

补肾法对再生障碍性贫血疗效及对 Th17/Treg 相关转录因子水平的影响^{*}

胡令彦¹, 胡明辉^{1△}, 周永明¹, 陈英坤²

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院血液科, 上海 200337;

2. 浙江省杭州市萧山区第一人民医院血液科, 浙江 杭州 311200)

摘要:目的 研究补肾法对再生障碍性贫血疗效及对 Th17/Treg 相关转录因子水平的影响。方法 收集 91 例再生障碍性贫血患者为治疗组,辨证分为肾阴虚组,肾阳虚组,肾阴阳两虚组,用补肾方治疗。30 例为对照组。统计 2 组有效率差异。同时采用 RT-PCR 方法检测 2 组治疗前后 FOXP3mRNA,IL-17AmRNA,ROR- γ tmRNA 水平并比较。结果 中医证候疗效治疗组优于对照组。治疗组 ROR- γ t mRNA 治疗前高于治疗后,FOXP3 mRNA 治疗前低于治疗后(有统计学意义)。对照组 IL-17A mRNA 治疗后低于治疗前。不同肾虚分型转录因子较治疗前明显变化,肾阴虚组 IL-17A mRNA 水平治疗后无明显下降。结论 补肾法治疗再生障碍性贫血提高了中医证候有效率。补肾法疗效可能与干预 Th17/Treg 相关转录因子有关。

关键词: 再生障碍性贫血; 白细胞介素-17; 维甲酸相关孤儿受体; 叉头状转录因子 3; 补肾法; 信使核糖核酸

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2015)02-0001-05

再生障碍性贫血(aplastic anemia,简称 AA)是一种以骨髓造血功能衰竭,全血细胞减少为特征的血液系统疾病。目前很多数据证明,AA 的发生与免疫机制紊乱有关,特别是 T 细胞免疫功能,其功能异常在 AA 的疾病发生发展过程中被证明有着重要作用^[1-2]。根据中医理论,人的血液与心、肝、脾、肺、肾等脏器均有关系,但与肾关系尤其密切。肾虚证是目前公认的再生障碍性贫血的基本证型。补肾法治疗再生障碍性贫血的疗效及其机制细胞因子,信号通路方面及 T 细胞免疫紊乱方面被不断深入研究。

CD4+T 细胞主要是辅助性 T (T helper cells, Th)细胞,CD4+T 细胞亚型中以分泌白细胞介素-17 为主要特征的细胞是 Th17 细胞。CD4+CD25+Treg 细胞是与多种免疫紊乱性疾病^[3]的发病有关的 T 细胞亚群之一。近年研究证实了 Th17 及 Treg 两者的失调对再生障碍性贫血的致病作用。Treg 细胞和 Th17 细胞的效应是通过其细胞比例的变化,所分泌细胞因子的相互制约及反馈调节,形成一个复杂的

网络。当免疫系统状态稳定时,细胞因子 TGF- β 1 促使表达 FOXP3 的 CD4+CD25+Treg 产生,该细胞可以抑制炎症反应,对自身免疫性疾病有抑制功能^[4]。发生感染或其他因素刺激后,免疫系统产生的细胞因子 IL-6 与 TGF- β 1 共同诱导 Th17 的分化,分泌 IL-17,同时可以抑制 Treg 的生成^[5]产生炎症促进作用。已知调节性 T 细胞和效应 T 细胞之间的平衡制约失调与再障发病密切相关,其影响因素除了上述细胞因子之外,转录因子也在其中有重要作用。本课题应用补肾法治疗 AA,针对补肾法对 AA 的中医疗效以及其对 Treg,Th17 相关转录因子 FOXP3mRNA (叉头状转录因子 3,fork head transcription factor 3),IL-17AmRNA,ROR- γ tmRNA(维甲酸相关孤儿受体,retinoid related orphan nuclear receptor)的影响作一探究。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 2012.1-2014.12 的门诊及病房的 AA 患者病例,

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金(81001510);国家中医药管理局中医临床研究基地业务建设科研专项基金(JDZX2012179)

收稿日期: 2015-01-20

作者简介: 胡令彦(1981-),女,上海人,博士,主要从事中医血液病临床及实验室研究工作。

△通信作者: 胡明辉, hmhui.com@163.com

诊断及入排标准按照《血液病诊断及疗效标准》(第 3 版)^[6] 中的非重型再障和重型再障 II 型再障相关标准。中医辨证分型按照中国中西医结合研究会(血液病专业委员会)三届二次学术会议拟定的辨证分型标准,症状积分量化表参看 2002 年《中药新药临床研究指导原则》^[7] 中的分型标准(包含主症、次症、舌脉象、有心悸、头晕、乏力、面色苍白、盗汗、出血、形寒肢冷、腰膝酸软、低热、手足心热、口渴、大便干结、性功能减退、便溏等 13 个症候,分轻中重,分别记为 1,2,3 分,各证候评分总和记为证候总分)。

检测患者转录因子水平共 91 例,其中男性患者 42 例,女性患者 49 例,年龄范围 12~65 岁,平均年龄为(37.57±13.98)岁,病程范围为 0.1~17 年,平均病程是(3.24±3.45)年,血常规为白细胞(2.74 ± 1.22) $\times 10^9/L$,血红蛋白(69.61 ± 29.73)g/L,血小板(30.66 ± 45.56) $\times 10^9/L$,中性粒细胞(1.15 ± 0.83) $\times 10^9/L$ 。其中肾阳虚组 36 例,肾阴虚组 25 例,肾阴阳两虚组 30 例。

1.2 治疗方法

治疗组:用补肾基础方(黄芪 24g,菟丝子 24g,女贞子 15g,太子参 15g,制半夏 10g,小蓟草 15g,白术芍 15g,炒丹皮 15g,炒枳壳 10g,炙甘草 6g)治疗,肾阴虚型加生地、黄柏、鳖甲等;肾阳虚型加补骨脂、淫羊藿等;肾阴阳两虚型加杜仲、制首乌、熟地、桑寄生等。

对照组:环孢素(50mg/粒)5mg/(kg·d),分 3 次服用,调整环孢素浓度在 200~400ng/mL 范围。安雄(40mg/粒)每日 3 次,每次 40mg。

若合并感染、出血或重度贫血时给予抗生素、止血药、输注红细胞悬液或单采血小板。疗程均为 2 个月。

1.3 检测方法

检测指标:分别检测治疗组及对照组治疗前后及正常组外周血 Treg、Th17 相关转录因子 FOXP3mRNA,IL-17AmRNA,ROR- γ tmRNA 水平。

1.3.1 白细胞 RNA 提取

治疗组和对照组清晨空腹采集静脉血 5mL,加入 EDTA 抗凝,采用 PBS 1:1 稀释后,密度梯度离心分离外周血单个核细胞,细胞计数后,调整溶液细胞浓度至 $2 \times 10^7/mL$,离心后弃上清,得到总外周血单个核细胞。然后将细胞打散后加入 1.0mL Trizol

溶液,充分吹打混匀。于 22℃ 下放置 5min;然后加入三氯甲烷 0.2mL,颠倒振摇 15 秒;于 22℃,静置 3min;采用 14 000r/min 离心机于 4℃ 离心 15min;分取上清液 0.5mL;加入 0.5mL 异丙醇,颠倒混匀;再于 22℃ 下静置 10min;再次离心 10min(4℃ $\times 14\ 000$ r/min);弃去上清液;固形物中加入 1mL 冷 75%乙醇(4℃);再次离心 5min(4℃ $\times 10\ 000$ r/min);弃去上清液,真空干燥 5min;用 40 μ L 焦碳酸二乙酯处理水溶解,-80℃ 保存。

1.3.2 RT-PCR 测定

1.3.2.1 RNA 浓度测定

取上述外周血单个核细胞 RNA 样本 5 μ L,加入双蒸水 1mL。采用双蒸水为对照。在 260nm 和 280nm 测得吸光度(OD 值),当 260nm 与 280nm 的吸光度比值在 1.8 与 2.0 之间(表明 RNA 中基本不含有蛋白质)时,以 OD₂₆₀ 值按下式计算样本 RNA 含量(当 OD₂₆₀ 为 1 时,RNA 为 40 μ g):

样品总 RNA 含量(μ g/ μ L)=OD₂₆₀ $\times$ 稀释倍数 $\times 40/1000$

1.3.2.2 RNA 反转录

取上述外周血单个核细胞 RNA 样本 1 μ L,加入 4 种 dNTP(每种 dNTP 10mmol/L)各 1 μ L 和 1 μ L 随机引物(100 μ mol/L),加水至 12 μ L。升温至 65℃ 保温 5min;然后快速插入冰水中,离心,在冰上分别加入 4 μ L 5 $\times$ 缓冲液、2 μ L DTT(100mmol/L)、1 μ L RNAsin(40U/ μ L)和 1 μ L M-MLVRT 反转录酶(200U/ μ L);再次升温至 37℃ 保温 50min,最后升温至 70℃ 保温 15min,灭活逆转录酶。于-20℃ 保存。

1.3.2.3 PCR 扩增

取上述 2 μ L 反转录产物,加入 10 μ L Sybr green、上游引物(5 μ mol/L)1 μ L 和下游引物(5 μ mol/L)1 μ L,然后加水至 20 μ L。PCR 反应参数为 95℃ 预变性 10s;95℃ 变性 5s,60℃ 退火 20s,40 个循环;采用 $\Delta\Delta$ CT 法分析目的基因的相对表达量。

引物序列:IL17A 上游引物 CATGAACCTCTG-TCCCCATCC,下游引物 CCCACGGACACCAGTAT-CTT,扩增长度 102bp;FOXP3 上游引物 AAG-GAAAGGAGGATGGACG 下游引物 GGCAGGCAA-GACAGTGGA,扩增长度 125bp;ROR γ 上游引物 CCTGGGCTCCTCGCCTGACC,下游引物 TCTCTC-TGCCCTCAGCCTTGCC,扩增长度 169bp;GAPDH 为内参,上游引物 ATGGGGAAGGTGAAGGTCC 下游

引物 GGGGTCATTGATGGCAACAATA, 扩增长度 108bp。

1.4 统计方法

采用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。等级资料采用 Kruskal Wallis 检验。当计量资料为正态分布时, 采用 t 检验, 数据表示采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 方式; 若计量资料为非正态时, 使用非参数检验进行分析, 其中 2 组比较采用 U 检验, 采用 H 检验进行多组比较 (多组秩和检验), 数据采用四分位数 [M(Q1, Q3)] 表示。 P 值小于 0.05 判断为有统计学意义。

2 结果

2.1 临床疗效比较

根据治疗组及对照组的中医证候积分及血常规水平比较后分析结果提示治疗组有效率明显高于对照组, 其中肾阳虚组有效率较肾阴虚组及肾阴阳两虚组高 (见表 1)。

表 1 不同肾虚组及对照组临床疗效比较

组别	n	临床治愈	显效	有效	无效	总有效率/%
肾阴虚	25	1(4)	5(20)	11(44)	8(32)	68.00
肾阳虚	36	0(0)	6(16.67)	20(55.56)	10(27.78)	72.22 [△]
肾阴阳两虚	30	1(3.33)	6(20)	17(56.67)	6(20)	80.00 [△]
对照组	30	0(0)	2(6.67)	16(53.33)	8(26.67)	60.00*

注: 与治疗组比较, * $P<0.05$; 与肾阴虚组比较, $^{\Delta}P<0.05$

2.2 各组治疗前后中医症状积分变化比较

统计各组治疗前后症状积分水平, 治疗后症状积分, 肾阳虚组及肾阴阳两虚组明显低于治疗前, 肾阴虚组症状积分与治疗前比较无统计学差异 (见

表 2)。其中积分有统计学差异的症状有乏力、苍白、形寒、腰酸、低热、手足心热、便干、便溏等 8 个症候。对照组治疗前后差异不明显。

表 2 不同肾虚组临床证候积分治疗前后比较

时间	治疗组(91)			对照组 (30)
	肾阴虚 (25)	肾阳虚 (36)	肾阴阳两虚 (30)	
治疗前	17.00 $\pm$ 5.12	16.94 $\pm$ 4.21	19.30 $\pm$ 4.50	17.77 $\pm$ 4.12
治疗后	10.00 $\pm$ 5.30	8.97 $\pm$ 3.97*	7.60 $\pm$ 3.41*	13.10 $\pm$ 4.34

注: 与治疗前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (表中组名后括号内为例数)

2.3 AA 患者 Th17 和 Treg 细胞相关转录因子水平比较

比较治疗组及对照组治疗前后转录因子水平, 提示治疗组 ROR- γ t mRNA 治疗前高于治疗后, FOXP3 mRNA 治疗前低于治疗后 (有统计学意义)。对照组 IL-17A mRNA 治疗后低于治疗前, 其余差异无统计学意义。治疗后 ROR- γ t mRNA 的降低程度, 及 FOXP3 mRNA 升高程度明显高于对照组 (见表 3)。

2.4 中医不同肾虚证型转录因子表达比较

分析 91 例不同分组的各转录因子水平, 其中治疗前 ROR- γ t mRNA 在肾虚组间比较有差异 (肾阴虚组 > 肾阳虚组 > 肾阴阳两虚组) ($P<0.05$)。FOXP3mRNA, IL-17A mRNA 转录因子在各分型内无差异 ($P>0.05$)。治疗后除肾阴虚组的 IL-17A mRNA 水平与治疗前无明显变化。FOXP3mRNA 各组均高于治疗前, ROR- γ t mRNA 在各组均较治疗前降低。肾阳虚及肾阴阳两虚 2 组 IL-17A mRNA 水平亦较治疗前降低 (见表 4)。

表 3 2 组治疗前后转录因子水平变化比较

组别	n		ROR- γ t mRNA	FOXP3 mRNA	IL-17A mRNA
治疗组	91	治疗前	0.61(0.31, 1.40) $^{\Delta\Delta\Delta}$	0.57(0.22, 1.51) $^{\Delta}$	0.75(0.22, 1.76) $^{\Delta\Delta\Delta}$
		治疗后	0.43(0.22, 0.77)***	1.11(0.81, 2.72)***	0.40(0.09, 1.71)*
对照组	30	治疗前	0.38(0.15, 0.82) $^{\Delta\Delta\Delta}$	0.54(0.32, 1.76) $^{\Delta}$	0.52(0.15, 0.96) $^{\Delta\Delta\Delta}$
		治疗后	0.32(0.18, 0.84)	0.56(0.15, 1.02)	0.38(0.11, 0.92)*
正常	30		0.23(0.12, 0.37)	0.90(0.64, 1.59)	0.03(0.01, 0.12)
Z			-4.250	-2.095	-5.432
P			0.000	0.036	0.000

Mann-Whitney U 注: 与正常组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$; 与治疗前比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; 与对照组比较, * $P<0.05$

表 4 AA 患者不同肾虚分型治疗前后 ROR- γ t mRNA, FOXP3mRNA, IL-17AmRNA 水平比较

组别	n		FOXP3mRNA	IL-17A mRNA	ROR- γ tmRNA
肾阴虚	25	治疗前	0.65(0.31, 1.90)	0.77(0.42, 3.45)	0.94(0.38, 2.61)
		治疗后	1.34(0.83, 3.04)***	0.72(0.06, 3.09)	0.70(0.33, 0.84)***
肾阳虚	36	治疗前	0.60(0.21, 1.63)	0.68(0.27, 1.59)	0.64(0.37, 1.64)
		治疗后	1.07(0.89, 2.70)***	0.44(0.10, 1.95)***	0.46(0.26, 0.72)***
肾阴阳两虚	30	治疗前	0.41(0.25, 1.00)	0.65(0.19, 1.78)	0.42(0.22, 0.85)*
		治疗后	0.99(0.78, 2.04)***	0.18(0.18, 1.43)**	0.34(0.20, 0.57)***
χ^2			-4.372	-1.079	-4.372
P			0.000	0.088	0.000

Kruskal-Wallis test 注:与治疗前比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

再生障碍性贫血从肾论治,已经得到较多的研究及结果。《医学正传》指出:盖虚劳之证,必始于肾^[8]。肾主藏精,精血同源,肾精不仅可以化生为肾气,也能够化生为血液。故而血的生成与肾精关系密切。中医补肾治法对再障的疗效机制在此环节中值得深入研究。补肾中药可以刺激骨髓造血,调节部分激素水平的变化,如肾上腺皮质激素,皮质醇等的水平。调节免疫紊乱,保护血细胞及改善血细胞环境,刺激骨髓造血功能的作用。如菟丝子补肾益精,阴阳并补,能提高大鼠血细胞数量及活力,提高对缺氧的耐受性,女贞子,入肾,补精,除热之要品,能提升白细胞,增强网状内皮系统吞噬能力,增强免疫。补肾以填髓生血,化生气血,是治疗再生障碍性贫血基本法则。本方以菟丝子、女贞子为补肾要药,配合黄芪,太子参,白术扶正益气、制半夏、白芍,枳壳和胃。小蓟草、炒丹皮凉血止血、炙甘草调和诸药,肾阴虚型加生地、黄柏、鳖甲滋阴生精;肾阳虚型加补骨脂、淫羊藿温肾填精助阳;肾阴阳两虚型加杜仲、制首乌、熟地、桑寄生阴阳双补,补肾生血。本实验结果提示,补肾法治再生障碍性贫血,其中医证候改善程度高于对照组,对于症状积分方面的降低较明显。有统计学差异的症状有乏力、苍白、形寒、腰酸、低热、手足心热、便干、便溏。提示肾阴虚组与肾阳虚组在临床证候上有明显差异,肾阳虚组有效率较肾阴虚组及肾阴阳两虚组高,补肾法对于 AA 的症状改善能提高患者生活质量,对缺氧的耐受能力,减少并发症,为稳定血象,提高缓解率起到关键性作用。

CD4+CD25+Treg 细胞的免疫表型为细胞膜蛋白 CD4 和 CD25 及细胞转录因子^[9-10], CD25+的 T 细

胞中只有高表达 CD25 (CD25^{high})T 细胞以及 FOXP3+,即表达细胞内转录因子 FOXP3 的 T 细胞才具有防止免疫亢进,防止自身免疫损伤的功能^[11]。缺乏 FOXP3 的功能性表达将导致胸腺 T 细胞不能正常发育为 Treg 细胞反而转化成为反应性 T 细胞,从而发生攻击自身抗原而产生严重的自身免疫性疾病^[12]。活化的 CD4+T 细胞经 Th17 细胞的特异性转录因子 ROR- γ t 刺激后^[13],分化为 Th17 细胞^[14]。ROR- γ t 基因缺失的小鼠体内 Th17 细胞急剧减少,可见 ROR- γ t 缺陷的初始 T 细胞无法分化为 Th17 细胞,若过表达 ROR- γ t,则抑制 Th1 和 Th2 细胞分化,促进 T 细胞向 Th17 方向转化^[15]。因此通过 FOXP3 及 ROR- γ t 及 IL-17A 转录因子水平的比较,能反应 Treg 及 Th17 细胞的变化在再障发病中的作用。本课题组曾研究了再障患者 Th17/Treg 细胞比例,提示其比例失调主要原因在于 Th17 及其相关细胞因子的变化,但本研究提示转录因子的差异亦较为明显。首先治疗前,统计患者转录因子 ROR- γ tmRNA 及 IL-17AmRNA 水平与正常组比较明显高于正常组,FOXP3mRNA 低于正常组,提示在 AA 的 Th17/Treg 失衡中,转录因子水平有较明显的异常,与发病有一定关系。治疗后,治疗组 ROR- γ tmRNA 受到下调,FOXP3 mRNA 受到上调,对于 IL-17A mRNA 表达水平,对照组用药后有所下调,对照组 ROR- γ tmRNA 及 FOXP3 mRNA 治疗前后变化无统计学差异。其次,从不同肾虚分型分别统计转录因子在用药前后差异,提示补肾法治后,肾阳虚与肾阴阳两虚组在三种转录因子的变化上结果均有统计学差异,补肾治疗能够下调 ROR- γ tmRNA 表达,上调 FOXP3 mRNA 表达,下调 IL-17mRNA 表达,从而调整 Treg 与 Th17 细胞比例。肾阴虚组在 IL-

17AmRNA 方面改善不明显,考虑肾阴虚中医有效率较肾阳虚及肾阴阳两虚组低可能与此有关,不能排除其他相关转录因子的抑制作用同时存在,不同肾虚型的发病机制可能存在于不同环节中。

此次研究显示补肾法治疗能对 AA 的 Th17/Treg 相关转录因子有干预作用,对 Treg 相关的 FOXP3 mRNA 及 Th17 相关的 ROR γ tmRNA 有明显的调节作用,两者在不同肾虚分型之间及治疗前后比较亦有差异。可见补肾法对于 AA 治疗的机制之一可能是通过调节了 Th17, Treg 细胞相关的转录因子,从而使细胞因子的分泌产生变化,制约了 Th17/Treg 的失衡,进一步使细胞因子水平发生变化,从而改变预后,结合既往对细胞因子干预的研究,提示补肾法的疗效机制可能与多个环节有关,不同证型间可能有较大差异,值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 周霁祥,王志恒,于材声. 中西医结合治疗再生障碍性贫血[J]. 中国中西医结合杂志,1992,12(9):555.
- [2] 刘希民,孙晓明. 再生障碍性贫血患者骨位抗原和凋亡率测定及意义[J]. 临床血液学杂志,1999,12(4):149-150.
- [3] Young N S. Acquired aplastic anemia[J]. JAMA,1999,282(3):271-278.
- [4] Le NT,Chao N. Regulating regulatory T cells[J]. Bone Marrow Transplant,2007,39(1):1-9.
- [5] Young N S,Calado R T,Scheinberg P,et al. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia[J]. Blood,2006,108(8):2509-2519.
- [6] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 北京:科学出版社,

1998:19-21.

- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:178-179.
- [8] 宋兴武. 中医从肾论治慢性再生障碍性贫血近况[J]. 云南中医中药杂志,2008(29):50-52.
- [9] 王敏,王宁玲,王会平,等. 儿童再生障碍性贫血 Th17 细胞及相关因子表达研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2011,6(16):248-251.
- [10] Yu S,Liu C,Li L,et al. Inactivation of Notch signaling reverses the Th17/Treg imbalance in cells from patients with immune thrombocytopenia[J]. Lab Invest,2014,8(12):1038-1042.
- [11] Potekhina AV,Pylaeva E,Provatorov S,et al. Treg/Th17 balance in stable CAD patients with different stages of coronary atherosclerosis[J]. Atherosclerosis,2014,238(1):17-21.
- [12] Ramsdell F. FOXP3 and natural regulatory T cells:key to a cell line-age[J]. Immunity,2003,19(2):165-168.
- [13] Wang C,Liu X,Peng Q,et al. Role of Foxp3/Treg and ROR γ /Th17 cell imbalance in rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue. 2014,26(12):860-864,2091-2096.
- [14] Kom T,Betelli E,Oukka M,et al. IL-17 and Th17 cells[J]. Annu Rev Immunol,2009,27:485-517.
- [15] LaPan P,Zhang J,Pan J,et al. Quantitative optimization of reverse transfection conditions for well siRNA library screening[J]. Assay Drug Dev Technol,2008,6(5):683-691.

(编辑:杨阳)

Effect of the Tonifying Kidney Treatment Method on the Peripheral Levels of Th17 /Treg Cell-Associated Transcription Factors in Aplastic Anemia

HU Ling-yan¹, HU Ming-hui^{1Δ}, ZHOU Yong-ming¹, CHEN Ying-kun²

(1. Department of Hematology, Yueyang Hospital of integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Department of Hematology, Zhejiang Province in Xiaoshan District of Hangzhou city first people's Hospital, Hangzhou 311200, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effectiveness of the tonifying kidney treatment in those patients with aplastic anemia and the effect to the peripheral levels of Th17 /Treg cell-associated transcription factors. **Methods** Collect 91 patients with CAA and divided them into the treatment group and control group. The treatment group was divided into SHENYINXU group, SHENYANGXU group and SHENYINYANGLIANGXU group treated them with method of tonifying kidney. 30 patients were divided to control group and count the effective rate. RT-PCR was used to test the serum levels of FOXP3mRNA, IL-17AmRNA, ROR- γ tmRNA Before and after treatment. **Results** After treatment, the effect of symptoms and signs of treatment group was better than that in the control group. After treatment, the level of ROR- γ tmRNA In treatment group was lower than after treatment and the FOXP3 mRNA was higher. the level of IL-17a mRNA in control group decreased after treatment. Th17 /Treg cell-associated transcription factors in different SHENXU groups varied after treatment. There was no significant decrease in The level of IL-17a mRNA in SHENYINXU group. **Conclusion** The method of BUSHEN in the CAA increased The effect of symptoms and signs. The effect of BUSHEN may rise by the Th17 /Treg cell-associated transcription factors.

KEY WORDS: aplastic anemia; interleukin-17; ROR- γ ; FOXP3; tonifying kidney treatment; mRNA