

Online edition: ISSN 2188-3610 Print edition: ISSN 2188-3602 Received: April 25, 2022 Accepted: May 29, 2022 Published online: June 30, 2022 doi:10.24659/gsr.9.2\_106

Original article

# Cleavage of glycated protein cross-linking and cleavage of AGEs cross-linking of substances contained in vegetables and herbs

Yurim Kim, Saki Yokota, Masayuki Yagi, Chieko Sakiyama, Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9(2): 106-111 (c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文:日本語翻訳版)

## 野菜やハーブに含まれる物質の糖化蛋白架橋切断作用と AGEs 架橋切断作用

金 瑜林、横田早貴、八木雅之、﨑山智恵子、米井嘉一

同志社大学生命医科学部アンチエイジングリサーチセンター/糖化ストレス研究センター

#### 抄録

糖化ストレスによる体内での終末糖化産物(advanced glycation end products; AGEs)の生成や蓄積は老化や様々な疾患の進展要因となる。特にAGEsの生成に伴う蛋白の架橋形成は組織を硬化させるため生体機能の低下要因となる。N-フェナシルチアゾリウムブロミド(N-phenacylthiazolium bromide; PTB)は $\alpha$ ジケトン結合( $\alpha$ -diketone bond)を切断する作用を有し、糖化した蛋白中のAGEs形成に伴う架橋結合を切断する(AGEs架橋切断作用)(cleavage of AGE cross-linking; CAC)。しかし糖化による蛋白の架橋形成にはグルコスパン、 $\alpha$ ジケトン、lysine-dihydropyridinium-lysine が関与しているため、架橋切断作用の有用性は糖化蛋白を用いた検証が課題となる。一方、糖化リゾチームをモデルとした蛋白架橋切断作用(cleavage of glycated-protein cross-linking; CGPC)の測定が報告されている。本研究では野菜やハーブ等に含まれる12物質のCGPCとCACを測定した結果、6物質(50%)のCGPCとCACの間には高い正の相関性が認められ、糖化蛋白架橋の分解に $\alpha$ ジケトン結合の切断が関与している可能性があった。一方、3物質はCGPCだけが認められ、 $\alpha$ ジケトン構造と異なる架橋結合を切断している可能性があった。CGPC測定は $\alpha$ ジカルボニル結合以外の糖化蛋白架橋切断作用を評価できる可能性がある。

連絡先:教授 八木雅之 同志社大学生命医科学部アンチェイジングリサーチセンター/ 糖化ストレス研究センター 〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3 TEL&FAX: 0774-65-6394 e-mail: myagi@mail.doshisha.ac.jp 共著者:金 瑜林 cgsc2036@mail4.doshisha.ac.jp; 横田早貴 ctug2031@mail4.doshisha.ac.jp; 﨑山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp **KEY WORDS:** 終末糖化產物 (advanced glycation end products: AGEs)、

糖化リゾチーム (glycated lysozyme)、

糖化蛋白架橋切断作用(cleavage of glycated-protein cross-linking)、

AGEs 架橋切断作用 (cleavage of AGE cross-linking)

#### はじめに

糖化ストレスによる体内での終末糖化産物(advanced glycation end products; AGEs) の生成や蓄積は老化や様々 な疾患の進展要因となる<sup>1,2)</sup>。特にAGEsの生成に伴う蛋白 の架橋形成は組織を硬化させるため生体機能の低下要因 となる。糖化による蛋白の架橋形成にはグルコスパン、α ジケトン (α-diketone)、lysine-dihydropyridinium-lysine が 関与している $^{3}$ 。N-フェナシルチアゾリウムブロミド (Nphenacylthiazolium bromide; PTB) はαジケトン結合 (α-diketone bond) を切断する作用を有し、糖化した蛋白 中のAGEs 形成に伴う架橋結合を切断する (AGEs 架橋切 断作用)(cleavage of AGE cross-linking; CAC)<sup>4</sup>。 試料 のCACは1-フェニル-1,2-プロパンジオン (1-phenyl-1,2propanedione; PPD) をαジケトン結合モデル化合物として、 試料が分子内のαジカルボニル結合を分解して遊離する 安息香酸量を測定する。CAC はロスマリン酸 (rosmarinic acid) <sup>5)</sup>、エラジタンニン類 (ellagitannin) <sup>6)</sup>、フラボノイド (flavonoid)<sup>7</sup> など、植物に含まれる物質に認められている。 一方、糖尿病ラットに CAC を有する物質である PTB を投 与した試験では皮膚および尾コラーゲン中の糖化蛋白架橋 を分解しなかった<sup>8)</sup>。このためCACによる糖化蛋白架橋の 切断作用の有用性は糖化蛋白を用いた検証が課題となる。

リゾチーム (lysozyme) は糖化するとペントシジン (pentosidine)、ベスパーリジン (vesperlysine)、ピロピリジン (pyrropyridine)、クロスリン (crossline) 等の架橋性 AGEsの生成によって二量体 (dimer) や三量体 (trimer)を形成する 9)。糖化リゾチームの重合化はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) によって検証可能である。糖化リゾチームをモデルとした蛋白架橋切断作用 (cleavage of glycated-protein cross-linking; CGPC) は食用紫菊花の50%エタノール抽出エキスで報告されている 10)。

本研究では野菜やハーブ等に含まれる12物質のCGPCとCACを測定し、糖化によって重合した蛋白架橋の分解の可能性を検証した。

## 材料と方法

## 1) 試薬

使用した試薬は以下のメーカーから購入して使用した。リゾ チーム塩酸塩 (卵白由来) (lysozyme, from egg white)、ロス マリン酸 (rosmarinic acid)、1-フェニル-1,2-プロパンジオン (1-phenyl-1, 2-propanedione; PPD)、安息香酸 (benzoic acid) は富士フィルム和光純薬工業 (大阪府大阪市)。2-40% Mini-Protean TGX Precast gel 1th Bio-Rad(Hercules, -phenacylthiazolium bromide; PTB) lt Sigma-Aldrich Japan (東京都目黒区)。(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin gallate は長良サイエンス (岐阜県、岐阜市)。7-hydroxyflavone、7,4'dihydroxyflavone, 7,4'-dihydroxyflavanone (liquiritigenin), 5,7-dihydroxyflavone 7-glucuronide (chrysin), 3-(4hydroxyphenyl) -1- (2,4,6-trihydroxyphenyl) propan-1- one (phloretin), rosmarinic acid (ester of caffeic acid and 3,4dihydroxyphenyllactic acid), 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rutinoside (rutin) l\(\pm\)Extrasynthese (Genay Cedex, France). Punicalagin(2,3-(S)-hexahydroxydiphenoyl-4,6-(S,S)gallagyl-D-glucose) 13 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)。 4', 5,7-trihydroxyisoflavone (Genistein) はLC Laboratories (Woburn, Massachusetts, USA)。ローズマリー 抽出物<sup>5)</sup>はA2P Science (Lyon, France)。その他の試薬は 特級またはHPLCグレードのものを富士フィルム和光純薬工 業またはナカライテスク(京都府京都市)から購入して使用 した。

#### 2) 試料

試料は野菜やハーブ等の植物に含まれることが知られている12物質(flavone、7-hydroxyflavone、7,4'-dihydroxyflavone、7,4'-dihydroxyflavone 7-glucuronide、3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rutinoside、(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin gallate、4',5,7-trihydroxyisoflavone、3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-one、rosmarinic acid、punicalaginを使用した(*Table 1*)。PTBはCGPC、CACの陽性対照物質として使用した。

Table 1. Relationship between CGPC and CAC of substances contained in vegetables and herbs.

No	Substances	Typical herbs containing ingredients	CGPC(%)	CAC (%)
1	flavone	chamomile, green tea, parsley	ND	ND
2	7-hydroxyflavone	berries, green tea, citrus	ND	ND
3	7,4'-dihydroxyflavone	broad beans, fenugreek	$16.6 \pm 4.7$	ND
4	7,4'-dihydroxyflavanone (Liquiritigenin)	nuts, winged beans, leafy vegetables	8.3 ± 1.3	ND
5	5,7-dihydroxyflavone 7-glucuronide (Chrysin)	passion fruit, honey, propolis	54.7 ± 4.9	ND
6	3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rutinoside (Rutin)	apple, buckwheat, green tea	13.6 ± 1.9	$2.1 \pm 0.9$
7	(-)-epicatechin	green tea, apple, berries, cacao	$24.6 \pm 5.4$	$6.9 \pm 0.2$
8	(-)-epicatechin gallate	green tea, cacao	$96.8 \pm 2.1$	42.0 ± 3.9
9	4',5,7-trihydroxyisoflavone (Genistein)	soy, broad beans	ND	ND
10	3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-one (Phloretin)	apple, pear	19.8 ± 1.3	1.1 ± 0.1
11	rosmarinic acid (ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenyllactic acid)	rosemary, lemon balm, perilla	$33.6 \pm 0.6$	27.4 ± 0.1
12	punicalagin (2,3-(S)-hexahydroxydiphenoyl-4,6-(S,S)-gallagyl-D-glucose)	pomegranate	83.3 ± 2.0	22.8 ± 0.4
ref	PTB ( <i>N</i> -phenacylthiazolium bromide)	_	5.6 ± 0.4	$23.3 \pm 0.2$

Data are shown as mean ± SD, n = 3; Sample concentration; 0.5 mmol/L (CGPC), 2.5 mmol/L (CAC); ND, less than 1 %; CGPC, cleavage of glycated-protein cross-linking; CAC, cleavage of AGE cross-linking, ref; positive control; SD, standard deviation.,

#### 3) 糖化リゾチームの作成

糖化リゾチーム (glycated lysozyme) は既報 10-12) を参考に、2 mg/mLリゾチームと0.2 mol/Lグルコースを含む 0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) を60°C、40時間反応させた後、3kDa限外ろ過膜(Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filters Ultracel-3K; Merck, Darmstadt, Deutschland) によって低分子物質を除去して作成した。

#### 4) 糖化蛋白架橋切断作用

(cleavage of glycated-protein cross-link; CGPC)

CGPCは既報を参考に10、糖化リゾチームの二量体が試料の添加によって単量体に戻る比率を切断率として算出した。CGPCの測定は0.5 mg/mL糖化リゾチームを含む 0.05 mol/Lリン酸緩衝液中と2 mmol/Lの試料を1:1に混合した溶液;(S)、Sの試料の代わりに試料の溶解液のみを添加した溶液;(R)を作成し、37°Cで16時間インキュベートして反応させた。その後各反応液を3kDa限外ろ過膜により低分子物質を除去し後、4-20% SDS-PAGEに供した。泳動後のゲルはCBB Stain One(ナカライテスク、京都市中京区)で染色し、泳動像をPharos FX System (Bio-Rad、California, USA)で画像化後、リゾチームの単

量体 (M)、二量体 (D) のバンドの強度を ImageJ (NIH, Maryland, USA) <sup>13,14)</sup>で解析した。糖化蛋白架橋切断率は以下に示した式により算出した。CGPC は糖化蛋白架橋切断率 1 % 以上を作用ありとした。

糖化蛋白架橋切断率(%)=[1-{ $(D_S/M_S)/(D_R/M_R)$ }]×100

S: 試料添加時のリゾチームのバンド強度

R; 試料溶解液のみを添加した時のリゾチームの バンド強度

M; リゾチームの単量体バンド

D:リゾチームの二量体バンド

## 5) AGEs 架橋切断作用

(cleavage of AGE cross-link; CAC)

CACは既報 $^{4,6,15}$ に従い、PPDを架橋モデル物質とし、試料によるPPDの $\alpha$ ジケトン結合の切断率を測定した。CACの測定は、5 mmol/L試料、10 mmol/L PPD、0.2 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) を5:1:4の割合で混合し、37°Cで8時間反応させた後、0.7 N塩酸を添加して反応停止後、PPDの $\alpha$ ジケトン結合が試料によって切断され、遊離した安息香酸量;(A)、試料中の安息香酸量;(B)を

既報  $^{6}$  と同様のHPLC条件で測定した。AGEs 架橋切断率は反応液中のPPD; (C) の  $\alpha$  ジケトン結合が切断されると、1 molのPPDから1 molの安息香酸が生成することから、以下に示した式で算出した。CAC はAGEs 架橋切断率 1%以上を作用ありとした。

AGEs架橋切断率 (%) =  $\{(A-B)/C\} \times 100$ 

A; 反応液中の安息香酸量 (mol) B; 試料中の安息香酸量 (mol) C; 反応に供したPPD量 (mol)

#### 統計解析

測定値は3回測定の平均値  $\pm$  標準偏差(standard deviation: SD)で示した。測定値の相関性解析はスピアマンの順位相関係数(Spearman's rank correlation coefficient)を用い、危険率5%未満 (p < 0.05)を有意とした。統計解析には統計解析ソフトBellCurve for Excel(社会情報サービス、東京都新宿区)を使用した。

## 結果

#### 1) 糖化蛋白架橋切断作用(CGPC)

CGPCは試料の反応液中濃度 0.5 mmol/Lにおいて12 物質中 9 物質 (75%) に認められた (*Table 1*)。CGPCを有

する 9 物質の糖化蛋白架橋切断率は  $35.7\pm30.4\%$  (平均値  $\pm$  標準偏差)で、(-)-epigallocatechin gallate ( $96.8\pm2.1\%$ ) が最大値、7,4'-dihydroxyflavanone ( $8.3\pm1.3\%$ ) が最小値を示した。 9 物質の CGPC には 11.7倍の差異が認められた。 (-)-epigallocatechin gallate は陽性対照として比較した PTBの 17.3 倍強い作用を示した。

#### 2) AGEs 架橋切断作用 (CAC)

CACは試料の反応液中濃度 2.5 mmol/Lにおいて 12 物質中 6 物質 (50%) に認められた  $(Table\ 1)$ 。CACを有する 6 物質の糖化蛋白架橋切断率は  $17.9\pm14.0\%$  で、(-)-epigallocatechin gallate  $(42.0\pm3.9\%)$  が最大値、3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-one  $(1.1\pm0.1\%)$  が最小値を示した。6 物質のCACには 38.2 倍の差異が認められた。(-)-epigallocatechin gallate は陽性対照として比較した PTB 01.8 倍強い作用を示した。

#### 3) ローズマリー抽出物とPTBのCGPC測定

CGPC 測定ではリゾチームのバンド強度の低下が認められた。特にローズマリー抽出物を $1\sim5$  mg/mL添加した時はリゾチームの単量体バンド強度が無添加時を100% としたとき $88.5\sim33.5\%$ に減弱した (Fig. 1, 2)。PTBのCGPC測定ではローズマリー抽出物と同様にリゾチーム単量体バンド強度の減弱が認められた。しかしその減弱は無添加時を100%としたとき最大 (5 mmol/L) で93.6%であった。リゾチームの二量体バンド強度はローズマリー抽出物、PTBの添加濃度が高くなるとともに減弱した。

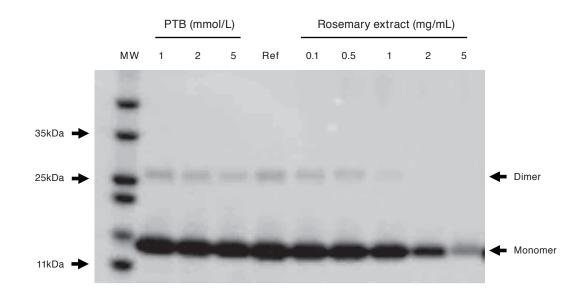


Fig. 1. CGPC by PTB and rosemary extract and the change of glycated lysozyme band intensity. Sample and 0.5 mg/mL glycated lysozyme were incubated at 37°C for 16 hours, n = 1; SDS-PAGE was conducted using 2 ~ 40% acrylamide gels. Stained with CBB stain one; MW, molecular weight markers; Ref, incubation without sample (with 50% ethanol); PTB, N-phenacylthiazolium bromide, a positive control; CGPC, cleavage of glycated-protein cross-linking.

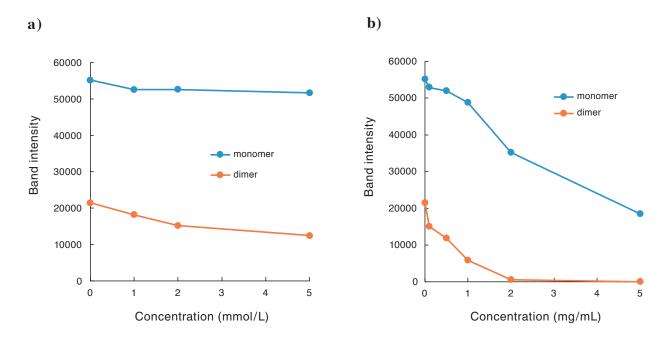


Fig. 2. Band intensity of PTB and rosemary extract on lysozyme dimer in the glycated lysozyme.

a) N-phenacylthiazolium bromide (PTB), b) rosemary extract. Sample and 0.5 mg/mL glycated lysozyme were incubated at 37 °C for 16 hours, n = 1. SDS-PAGE was conducted using 2 ~ 40 % acrylamide gels, stained with CBB stain one. MW, molecular weight markers; Ref, incubation without sample (with 50 % ethanol).

## 考察

#### 1) CGPCとCACの関連性

検証した12物質中、3物質(flavone、7-hydroxyflavone、4',5,7-trihydroxyisoflavone)はCGPC、CACともに認められなかった。また6物質(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rutinoside、(-)-epicatechin、(-)-epigallocatechin gallate、3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propan-1-one、rosmarinic acid、punicalagin)はCGPC、CACの両方に作用が認められた。またこれら両方の作用を有する6物質のCGPCとCACの間には相関性が認められ(p < 0.05)(Fig. 3)、蛋白架橋の分解に $\alpha$ ジケトン結合の切断が関与している可能性があった。

一方、3物質(7,4'-dihydroxyflavone、7,4'-dihydroxyflavanone、5,7-dihydroxyflavone 7-glucuronide) はCGPCだけが認められた。特に5,7-dihydroxyflavone 7-glucuronideの蛋白架橋切断率 (64.5  $\pm$  17.7%) は、CGPCを有する9物質中、第3番目に作用が強かった。12物質のCGPCとCACの有無や強弱には物質構造に関連する作用傾向が認められなかった。糖化による蛋白架橋には $\alpha$ ジケトン結合以外に、グルコスパン、lysine-dihydropyridinium-lysine によるものがある $^{3}$ )。これら3物質が切断している架橋結合は $\alpha$ ジケトン構造と異なる可能性があった。これらの結果からCGPC測定は $\alpha$ ジカルボニル結合以外の糖化蛋白架橋切断作用を評価できる可能性があった。しかし糖化リゾチームの二量体に形成された蛋白架橋構造は不明なため、メカニズムの推定に至らなかった。

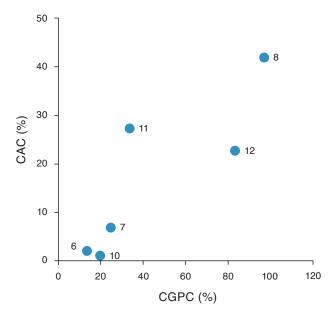


Fig. 3. Correlation of six substances with both CGPC and CAC.

Each point indicates average value in triplets of CGPC and CAC. Statistical analysis, Spearman's rank correlation coefficient, p < 0.05; Sample concentration, 0.5 mmol/L (CGPC), 2.5 mmol/L (CAC). Numbers in the graph indicate substance number in *Table 1*. CGPC, cleavage of glycated-protein cross-linking; CAC, cleavage of AGE cross-linking,

#### 2) CGPC 測定の課題

CGPC 測定におけるSDS-PAGEのリゾチーム単量体 バンド強度は、ローズマリー抽出物を1 mg/mL以上添加 した時に無添加時を100%としたとき最大(5 mg/mL)で 33.5%に減弱する現象が認められた。CBB Stain One によ る蛋白染色は色素を蛋白のアミノ基に静電相互作用などに よって吸着させて染色する方法である160。染色不良は反応 時に糖化リゾチームとローズマリー抽出物に含まれるロス マリン酸およびその他の未知物質が共存したことによる色 素結合部の荷電変化が推定された。蛋白質の糖化による架 橋形成はグルコースの反応性アルデヒド基が蛋白鎖の反応 性アミノ基と反応し、シッフ塩基の形成を経て糖化反応中 間体となる1,2)。これらの糖化反応中間体はアマドリ生成 物や蛋白のリジン-アミノ基を攻撃して、蛋白鎖を結合す る安定した架橋結合を形成する。しかし、αジカルボニル 結合による架橋が切断される際は元の蛋白構造に戻るので はなく、修飾物のついた蛋白単分子になる<sup>9,17)</sup>。このため 蛋白と色素との静電相互作用が弱くなることでCBB染色 が正常に行われなかった可能性がある。CGPCは反応系 に添加した試料が蛋白糖化によって重合したリゾチームを 単量体に戻す比率を切断率として算出するため、リゾチー ムの染色不良が測定誤差を生む要因となる。食用紫菊花抽 出物のCGPC測定値は糖化リゾチームの二量体バンド強 度のみの減少率から蛋白架橋切断率が算出されている10)。 この場合、リゾチーム単量体バンドの減弱は認められてい ない。リゾチーム単量体バンドの減弱が起こったローズマ リー抽出物の糖化蛋白架橋切断率を既報と本実験の解析方 法で比較すると、既報<sup>10)</sup>の解析方法は本実験結果よりも 1.4~3.5%高値と算出された。本実験で測定したCGPC 値の標準偏差は0.4~5.4%認められているため、解析方 法の違いが作用の有無を誤認させる数値では無かった。し かしリゾチームの染色不良を起こす試料のCGPC測定で は、本検証で使用した算出式を使用し、バンド強度の減少 が蛋白架橋切断作用の過大評価要因にならないよう注意す る必要がある。

#### 研究限界

本研究ではハーブ等に含まれる12 物質を試料として CGPC、CACを検証した。様々な物質のCGPCとCACの 関連性およびCGPCの評価における蛋白染色への影響に ついてはさらに数多くの物質を比較検証する必要がある。

## 結語

野菜やハーブ等に含まれる12物質のCGPCとCACを測定した結果、6物質(50%)のCGPCとCACの間には高い正の相関性が認められ、糖化蛋白架橋の分解に $\alpha$ ジケトン結合の切断が関与している可能性があった。一方、3物質はCGPCだけが認められ、 $\alpha$ ジケトン構造と異な

る架橋結合を切断している可能性があった。CGPC測定はαジカルボニル結合以外の糖化蛋白架橋切断作用を評価できる可能性がある。

#### 謝辞

本研究の一部は第23回糖化ストレス研究会(熊本、2021年8月29日)にて発表した。本研究の出版にあたり、一般財団法人 医食同源生薬研究財団 (IDF#22006)より支援を受けた。

## 利益相反申告

本研究の実施にあたり利益相反となる事象はない。

#### 参考文献

- 1) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med*. 2011; 8: 23-29.
- Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1.
   What is glycative stress? Glycative Stress Res. 2016; 3: 152-155.
- 3) Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 274-278.
- Vasan S, Zhang X, Zhang X. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. 1996; Nature. 382: 275-278.
- 5) Jean D, Pouligon M, Dalle C. Evaluation in vitro of AGE-crosslinks breaking ability of rosmarinic acid. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 204-207.
- 6) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 58-66.
- Takabe W, Mitsuhashi R, Parengkuan L, et al. Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. Glycative Stress Res. 2016; 3: 38-43.
- Yang S, Litchfield JE, Baynes JW. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 412: 42-46.
- Aldini G, Vistoli G, Stefek M, et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radic Res*. 2013; 47(Suppl 1): 93-137.
- 10) Yagi M, Hara H, Mifuru R, et al. Suppression of glycated protein cross-linking formation and cross-linking cleavage reaction of edible purple Chrysanthemum flower extract. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 7-14.
- 11) Perera HKI, Ranasinghe HASK. A simple method to detect plant based inhibitors of glycation induced protein crosslinking. *Asian J Med Sci.* 2015; 6: 28-33.
- 12) Perera HKI, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15, 175.
- Rasband WS. Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012.
- 14) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 671-675.
- 15) Yagi M, Sakiyama C, Miyata Y, Kamiya S, Yonei Y. Antiglycative effect of genipin and crocetin. *Glycative Stress Res*. 2021; 8: 156-161.
- 16) Steinberg TH. Protein gel staining methods: An introduction and overview. *Methods Enzymol*. 2009; 463: 541-563.
- 17) Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: Prospects for removal. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 274-278.