

运动诱导肌源性 IL-6 基因表达和蛋白释放与 GLUT4 基因表达的关系研究

唐 晖¹, 谢敏豪², 周 亮¹, 宋 钢³

(1. 湖南科技大学 体育学院, 湖南 湘潭 411201; 2. 北京体育大学 运动人体科学学院, 北京 100084;
3. 广西师范大学 体育学院, 广西 桂林 541004)

摘要:目的: 研究不同肌糖原状态下运动诱导肌源性白细胞介素 6 (Interukin-6, IL-6) 表达及蛋白释放与葡萄糖转运体 4 (Glucose Transport 4, GLUT4) 基因表达的关系。方法: 通过特定的运动方案和饮食方案造成大鼠在运动前体内肌糖原含量不同, 再观察定量负荷跑台运动后肌源性 IL-6 表达及释放与葡萄糖转运体 GLUT4 基因表达的变化规律。结果: 血清 IL-6 浓度在运动 30min 后显著增加, 运动 120min 后达到峰值, 运动后逐渐降低; 骨骼肌 IL-6mRNA 在运动 120min 后显著增加, 运动后 3-6h 继续增加至峰值; 骨骼肌 GLUT4mRNA 在运动时并未增加, 而在运动后 3h 开始增加, 运动后 6h 达到峰值。上述三个指标在低肌糖原组的增加与正常糖原组相比更加显著。结论: 低肌糖原含量可以促进运动中 IL-6 的释放及运动后恢复期 IL-6 和 GLUT4 的基因表达; 运动导致恢复期 GLUT4 基因表达的增加很有可能与肌源性 IL-6 的表达及 IL-6 的自分泌作用有关。

关键词: 运动内分泌; 肌糖原; 运动; 肌源性 IL-6; GLUT4mRNA

中图分类号: G804.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-520X(2009)10-0040-05

Relation between exercise-induced muscle-derived IL-6 gene expression and protein release and GLUT4 gene expression

TANG Hui¹, XIE Min-hao¹, ZHOU Liang², *et al*

(1. P. E. Dept., Hunan Univ. of Science & Tech., Xiangtan411201, China;

2. Dept. of Exercise Human Science, Beijing Sport Univ., Beijing100084, China)

Abstract: This paper was to research into the relation between exercise-induced muscle derived IL-6 gene expression and protein release and GLUT4 gene expression in the different states of skeletal muscle glycogen caused by special glycogen and meal projects. Changes of muscle-derived IL-6 gene expression and protein release as well as GLUT4 gene expression after treadmill exercise were monitored. It was seen that serum IL-6 concentration increased in the groups of exercise in 30 minutes, then peaked in the groups of exercise in 120 minutes and decreased gradually after exercise. IL-6mRNA of skeletal muscles increased in the groups of exercise in 120 minutes, then peaked in the groups of post-exercise in three to six hours. GLUT4mRNA of skeletal muscles did not increase in the groups of exercise. However, it increased in the groups of post-exercise in three hours, then peaked in the groups of post-exercise in six hours. Compared with the normal glycogen groups, the three above indicators increased more significantly in the low muscles glycogen groups. It could be concluded that low muscle glycogen content could induce the release of IL-6 and GLUT4 in the recovery period after exercise. It was likely that exercise-induced increase of GLUT4 gene expression in the recovery period after exercise was related with auto-secretion of IL-6.

Key words: exercise secretion; glycogen of skeletal muscles; exercise; muscle-derived IL-6; GLUT4mRNA

收稿日期: 2009-06-15; 修回日期: 2009-08-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570897) 资助; 湖南省体育学会立项课题(07-45) 资助。

第一作者简介: 唐晖(1973-), 男, 湖南邵阳人, 博士, 副教授, 研究方向: 运动内分泌。

已有大量文献报道, 剧烈运动后, 循环血 IL-6 浓度及骨骼肌 IL-6 基因转录显著增加^[1-3]。同时, 肌糖原含量是运动引起骨骼肌 IL-6 基因表达增加的关键触发因素^[4-5]。众多文献表明肌源性 IL-6 对于调节运

运动中及运动后的糖代谢具有重要作用, 如刺激骨骼肌对血液葡萄糖的摄取增加。然而, 肌源性 IL-6 是通过何种机制增加骨骼肌对血液葡萄糖的摄取, 尚不清楚。本文通过特定的实验模型模拟运动前不同肌糖原状态, 探讨在此状态下机体运动时肌源性 IL-6 与骨骼肌葡萄糖转运体 GLUT4 基因表达的变化规律, 从而揭示肌源性 IL-6 促进骨骼肌摄取葡萄糖的机制, 为运动训练实践提供实验依据和理论指导。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF/VAF 级的雄性 SD 大鼠, 体重 $180 \pm 13\text{g}$, 购自中南大学湘雅医学院试验动物中心, 质量合格证编号: NO 0059278。所有动物运动前均喂食标准啮齿动物维持期饲料, 自由进食和饮水。动物分为空白对照组和运动前低肌糖原组、运动前正常肌糖原组三个大组, 后面两个大组又分别分为安静对照组、运动 30min 组、运动 2h 组、运动 2h 后恢复 3h 组和运动 2h 后恢复 6h 组 5 个小组。每组 8 只。

1.2 运动方式

1.2.1 糖原消耗运动

各组大鼠(空白对照组除外)运动 4 次, 每次 30min, 每次间歇 3min, 总运动时间为 120min, 前三次跑台速度为 $18\text{m}/\text{min}$, 第 4 次(最后一次)跑台速度为 $30\text{m}/\text{min}$ 。坡度为 0° 。

1.2.2 定量负荷运动

糖原消耗运动后 24h, 各组大鼠(空白对照组和安静对照组除外)进行定量负荷运动, 速度恒定为 $18\text{m}/\text{min}$, 坡度为 0° , 运动时间根据分组而定, 分别为 30min 或 2h。

1.3 膳食方案

运动后恢复期一天内, 正常膳食组喂食标准饲料, 低糖膳食组大鼠喂食特殊配制的低糖饲料。在正常膳食组饮水中加入蔗糖, 其浓度为 5%; 低糖膳食组饮用蒸馏水。同时, 正常膳食组大鼠运动后马上放入装有饲料的笼内; 而低糖膳食组大鼠在运动后 6min 内不加入任何低糖饲料, 一直到 6h 后才加入低糖饲料, 并且加入的量也比正常喂食时稍少。24h 后大鼠定量负荷运动后的大鼠均喂食标准饲料和蒸馏水。

1.4 动物宰杀与取材

各组大鼠分别于相应的时间点宰杀。大鼠经 20% 乌拉坦腹腔麻醉后, 迅速剖开腹腔, 腹主动脉取血分离血清; 取右侧股四头肌, 在冰水中除去可见的血液、脂肪和筋膜, 用滤纸吸干, 锡纸包裹, 标记, 迅速置于液氮中, 随后被转入 -80°C 低温冰箱中直到检测。

1.5 指标测试

1.5.1 血清 IL-6: 双抗夹心法(ELISA)

雷杜公司生产的酶标仪, 型号 RT-2100C; 试剂盒购自上海轩昊生物技术有限公司。

1.5.2 肌糖原: 恩酮法

仪器为 721 型光栅分光光度计。试剂盒购于南京建成生物有限公司

1.5.3 骨骼肌 IL-6 mRNA、骨骼肌 GLUT4 mRNA

实时定量 PCR(Real-time PCR)

(1) 总 RNA 的抽提: Trizol 法

美国科俊仪器公司生产的超速冷冻离心机; 佳美仪器厂生产的可调电动匀浆器; 上海典奥生物科技有限公司代理的 MAXLine 酶标仪; Trizol 试剂盒购于上海英俊生物有限公司; 氯仿、异丙醇、DEPC 购于 Sigma-Aldrich 公司。100mg 肌肉样品按 100mg 组织/ml 加入 Trizol, 用电动匀浆器充分匀浆。12000rpm 离心 5min, 弃沉淀。按 200ul 氯仿/ml Trizol 比例加入氯仿, 振荡摇匀后室温放置 15min。 4°C 12000g 离心 15min。吸取上层水相至另一离心管中。按 0.5ml 异丙醇/ml Trizol 加入异丙醇混匀, 室温放置 10min。 4°C 12000g 离心 15min, 弃上清, RNA 沉于管底。室温晾干 10min。50ul DEPC 水溶解 RNA 样品。测定 260nm 和 280nm 波长下的吸光度, 以 OD260 值计算 RNA 含量, OD260/OD280 值鉴定纯度, 所得结果 > 1.7 。

(2) RNA 浓度、纯度检验: 琼脂糖凝胶电泳

取 4ul RNA 样品, 与 1ul 上样缓冲液(0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯青 FF、15% 聚蔗糖水溶液)混匀后加样, 以 5V/cm 进行电泳, 最后在紫外灯下观察 RNA 的分离情况, 可见 5S、18S 和 28S rRNA 三条电泳带, 其中 18S 和 28S rRNA 条带的显色强度约为 1:1.9。本试验总 RNA 完整性检测电泳图见图 1。

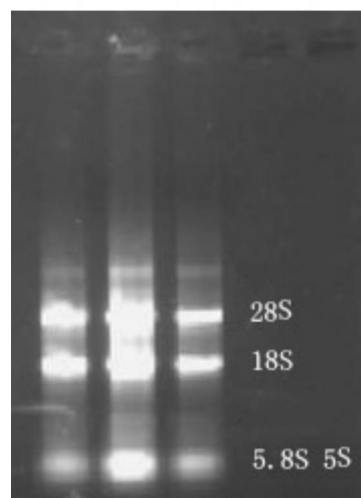


图 1 总 RNA 检测电泳图

(3)逆转录

美国 ABI 公司生产的 PCR 扩增仪, 型号: 2720; RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas 公司。总反应体系 20ul。取 20ulRNA 于 70°C 孵育混合物 5min, 冰冷却, 短暂离心, 收集沉淀。加入 5x 反应缓冲液 4ulRiboLock™ 核糖核酸酶抑制剂 (20u/μl) 1ul10mM dNTP 混合物 2ul 轻柔混合, 短暂离心, 收集沉淀。加入 RevertAid™-MuLV 逆转录酶, 42°C 孵育混合物 60min, 70°C 加热 10min 终止反应, 冰冷, 获得 cDNA 的第一链。

(4)Real Time PCR

伯乐生命医学产品有限公司 (bio-rad) 生产实时荧光 PCR 仪; 试剂盒购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物由上海英骏生物有限公司北京分公司设计。反应体系为 20ul, 分别为: SYER Premix Ex Taq (2x) 10ul, PCR Forward Primer (上游引物, 10ulm): 0. 4ul, PCR Reverse Primer (下游引物, 10ulm): 0. 4ul, DNA 模板: 1. 0ul, DH2O 灭菌蒸馏水: 7. 3ul。IL-6 (上游引物: 5' CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA3' 下游引物: 5' GTGCA TCATCGCTGTTCA TACAATC3'; 退火温度, 59. 2°C)。GLUT4 (上游引物: 5' CGTTG-

GCATGGGTTTCCAG3'; 下游引物: 5' GCCTCTG-GTTTCAGGCACTCTTAG3'; 退火温度, 56. 8°C); 内参基因 beta-actin (上游引物: 5' TGGTGGGTAT-GGGTCAGA AGGACTC3'; 下游引物: 5' CATGGCT-GGGGTGTTGAAGGTCTCA3'; 退火温度, 56. 2°C)。PCR 反应程序, 95°C 30s, 95°C 30s; 40 个循环, 变性 95°C 5s, 退火 20s, 72°C 15s; 95°C 60s, 55°C 60s。计算方法使用比较 CT 法相对定量, 目的基因表达量 = 2^(CT内参 - CT目的)

1.6 统计学处理

所有数据均以“平均数 ± 标准差” (mean ± SD) 表示。统计分析使用 SPSS 11.5 和 Sigmaplot9.0 版本统计分析软件完成。各组之间的指标比较先进行方差齐性检验, 方差齐者采用单因素方差分析, 如若具有显著性, 则在两组之间采用 t 检验; 如方差不齐, 则采用多个独立样本非参数检验。显著性水平为 p < 0.05。另外以肌糖原为控制变量对骨骼肌 IL-6mRNA 水平及血清 IL-6 浓度与 GLUT4mRNA 水平进行偏相关分析。

2 实验结果

2.1 肌糖原含量

表 1 不同时间点各组大鼠肌糖原含量 (mg/g 组织) 的比较 (平均值 ± 标准差)

| 空白对照 | 安静对照 | 运动 30min | 运动 120min | 运动后 3h | 运动后 6h |
|---------------|-------------------|-----------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| 5. 66 ± 1. 28 | | | | | |
| 低糖原组 | 3. 29 ± 0. 67 * ☆ | 2. 64 ± 0. 71 * | 1. 39 ± 0. 61 # ** * | 4. 31 ± 0. 99 # | 5. 01 ± 0. 96 # # |
| 正常糖原组 | 4. 79 ± 1. 09 | 3. 36 ± 0. 74 # | 2. 62 ± 0. 85 # # | 3. 78 ± 0. 67 # | 4. 65 ± 1. 07 |

注: # 与同一大组的安静对照组相比, p < 0.05; # # 与同一大组的安静对照组相比, p < 0.01。* 与另一大组相同时间点组相比, p < 0.05; ** 与另一大组相同时间点组相比, p < 0.01。☆ 安静对照组与空白对照组相比, p < 0.01。

2.2 血清 IL-6 浓度

表 2 不同时间点各组大鼠血清 IL-6 浓度 (pg/ml) 的比较 (平均值 ± 标准差)

| 空白对照 | 安静对照 | 运动 30min | 运动 120min | 运动后 3h | 运动后 6h |
|-------------|-------------|----------------------|------------------------|--------------------|------------------|
| 3. 6 ± 2. 3 | | | | | |
| 低糖原组 | 4. 3 ± 2. 0 | 25. 6 ± 10. 9 # ** * | 383. 6 ± 102. 3 # ** * | 109. 2 ± 46. 2 # # | 15. 1 ± 5. 8 # # |
| 正常糖原组 | 4. 0 ± 1. 8 | 15. 3 ± 6. 0 # # | 243. 7 ± 79. 7 # # | 62. 6 ± 39. 4 # # | 13. 4 ± 4. 9 # # |

注: 同表 1

2.3 骨骼肌 IL-6mRNA 表达

表 3 不同时间点骨骼肌 IL-6mRNA/β-action mRNA 比率结果的比较 (平均值 ± 标准差)

| 空白对照 | 安静对照 | 运动 30min | 运动 120min | 运动后 3h | 运动后 6h |
|---------------|---------------|---------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| 1. 00 ± 0. 10 | | | | | |
| 低糖原组 | 1. 12 ± 0. 08 | 1. 09 ± 0. 12 | 1. 30 ± 0. 16 # | 2. 17 ± 0. 46 # ** * | 3. 01 ± 0. 28 # ** * |
| 正常糖原组 | 1. 07 ± 0. 11 | 1. 10 ± 0. 12 | 1. 20 ± 0. 17 | 1. 61 ± 0. 24 # # | 2. 25 ± 0. 32 # # |

注: 同表 1

2.4 骨骼肌 GLUT4 mRNA 表达

表 4 不同时间点骨骼肌 GLUT4mRNA/ β -action mRNA 比率结果的比较(平均值 \pm 标准差)

| | 空白 对照 | 安静 对照 | 运动 30min | 运动 120min | 运动后 3h | 运动后 6h |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| | 1.00 \pm 0.14 | | | | | |
| 低糖原组 | | 0.94 \pm 0.09 | 1.06 \pm 0.21 | 0.98 \pm 0.13 | 1.35 \pm 0.30 # | 1.49 \pm 0.26 # # |
| 正常糖原组 | 1.04 \pm 0.14 | 0.96 \pm 0.12 | 1.10 \pm 0.25 | 1.21 \pm 0.17 | 1.29 \pm 0.17 # | |

注: 同表 1

2.5 以肌糖原为控制变量的大鼠骨骼肌 IL-6 基因表达及血清 IL-6 浓度与 GLUT4mRNA 的偏相关分析

结果表明, 大鼠骨骼肌 IL-6 基因表达与 GLUT4mRNA 的偏相关系数为 0.387, 具有极显著性意义 (p 值为 0.000); 血清 IL-6 浓度与 GLUT4mRNA 的偏相关系数为 0.238, 具有显著性意义 (p 值为 0.021)。

3 讨论

前人的研究表明, IL-6 在调节免疫应答、造血和机体防御机制中起着重要的作用。然而, 近来有研究发现身体的基本循环血中的 IL-6 有 10-35% 来自于脂肪组织^[9], 并且机体在剧烈运动时, 骨骼肌会大量释放 IL-6, 显示它可能是一种代谢的调节物, 引起了科研工作者的极大兴趣。

剧烈运动后, IL-6 在血液中的浓度与安静时相比, 可以上升 100 倍以上。并且, IL-6 在骨骼肌中的基因表达也明显增加^[1-3]。肌糖原含量是 IL-6 在收缩肌肉中释放的决定性因素之一。

Helge 的试验观察了人体运动时及运动后 IL-6 释放与肌糖原含量变化的关系, 他认为 IL-6 可能会以“碳水化合物敏感器”的形式起作用, 而调控运动过程中及运动后恢复期的葡萄糖平衡^[7]。Gleeson 认为, 收缩肌肉释放的 IL-6 很可能作为一种激素随血液循环运送到肝脏, 从而调节在运动过程中对维持血糖平衡具有重要作用的肝脏葡萄糖输出^[8]。有实验表明, IL-6 可能会和胰岛素刺激的组织和/或收缩骨骼肌摄取葡萄糖有关^[9]。众多的研究均显示了肌源性 IL-6 对糖代谢的重要调节作用。而肌源性 IL-6 是通过什么机制来促进葡萄糖利用的, 目前还没有得出较为一致的结论, 因此本文重点研究了骨骼肌葡萄糖转运体 GLUT4 在此过程中的基因表达变化, 以期探讨肌源性 IL-6 增加骨骼肌摄取利用葡萄糖增加的机制提供理论依据。

葡萄糖进入细胞不是单纯扩散, 而是需要载体蛋

白的易化扩散。在哺乳动物组织, 已克隆出 5 种葡萄糖运载蛋白, 即 GLUT1 到 GLUT5^[10]。最近, 又发现两种新的葡萄糖转运体 GLUTX1^[11] 和 GLUT8^[12]。肌肉组织中主要存在和起主要生理功能的是 GLUT4。实验结果表明, 志愿者进行了 6 周(每周 3 天, 每天 1-2 小时)75% 最大吸氧量强度的耐力训练, 其骨骼肌 GLUT4mRNA 水平明显增加^[13]。Pratt 的研究表明, 一次急性剧烈运动, 马的骨骼肌细胞膜 GLUT4 的含量在运动前与运动中及运动后相比, 并没有出现显著性差异^[14]。还有研究表明, 经过一次耐力训练, 大鼠骨骼肌中 GLUT4mRNA 量增加约 2 倍, GLUT4 增加 50%, 经过两次耐力训练(每天一次), GLUT4 增加约 2 倍, 而 GLUT4mRNA 量不再增加, 在胰岛素刺激情况下细胞膜上 GLUT4 含量较正常组高 2 倍^[15]。Ren 等人还发现, 正常大鼠运动 3 小时后, 骨骼肌细胞内 GLUT4mRNA 和蛋白含量就有所增加, 而且 GLUT4 蛋白含量的增加可以持续到运动停止后一周^[16]。总的来说, 运动可以促进 GLUT4 转位, 促进 GLUT4 基因转录及 GLUT4 蛋白浓度增加。

本研究结果表明, 高强度 2h 运动后 3-6h, 骨骼肌 GLUT4 基因转录显著增加, 至 24h 后基本恢复到运动前水平; 而巧合的是, 此时正是骨骼肌 IL-6 基因转录也显著增加的时期。而血清 IL-6 显著增加的时期是在运动 120h 后即刻, 到运动后 3-6h 已显著降低。本研究结果说明低肌糖原含量诱导的 IL-6 基因转录及表达的 IL-6 很有可能通过自分泌再作用于骨骼肌, 使骨骼肌 GLUT4 基因表达增加, 然后增加对血液葡萄糖的摄取。

在肌肉收缩过程中, GLUT4 转位的过程比较复杂。机械收缩与胰岛素刺激均能引起 GLUT4 从肌肉内储存库向细胞膜的转位, 并且两者的机制可能是不同的。有学者认为, 肌源性 IL-6 的大量释放促进骨骼肌摄取葡萄糖的增加与它促进了 GLUT4 的基因表达与转位有关^[3]。本文主要研究 GLUT4 的基因表达, 结果表明, 在运动前低肌糖原状态下, 相对于正常肌糖

原组,肌源性 IL-6 分泌大大增加,而运动后 3h 及 6h, GLUT4 的基因表达也显著增加,而此时正是糖原重新合成的关键时期。偏相关分析也表明,肌源性 IL-6 基因表达与血清 IL-6 与 GLUT4 基因表达均具有相关性,但前者更为明显,说明 GLUT4 表达与肌源性 IL-6 基因表达、蛋白合成及从骨骼肌释放的关系更为密切,而与血清 IL-6 浓度的相关性要低。据此我们认为,可能正是由于 IL-6 的自分泌作用,在一定程度上增加了运动后恢复期 GLUT4 基因的表达。虽然没有直接的证据来证明这种猜想,但是根据不同 IL-6 存在时, GLUT4 基因表达不一样的事实,它们之间是可能存在联系的,联系的桥梁可能是 AMPK (AMP 激活的蛋白激酶)。试验研究表明,在肌肉收缩时,AMPK 由于能调节 GLUT4 向质膜转运,最终导致葡萄糖摄取增加^[17]。Pederson 等也认为肌源性 IL-6 可能是通过激活 AMPK 而调控 GLUT4 基因的转录与转位^[3]。当然,情况是否如此,还需要进一步的研究来证实。

4 结论

(1)低肌糖原含量可以促进运动中 IL-6 的释放及运动后恢复期 IL-6 和 GLUT4 的基因表达。

(2)运动导致恢复期 GLUT4 基因表达的增加很有可能与肌源性 IL-6 的表达及 IL-6 的自分泌作用有关。

参考文献:

- [1] Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80: 1055 - 1081.
- [2] Jonsdottir I, Schjerling P, Ostrowski K, et al. Muscle contraction induces interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles [J]. *J Physiol*, 2000, 528: 157 - 163.
- [3] Pedersen BK, Steensberg A, Schjerling P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects [J]. *J Physiol*, 2001, 536: 329 - 337.
- [4] Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content [J]. *FASEB J*, 2001, 15: 2748 - 2750.
- [5] Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor [J]. *Proc Nutr Soc*, 2004, 63(2): 263-267.
- [6] Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha in vivo [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(12): 4196-4200.
- [7] Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, et al. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2003, 546(1): 299-305.
- [8] Gleeson M. Perspectives: Interleukins and exercise. *J Physiol*, 2000, 529: 1.
- [9] Steensberg A, Febbraio M, van Hall G, et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol*, 2001, 537(2): 633-639.
- [10] Shepherd PR, Kahn BB. Mechanisms of disease: glucose transporters and insulin action. Implication for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1999, 341: 248-251.
- [11] Ibberson M, Uldry M, Thoren B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin sensitive tissues. *J Biol Chem*, 1999, 275(6): 4607-4612.
- [12] Doege H, Schurmann A, Bahrenberg G, et al. GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Bio Chem*, 2000, 275: 16275-16280.
- [13] De Bock K, Derave W, Eijnde BO, et al. Effect of training in the fasted state on metabolic responses during exercise with carbohydrate intake. *J Appl Physiol*, 2008, 104: 1045-1055.
- [14] Pratt SE, Geor RJ, Spriet LL, et al. Time course of insulin sensitivity and skeletal muscle glycogen synthase activity after a single bout of exercise in horse. *J Appl Physiol*, 2007, 103: 1063-1069.
- [15] Borghouts LB, Keizer HA. Exercise and insulin sensitivity: a review. In *J Sports Med*, 2000, 21: 1-12.
- [16] Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, et al. Exercise induces rapid increase in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem*, 1994, 269: 14396-14401.
- [17] Richter EA, Derave W, Wojtaszewski JF. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol*, 2001, 535: 313-322.