01, compared with normal; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model.

用；KEGG 富集分析显示，Wnt 信号通路可能是 CRKL 的一个作用途径，根据 KEGG 富集分析结果构建了一个草药化合物基因通路网络（Fig.3G）。

2.4　CRKL 显著促进 RMECs 中 Wnt/β-catenin 信号通路　RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，模型组细胞 CCND1、c-Myc 的 mRNA 表达水平明显降低；与模型组相比，CRKL 各剂量组细胞 CCND1（Fig.4A）、c-Myc（Fig.4B）的 mRNA 表达水平明显升高（P<0.05 或 P<0.01）。Western blot 结果显示，与正常组相比，模型组大鼠细胞 CCND1、c-Myc、β-catenin 蛋白水平明显降低（P<0.01）；与模型组相比，CRKL 各剂量组细胞 CCND1（Fig.4C）、c-Myc（Fig.4D）、β-catenin（Fig.4E）的蛋白表达水平升高（P<0.05 或 P<0.01）。

2.5　分子对接和分子动力学　分子对接显示，CRKL 中的潜在活性成分与 WTAP 蛋白具有良好

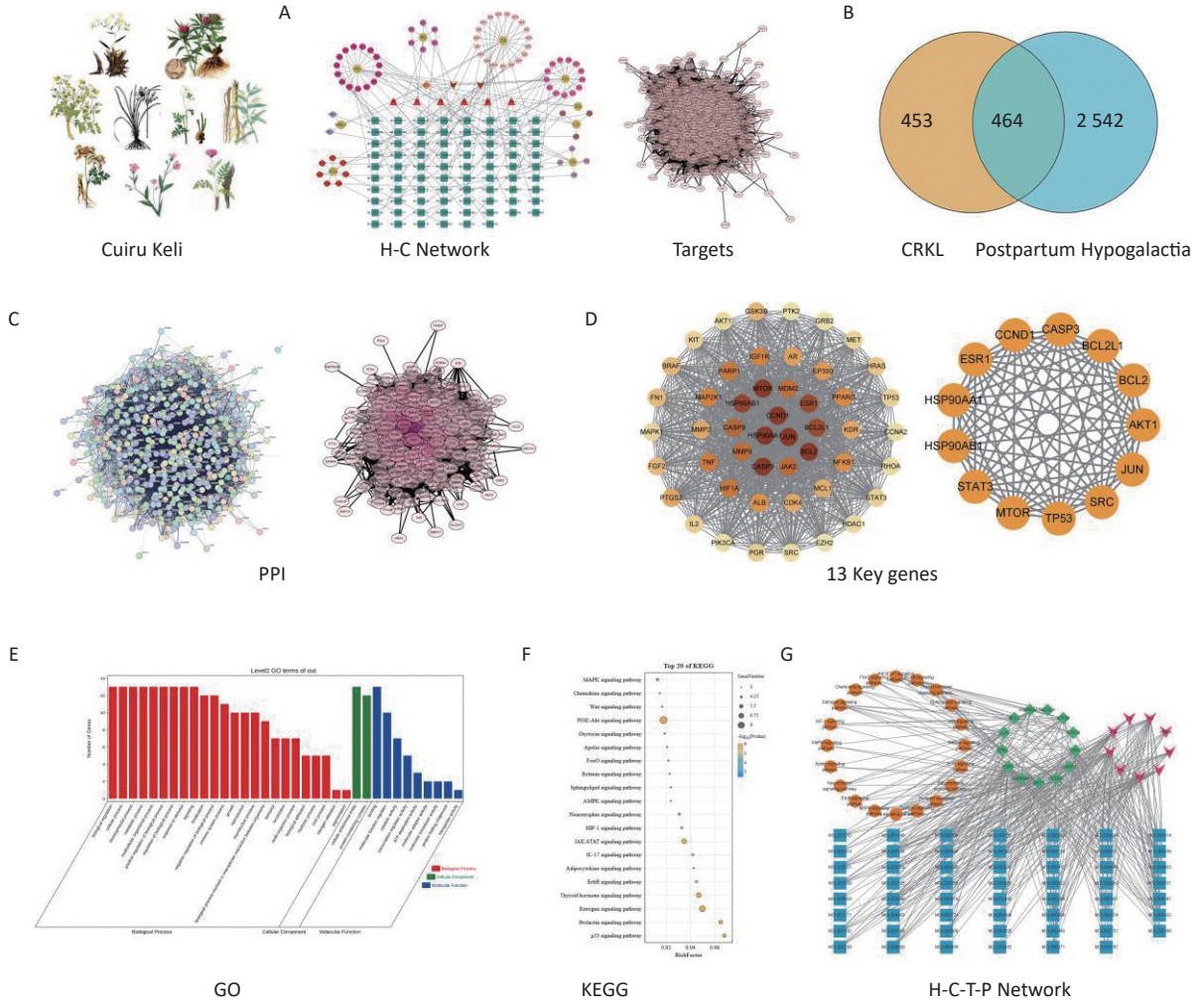


Fig.3 CRKL target predicted by network pharmacology

Screening of CRKL components (A). Obtained 464 OGEs from the Venn diagram tool (B). Core target geneswere obtained by PPI network analysis (C, D). GO function analysis (E). KEGG enrichment analysis (F). Compound-Target-Pathway network (G).

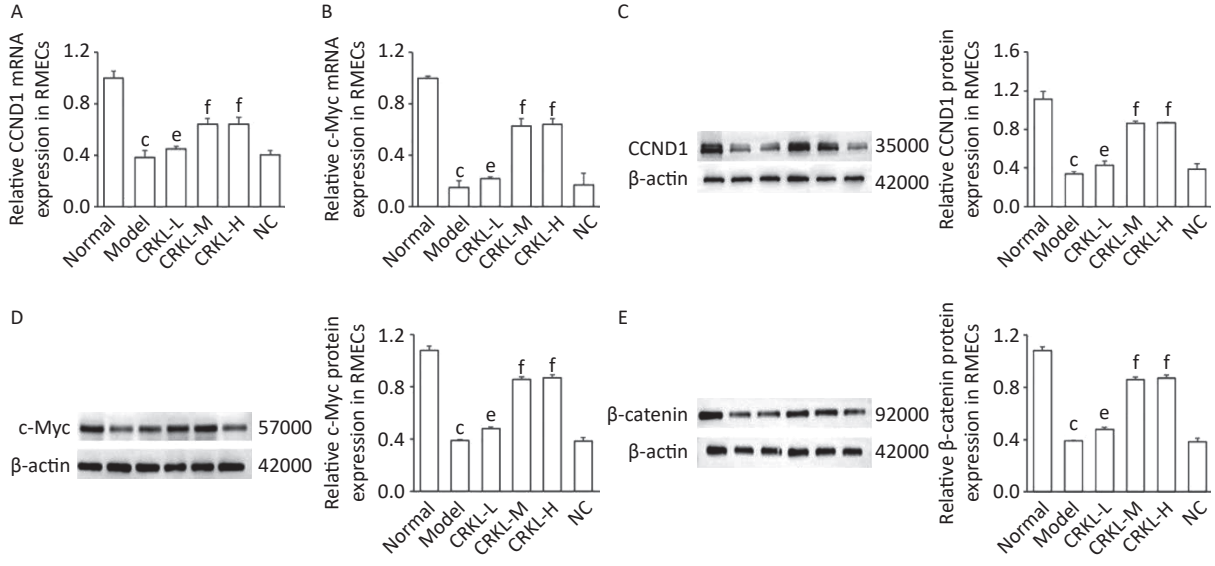


Fig.4 CRKL promotes the expression of Wnt/β-catenin signaling pathway in RMECs ($\bar{x} \pm s$)

The mRNA expression of CCND1 and c-Myc in RMECs were detected by RT-qPCR (A, B). The protein expression of CCND1, c-Myc, and β-catenin in RMECs were detected by WB (C, D, E) (n=3). ^{c}P<0.01, compared with normal; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model.

的结合能力(Tab.2)(Fig.5A-5D)。选取了 4 种结合能较高的单体进行分子动力学模拟。结果表明，Picraquassioside C，总结合自由能最低(−32.75 kcal/mol)，结合稳定性最强，且结合驱动力综合性最佳。Wallichilide，结合稳定性次于 Picraquassioside C。Cubebin，静电驱动力较好，但整体结合能偏低(Fig.5E-5N)。7-(beta-Xylosyl) cephalomannine，结合自由能最高，稳定性最差(Tab.3)。

2.6　CRKL 抑制 WTAP 的表达　RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，模型大鼠 MT 中 WTAP mRNA 表达水平显著升高(Fig.6A)(P<0.01)；与模型

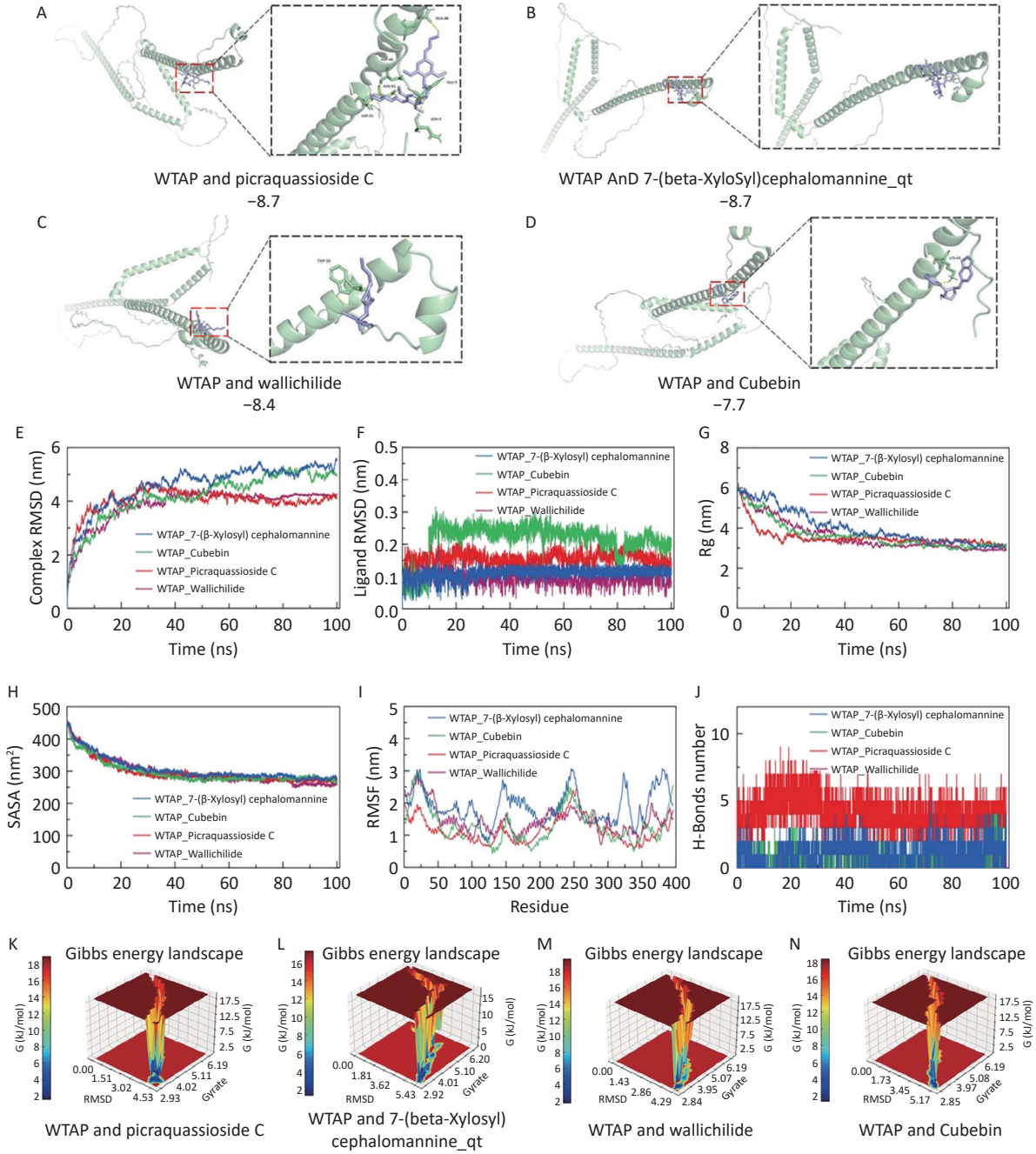


Fig.5　Molecular docking and molecular dynamics

Molecular docking of WTAP with Picraquassioside C, 7- (beta Xylosyl) cephalomannine, Wallichilide, and Wallichilide (A, B, C, D). Stability analysis of WTAP molecular dynamics complex with four components (Picraquassiosis C, 7- (beta Xylosyl) Cephalomanine, Wallichilide, and Wallichilide) (E, F, G, H, I, J). Gibbs free energy analysis of WTAP molecular dynamics complexes with four components (Picraquassiosis C, 7- (beta Xylosyl) cephalomanine, Wallichilide, and Wallichilide) (K, L, M, N).

Tab.2　WTAP molecular docking

Mol ID	Molecule name	Herb name	Binding capacity
MOL008393	7-(beta-Xylosyl)cephalomannine_qt	*C. pilosula* root	−8.7
MOL013345	picraquassioside C	*H. Fulva* root	−8.7
MOL002157	wallichilide	*L. Striatum* root	−8.4
MOL013187	Cubebin	*B. chinense* root	−7.7
MOL004653	(+)-Anomalin	*B. chinense* root	−7.3
MOL000020	12-senecioyl-2E,8E,10E-atractylentriol	*H. Fulva* root	−7.3
MOL000371	3,9-di-O-methylnissolin	*A. membranaceus* root	−6.9
MOL000398	isoflavanone	*A. membranaceus* root	−6.8
MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3,4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	*A. membranaceus* root	−6.6
MOL013343	hemerocallone	*C. Pilosula* root	−6.5

Tab.3　Calculate the average binding free energy of four complexes using MM/PBSA method

Complex systems	ΔVDWAALS	ΔE_{elec}	ΔE_{GB}	ΔE_{surf}	ΔG_{gas}	$\Delta G_{solvation}$	ΔTotal
WTAP_7-(beta-Xylosyl) cephalomannine	−37.14	−6.03	25.58	−4.70	−43.17	20.88	−22.29
WTAP_Cubebin	−28.94	−9.06	24.46	−4.02	−38.00	20.44	−17.56
WTAP_Picraquassioside C	−34.01	−30.03	36.97	−5.69	−64.03	31.28	−32.75
WTAP_Wallichilide	−36.00	1.29	11.80	−4.29	−34.71	7.51	−27.21

组相比，CRKL 给药后 WTAP 的表达降低(Fig.6B)(P<0.01)。细胞上进一步验证，RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，WTAP(Fig.6C)在模型大鼠的 RMECs 中高表达；并且与模型组相比，CRKL 治疗后 WTAP 的表达降低(Fig.6D)(P<0.01)。

2.7　WTAP 影响 Wnt5a/β-catenin 信号通路　RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，模型大鼠 MT(Fig.7A)和 RMECs(Fig.7B)中 Wnt5a mRNA 表达水平显著降低(P<0.01)。

RIP 实验结果表明，模型组结合能力明显高于正常组(Fig.7C)。过表达 WTAP 后，RT-qPCR 结果显示，与正常组相比，过表达 WTAP 组的 CCND1 和 c-Myc 的 mRNA 表达水平降低；与过表达 WTAP 组相比，过表达 WTAP+敲低 Wnt5a 组细胞的 CCND1(Fig.7D)和 c-Myc(Fig.7E)的 mRNA 表达水平升高(P<0.01)。Western blot 结果显示，与正常组相比，过表达 WTAP 组的 β-catenin 的蛋白表达水平降低；与过表达 WTAP 组相比，过表达 WTAP+敲低 Wnt5a 组细胞的 β-catenin 蛋白表达水平升高(Fig.7F)(P<0.01)。此外，RT-qPCR 结果显示，过表达 WTAP 后细胞 FASN、CSN2 和 GLUT1 的 mRNA 表达水平也下降；然而，在 Wnt5a 敲低后，FASN(Fig.7G)、CSN2(Fig.7H)和 GLUT1(Fig.7I)的 mRNA 表达水平增加(P<0.01)。这表明 WTAP

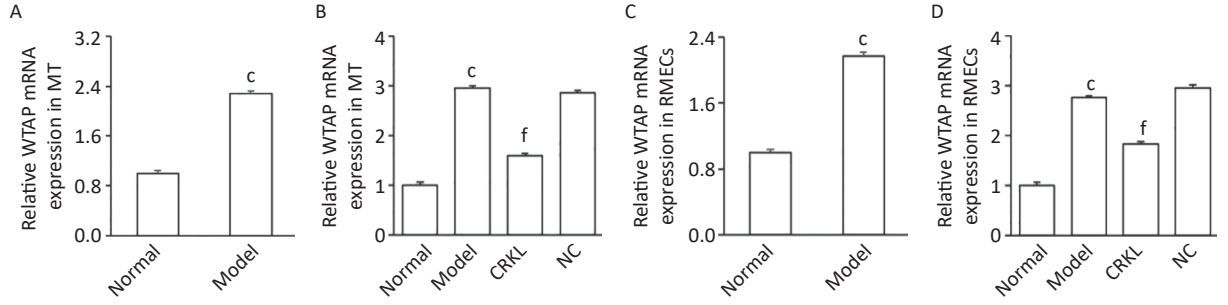


Fig.6　CRKL inhibits WTAP expression ($\bar{x} \pm s$)

The mRNA expression of WTAP in MT and RMECs were detected by RT-qPCR (A, B, C, D) (n=3). [c]P<0.01, compared with normal; [f]P<0.01, compared with model.

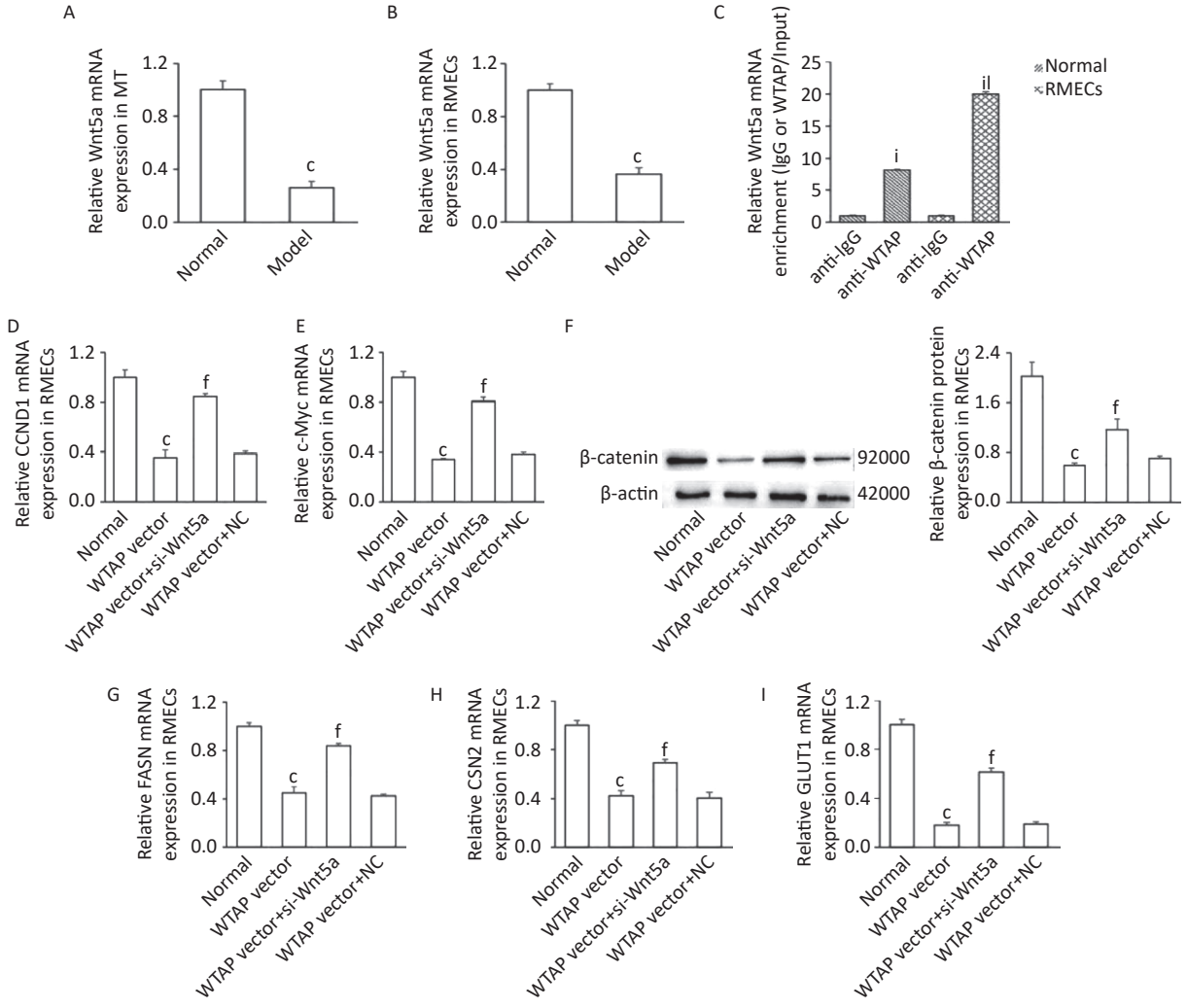


Fig.7　WTAP inhibits the expression of Wnt5a/β-catenin signaling pathway ($\bar{x} \pm s$)

The mRNA expression of Wnt5a in MT and RMECs were detected by RT-qPCR (A, B). RIP experiment (C). The mRNA expression of CCND1 and c-Myc in RMECs were detected by RT-qPCR (D, E). The protein expression of β-catenin in RMECs was detected by WB (F). The mRNA expression of FASN, CSN2, and GLUT1 in RMECs were detected by RT-qPCR (G, H, I) (n=3). ^{c}P<0.01, compared with normal; ^{f}P<0.01, compared with WTAP vector; ^{i}P<0.01, compared with anti-IgG group; ^{l}P<0.01, compared with anti-WTAP group.

影响 Wnt5a/β-catenin 信号通路，从而影响泌乳相关基因的表达。

2.8　CRKL 通过 WTAP-Wnt5a/β-catenin 信号通路改善溴隐亭诱导的大鼠产后缺乳　RT-qPCR 结果显示，在 RMECs 中，与 CRKL 中剂量组相比，CRKL 中剂量+WTAP 过表达组的 CCND1（Fig.8A）、c-Myc（Fig.8B）mRNA 表达水平明显降低（P<0.01）；CRKL 中剂量+WTAP 过表达组的 β-catenin 蛋白表达水平也显著降低（Fig.8C）（P<0.01）。与 CRKL 中剂量组相比，CRKL 中剂量+WTAP 过表达组 FASN（Fig.8D）、CSN2（Fig.8E）、GLUT1（Fig.8F）mRNA 表达水平下调（P<0.01）。这表明 CRKL 通过影响 WTAP 来调节 Wnt5a/β-catenin 信号通路，从而发挥治疗产后缺乳的作用。

3　讨论

母乳喂养不仅给母亲和儿童带来许多健康益处，而且对社会发展也有重要影响。母乳喂养是婴儿获得最佳自然免疫力的来源。纯母乳喂养不仅有利于婴幼儿的生长发育和智力发育，而且有利于母亲增强免疫力、子宫恢复、减少乳腺癌的发生。母乳的营养比例适合婴儿的消化能力需求，这是任何牛奶替代品都无法替代的[36]。

PRL 是垂体前叶产生的多效性激素，参与体内平衡、生殖和泌乳[37]。PRL 在乳腺发育和分化过程中起着关键作用。在哺乳期，PRL 通过刺激

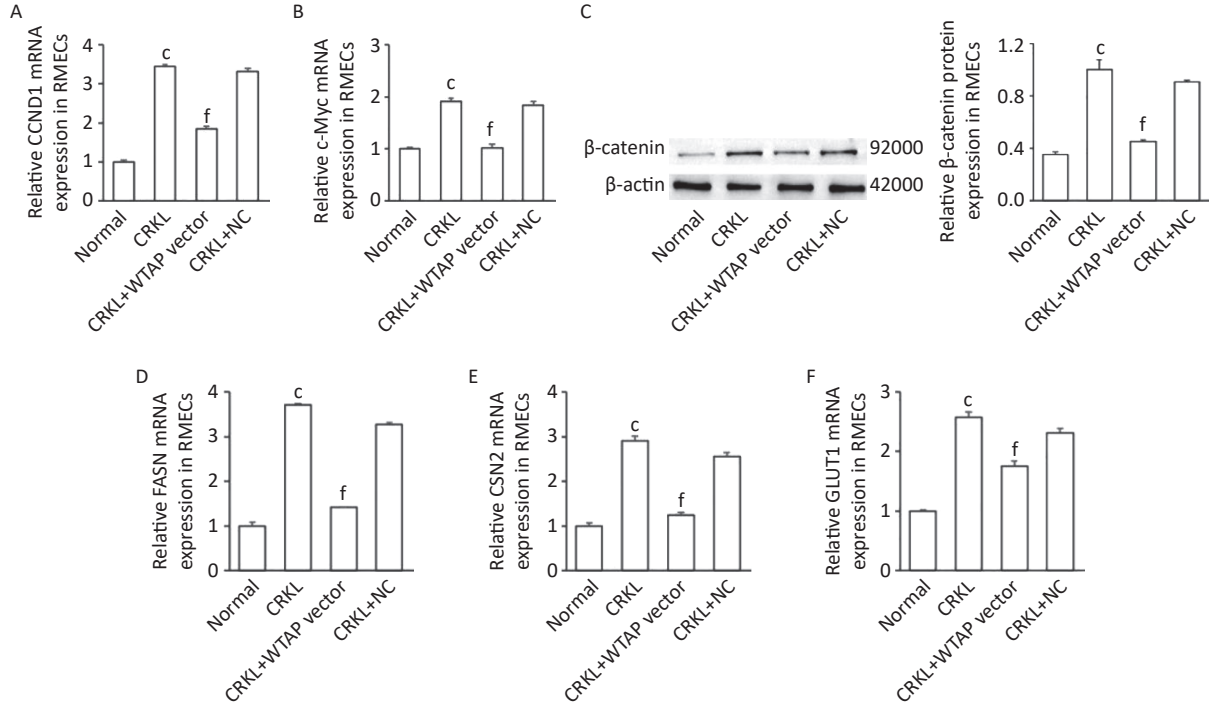


Fig.8 Cuiru Keli improves bromocriptine-induced postpartum hypogalactia in rats via WTAP-Wnt5a-β-catenin pathway ($\bar{x} \pm s$)

The mRNA expression of CCND1 and c-Myc in RMECs were detected by RT-qPCR (A, B). The protein expression of β-catenin in RMECs was detected by WB (C). The mRNA expression of FASN, CSN2, and GLUT1 in RMECs were detected by RT-qPCR (D, E, F) (n=3). ^{c}P<0.01, compared with normal; ^{f}P<0.01, compared with CRKL.

乳蛋白乳糖的合成和分泌以及 MEC 中的其他代谢过程来促进泌乳。PRLR 可以被 PRL、生长激素和胎盘乳糖酶激活[38]。CRKL 治疗后，产后缺乳模型大鼠 MT 中 PRL 水平显著升高，RMECs 中 PRLR mRNA 表达水平升高。

乳蛋白、乳糖和乳脂是评估母乳质量的关键指标[39]。FASN 是从头脂肪酸合成的关键限速酶，在脂肪酸生物合成中起着重要作用。在 RMECs 中，CRKL 都显著提高了乳脂合成相关基因 FASN 的表达，促进了母乳中乳脂的合成。CRKL 显著上调产后缺乳模型大鼠 RMECs 中乳蛋白合成相关基因 CSN2 的表达，显著改善乳蛋白合成。GLUT1 是 MFS 葡萄糖转运蛋白亚家族的成员。由 SLC2A1 编码的 GLUT1 在多种组织细胞中广泛表达，以调节葡萄糖摄取。作为乳糖合成的前体，葡萄糖吸收是控制乳糖合成的最直接方法[40]。CRKL 能有效提高 GLUT1 的 mRNA 表达和蛋白表达水平。

网络药理学实现了基于系统生物学理论的中药综合网络分析，结合疾病的发病机制，系统预测中药的作用靶点，为中药药理学研究提供了科学有效的方法[41]。通过网络药理学预测，Wnt 信号通路是 CRKL 治疗产后缺乳的关键通路。通过进一步的实验验证发现 CRKL 显著上调 Wnt 信号途径中关键基因 CCND1、c-Myc 和 β-catenin 的表达，表明 Wnt/β-catenin 信号通路是 CRKL 治疗产后缺乳的关键途径。

产后缺乳模型大鼠中 WTAP 和 Wnt5a 的异常表达，WTAP 与 Wnt5a 密切相关。进一步的研究表明，CRKL 抑制了模型大鼠 WTAP 的表达。WTAP 过表达后，β-catenin 的表达显著降低，Wnt 信号通路相关基因 CCND1 和 c-Myc 的 mRNA 水平显著降低。此外，FASN、CSN2 和 GLUT1 的 mRNA 表达水平也降低。这些结果表明，CRKL 影响 WTAP-Wnt5a/β-catenin 信号通路，从而发挥治疗作用。

CRKL 治疗产后缺乳疗效良好。王校等[42]发现，CRKL 的主要成分漏芦中的有效成分总甾酮具有明显的催乳作用。薛秋云等[43]的研究表明，CRKL 可使模型大鼠乳腺组织的腺泡体积增大，腺泡体积充盈，可有效提高产后缺乳大鼠的泌乳量，对泌乳有一定的促进作用。基于前期这些研究成果，本研究进一步探究 CRKL 改善产后缺乳的作用机制。本研究通过建立溴隐亭诱导的产后缺乳大

鼠模型并提取其原代细胞，验证了 CRKL 的治疗效果。研究发现 CRKL 激活了产后缺乳模型大鼠 Wnt5a/β-catenin 信号通路。同时，RIP 实验结果表明，WTAP 与 Wnt5a 相互作用。CRKL 抑制 WTAP 进一步激活 Wnt/β-catenin 信号通路促进泌乳。

本研究表明，CRKL 通过影响 WTAP-Wnt5a/β-catenin 信号通路治疗产后缺乳症，为 CRKL 改善产后缺乳的机制提供了新的见解，也为 CRKL 的临床推广提供了理论依据。

参考文献

[1] Chen S, Long M, Li XY, et al. Codonopsis lanceolata polysaccharide ameliorates high-fat diet induced-postpartum hypogalactia via stimulating prolactin receptor-mediated Jak2/Stat5 signaling [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 259(Pt 1): 129114

[2] Zhang Z, Wei Q, Zeng Y, et al. Effect of Hordei Fructus Germinatus on differential gene expression in the prolactin signaling pathway in the mammary gland of lactating rats [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113589.

[3] Hannan FM, Elajnaf T, Vandenberg LN, et al. Hormonal regulation of mammary gland development and lactation [J]. Nat Rev Endocrinol, 2023, 19(1): 46-61.

[4] Karcz K, Królak-Olejnik B. Vegan or vegetarian diet and breast milk composition - a systematic review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(7): 1081-1098.

[5] Nagel EM, Howland MA, Pando C, et al. Maternal psychological distress and lactation and breastfeeding outcomes: a narrative review [J]. Clin Ther, 2022, 44(2): 215-227.

[6] Jalsrai A. , Grecksch G, Becker A. Evaluation of the effects of Astragalus mongholicus Bunge saponin extract on central nervous system functions [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(3): 544-549.

[7] Liu M, Tan H, Zhang X, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of Fufang e'jiao jiang on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(3): 575-584.

[8] Zhu B, Zhang QL, Hua JW, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of Atractylodes macrocephala Koidz. : a review [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 226: 143-167.

[9] Wei WL, Zeng R, Gu CM, et al. Angelica sinensis in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 190: 116-141.

[10] Yu X, Chai JH, Kong XW, et al. Insight of "Yin-Jing" medical property of Ligusticum chuanxiong Hort. via pharmacokinetics and tissue distributions by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314: 116569.

[11] Yang SY, Lin ZX, Xian YF, et al. Traditional uses, chemical compounds, pharmacological activities and clinical studies on the traditional Chinese prescription Yi-Gan San [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 302(Pt A): 115859.

[12] Wang W, Zhang X, Liu Q, et al. Study on extraction and antioxidant activity of Flavonoids from Hemerocallis fulva (Daylily) Leaves [J]. Molecules, 2022, 27(9): 2916.

[13] Olennikov DN. The ethnopharmacological uses, metabolite diversity, and bioactivity of rhaponticum uniflorum (Leuzea uniflora): a comprehensive review [J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1720.

[14] 李红梅. 催乳颗粒及人工按摩治疗产后缺乳临床研究 [J]. 山西中医, 2014, 30(3): 13-14.

[15] 戴媛, 戴姜, 姚玮, 等. 催乳颗粒配合母乳喂养对产褥期产妇母婴健康的影响 [J]. 中国药业, 2018, 27(2): 43-45.

[16] Alexander CM. Wnt signaling and mammary stem cells [J]. Vitam Horm, 2021, 116: 21-50.

[17] Li XZ, Jiang H, Xu L, et al. Sarsasapogenin restores podocyte autophagy in diabetic nephropathy by targeting GSK3β signaling pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 192: 114675.

[18] Fan Y, Li X, Sun H, et al. Role of WTAP in cancer: From mechanisms to the therapeutic potential [J]. Biomolecules, 2022, 12(9): 1224.

[19] Xie W, Liu N, Wang X, et al. Wilms' Tumor 1-Associated Protein contributes to Chemo-Resistance to cisplatin through the Wnt/β-Catenin pathway in endometrial cancer [J]. Front Oncol, 2021, 11: 598344.

[20] Astudillo P. An emergent Wnt5a/YAP/TAZ regulatory circuit and its possible role in cancer [J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 125: 45-54.

[21] Wan X, Guan S, Hou Y, et al. FOSL2 promotes VEGF-independent angiogenesis by transcriptionnally activating Wnt5a in breast cancer-associated fibroblasts [J]. Theranostics, 2021, 11(10): 4975-4991.

[22] Lin M, Wang N, Yao B, et al. Quercetin improves postpartum hypogalactia in milk-deficient mice via stimulating prolactin production in pituitary gland [J]. Phytother Res, 2018, 32(8): 1511-1520.

[23] Miao C, Chang J, Zhang G, et al. CUL4B promotes the pathology of adjuvant-induced arthritis in rats through the canonical Wnt signaling [J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(6): 495-511.

[24] Wang X, Chang J, Zhou G, et al. The Traditional Chinese Medicine Compound Huangqin Qingre Chubi Capsule inhibits the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis through the CUL4B/Wnt pathway [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 750233.

[25] James N, Kini S, Pai S, et al. Comparative evaluation of corneal storage medias used as tooth avulsion medias in maintaining the viability of periodontal ligament cells using the cell counting Kit-8 assay [J]. Clin Cosmet Investig Dent, 2022, 14: 87-94.

[26] Zhang L, Xiao Y, Yang R, et al. Systems pharmacology to reveal multi-scale mechanisms of traditional Chinese medicine for gastric cancer [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 22149.

[27] Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards Suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30. 1-1.30. 33.

[28] 胡元佳, 张岱岩. 中医药网络药理研究的瓶颈问题 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2023, 37(S1): 3-4.

[29] Zhang J, Zhou Y, Ma Z. Multi-target mechanism of Tripteryguim wilfordii Hook for treatment of ankylosing spondylitis based on network pharmacology and molecular docking [J]. Ann Med, 2021, 53(1): 1090-1098.

[30] Fan C, Wu FR, Zhang JF, et al. A network pharmacology approach to explore the mechanisms of Shugan Jianpi formula in liver fibrosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2020: 4780383.

[31] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-61.

[32] Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, et al. GROMACS: fast, flexible, and free [J]. J Comput Chem, 2005, 26(16): 1701-1718.

[33] Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities [J]. Expert Opin Drug Discov, 2015, 10(5): 449-461.

[34] Bhattarai DP, Aguilo F. m6A RNA immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing to map N6-methyladenosine [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2404: 355-362.

[35] Zhang Y, Xu G, Zhang L, et al. Development of a double monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting canine distemper virus [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(24): 10725-10735.

[36] Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, et al. Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health [J]. Nutrients, 2020, 12(4): 1039.

[37] Le Tissier PR, Hodson DJ, Martin AO, et al. Plasticity of the prolactin (PRL) axis: mechanisms underlying regulation of output in female mice [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 846: 139-162.

[38] Kavarthapu R, Anbazhagan R, Dufau ML. Crosstalk between PRLR and EGFR/HER2 signaling pathways in breast cancer [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(18): 4685.

[39] Osorio JS, Lohakare J, Bionaz M. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation [J]. Physiol Genomics, 2016, 48(4): 231-256.

[40] Yadav P, Singh DD, Mukesh M, et al. Expression profiling of glucose transporter 1 (GLUT1) and apoptotic genes (BAX and BCL2) in milk enriched mammary epithelial cells (MEC) in riverine buffalo during lactation [J]. Anim Biotechnol, 2014, 25(3): 151-159.

[41] Liu YY, Yu LH, Zhang J, et al. Network pharmacology-based and molecular docking-based analysis of Suanzaoren decoction for the treatment of Parkinson's disease with sleep disorder [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1752570.

[42] 王校, 薛秋云, 黄玉蓉, 等. 禹州漏芦总甾酮对缺乳模型大鼠的催乳作用及分子机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(2): 121-128.

[43] 薛秋云, 黄玉蓉, 李慧, 等. 催乳颗粒通过分泌 Frizzled 相关蛋白 2-Wnt/β-catenin 信号通路改善大鼠产后缺乳 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2024, 55(3): 619-629.

Cuiru Keli improves bromocriptine-induced postpartum hypogalactia in rats by regulating the WTAP-Wnt5a-β-catenin signaling axis

LI Hui[1], XUE Qiuyun[1], YUAN Meiling[1], JIN Qiying[1], CHEN Jiaqing[1], XIA Aixin[1], XU Chenhao[2,3], MIAO Chenggui[1,2,3,4]

[1] Department of Pharmacology, School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China; [2] Center for Xin'an Medicine and Modernization of Traditional Chinese Medicine of IHM, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China; [3] Experimental (Training) Teaching Center, School of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, Anhui, China; [4] School of Chinese Medicine, Li Ka Shing Faculty of Medicine, University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

ABSTRACT **AIM**: To study the effect and mechanism of Cuiru Keli (CRKL) on bromocriptine-induced postpartum hypogalactia in rats. **METHODS**: ELISA was used to detect the level of prolactin (PRL) in mammary tissue (MT) of postpartum hypogalactia. Cultivate rat mammary epithelial cells (RMECs) in vitro. The effect of CRKL on RMEC proliferation was detected by CCK8 method to determine the drug-containing serum. RT-qPCR and immunofluorescence detection of lactose, milk fat, and milk protein related gene expression. Network pharmacology predicts the signaling pathway of CRKL treatment for postpartum hypogalactia. Molecular docking and molecular dynamics verification of the binding between key components of CRKL and WTAP. RIP was used to study the interaction between WTAP and Wnt5a. RT-qPCR and Western blot were used to investigate the regulatory mechanism of CRKL on the Wnt/β-catenin signaling pathway. **RESULTS**: CRKL significantly increased the hourly milk production of female rats (P<0.05 or P<0.01). CRKL increases PRL levels in MT of model rats (P<0.01). Serum containing CRKL promotes the expression of PRLR, FASN, CSN2, and GLUT1 (all P<0.05 or P<0.01). Network pharmacology predicts a high correlation between the Wnt/β-catenin signaling pathway and CRKL treatment for postpartum hypogalactia. And the serum containing CRKL promotes the expression of key genes CCND1, c-Myc, and β-catenin in the Wnt signaling pathway (all P<0.05 or P<0.01). Molecular docking and molecular dynamics indicate that the key component of CRKL has strong binding ability with WTAP. Overexpression of WTAP in RMECs interferes with the function of CRKL (P<0.01). **CONCLUSION**: CRKL improves bromocriptine-induced postpartum hypogalactia in rats through the WTAP-Wnt5a-β-catenin signaling axis.

KEYWORDS Cuiru Keli; postpartum hypogalactia; WTAP; Wnt5a; prolactin