

골이식물로서의 소뼈 치밀골에서 Crude-BMP의 추출

최성진* · 박 철 · 허수영 · 이종일** · 정인성*** · 김남수 · 최인혁¹

전북대학교 수의과대학
*동경대학 대학원 연구생
**전북대학교 생체안전성연구소
***서울 로얄 메디칼 센터

Extraction of Crude-BMP from Bovine Cortical Bone for Bone Grafts

Sung-jin Choi*, Chul-Park, Soo-young Heo, Jong-il Lee**, In-seong Jeong***,
Nam-soo Kim and In-hyuk Choi¹

Collage of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Korea

*Animal Medical Center, Tokyo University, Japan

**Institute of Bio-Safety Research, Chonbuk National University, Korea

***Royal Animal Medical Center, Seoul, Korea

Abstract: We tried to extract bone morphogenetic protein (BMP) from the freeze-dried bovine cortical bone (FBCB) for bone graft, which were defatted with chloroform-methanol for 20 days, freeze-dried at -80°C for 7 days and sterilized by ethylene oxide gas. Two kg of FBCB were pulverized in a wheel mill to 0.5-2.0 mm³ cubic in size. The bone particles were demineralized in 0.6N HCl for 10 days at 4°C and defatted with chloroform-methanol for 6 hours at room temperature, which was going to be defatting and demineralized cortical bone (DDM). For extracting BMP, DDM was agitated continuously through 72 hours with magnetic stirrer at 4°C into 12 times of volume of 6 M guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) solution containing proteinase inhibitors to protect BMP such as 2 mM N-ethylmaleimide, 1 mM iodoacetic acid, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and a sterilizer, 1 mM sodium azide. The extraction procedure was repeated for three times. All extracted solution was centrifuged at 10,000 rpm for 30 min and then, the supernatant was dialyzed with 12 times of volume of deionized water at 4°C for 24-72 hours, which cut off below 6,000-8,000 molecular weight. The dialyzed specimen contained crude-BMP was centrifuged, freeze-dried, and weighted. Through these processing, we could obtained 84.9% as FBCB, 17.8% as DDM and 0.71% as crude-BMP from the wet cortical bone without cancellous bone, marrow and muscles. The crude-BMP were obtained 68.3% from the first extraction, 29.6% from secondary and 2.1% from tertiary, respectively. It was suggested that high yield of crude-BMP might be explained by three-time repetition of the extraction processing for crude-BMP with Gdn-HCl sol.

Key word : Freeze-dried bone, bovine, crude-BMP extraction.

서 론

골이식에서 이종골이나 동종골의 치밀골은 강도가 높고 거부반응 물질이 적으며 골형성원성단백질(bone morphogenetic protein; BMP)이 함유되어 신생골을 유도할 수 있는 능력이 있기 때문에 골이식물로 선호되고 있다. 많은 연구자들은 사람을 비롯한 여러 동물의 치밀골에서 골아세포를 분화시켜서 신생골을 유도할 수 있는 BMP를 분리했으며^{10,14,20}, 이종골 이식으로 이용되는 소뼈의 기질에서 BMP를 분리한 연구가 가장 많다.^{1,7,12,16,19,23} 특히 동종골에서는 골기질에 면역성 거부물질이 적기 때문에 단순한 동결만으로도 골 이식이 성공될 수 있으나 임상에서의 적용력을 증가시키기 위하여 면역성 거부물질을 억제하거나 골형성을 촉진시키는 여러 가지 처리방법이 보고 되어 있으며 지금까지 알려진 이식

골의 처리방법 중 동결건조처리법이 가장 널리 이용되고 있다.^{3-7,13,21} 이 방법은 첫째, 동종골에서 면역성 거부물질을 chloroform-methanol solution(CM sol)으로 억제하고, 둘째, 치밀골에 함유된 BMP가 손상 받지 않고 보존될 수 있도록 동결건조처리를 하며, 셋째, 처리된 이식골을 ethylene oxide gas로 멸균소독하여 반영구적으로 보존하는 방법이다.^{5,11} 동결건조된 치밀골에 함유된 BMP는 생체내에서 간접세포를 자극하여 골아세포로 분화시켜 신생골의 형성을 유도하고 결국 골 결손부를 복구하는 것으로 알려져 있다.²²

동종 또는 이종골의 처리과정에서 가장 문제가 되는 것은 면역성 거부반응물질을 제거하는 방법과 BMP의 보존능력이다. 동결건조 처리법 중에서 골기질의 면역성 거부반응물질을 제거하는 방법으로서 methanol, chloroform, acetone 등의 처리법이 알려져 있으나 CM sol 처리법이 가장 널리 알려져 있다. CM sol 처리법은 치밀골 내 지질물질을 용해하여 세포막을 비롯한 세포내외의 지질성 면역물질을 제거하는 것

¹Corresponding author.
E-mail : ihc@chonbuk.ac.kr

으로 알려져 있다¹¹. 또한 CM sol은 BMP의 보존에 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 동결건조처리법은 치밀골의 수분함량을 5% 이내로 건조시키는 방법으로 5% 이내의 수분함량은 효소나 세포의 모든 생화학적인 반응을 억제 또는 정지시켜 보존성을 유지하는 방법으로 알려져 있다. 이러한 처리방법을 응용한 이종골 이식연구를 통해 밝혀진 여러 실험동물들에 대한 결과나 사람에서의 임상적인 효과가 보고 되었으며, 동결 건조한 치밀골의 BMP가 신생골 형성의 주도적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 많은 연구자들은 소뼈의 치밀골에서 BMP를 추출하였으나 실제로 동결 건조한 치밀골에서 BMP를 분리한 보고는 아직 접하지 못했다. 따라서 본 연구에서는 이종골 이식용으로 제작된 동결건조 처리한 소뼈의 치밀골에서 BMP를 분리하여 이론적인 BMP의 존재와 기능을 실제적으로 증명하고자 하였다.

치밀골에서 BMP를 추출하는 방법으로는 여러 가지 방법이 알려져 있으나^{1,2,7,11,12,16,19,20,23}, 본 연구에서는 일반적으로 가장 많이 이용되고 있는 Guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) 추출법을 적용하였다. 같은 Gdn-HCl 추출법에서도 연구자에 따라서 추출 처리하는 과정이나 방법이 다양하며 BMP의 수율은 연구자나 추출방법에 따라 10배 이상의 차이를 나타내고 있고 골형성 유도능력도 상당한 차이를 나타내고 있다^{11,16,19}. 지금까지 알려진 Gdn-HCl 추출법은 치밀골을 1회 추출 하였으며 치아에서는 3차까지 추출된바 있으나 추출회수별 정량은 보고 되지 않았다¹¹. 또한 추출기간도 24시간에서 96시간까지 다양하게 보고 되어 있다^{11,12}. 한편 Strates(1969)는 치밀골을 5 mol의 Gdn-HCl로 30일간 노출시킨 후에도 신생골의 골유도능력이 5%가 남아있다고 보고한 바 있다¹⁷. 이러한 결과들은 1회의 단시간에 BMP가 추출되지 않는다는 것을 의미한다. 즉 추출회수의 증가와 충분한 추출기간은 BMP의 수율을 증가시킬 수 있다는 것을 추정할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 6M-Gdn-HCl 추출액에 BMP 보존제와 제균제 만을 첨가하여 BMP의 높은 수율을 얻기 위해 3차까지 추출을 시도하고 추출기간을 72시간으로 하여 BMP추출법을 개선하고자 하였다.

재료 및 방법

소뼈 치밀골의 동결건조처리

소뼈는 1-2세의 젖소 수컷에서 도축 후 즉시 사지골을 채취하여 4시간 안에 -80°C의 동결실에 보관하였다. 사지골은 bone saw를 이용하여 양측의 골단부 연골부위를 제거하고 골간부를 세절한 후 부착된 연부조직과 골수, 골막, 혈액, 해면질을 제거하여 순수한 치밀골 2 kg를 분리하였다. 분리된 치밀골은 일반적인 정형외과 골판과 유사하게 길이 3-7 cm, 폭 0.5-1.5 cm, 두께 3-7 mm 정도의 크기로 성형하였다. 성형된 치밀골은 chloroform과 methanol을 1:1로 혼합한 용액에 1:50의 비율로 20일간 침지하여 탈지처리를 하였다. 탈지된 치밀골은 -80°C의 동결실에서 24시간 냉각시킨 후 동결건조기에서 수분함량이 5% 이내가 될 때까지 7일간 동결건

조 시켰다. 수분함량은 100°C의 건열기에서 1시간 건조시키는 간이건조법으로 확인하였다. 건조된 치밀골은 ethylene oxide gas로 멸균포장하여 동결건조 처리된 치밀골(freeze-dried bovine cortical bone; FFCB)로 실온에서 보관하였다.

Crude BMP의 추출

FFCB은 wheel mill로 분쇄하여 0.5-2.0 mm 크기의 분쇄골로 만들었다. 분쇄기로 분쇄되지 않는 치밀골편은 쇠절구를 이용하여 분쇄하였으며 분쇄골의 크기는 0.5-2.0 mm의 크기로 냉장고에 저장하였다. 분쇄골은 이물질 분리와 제균을 위하여 0.3 mM NaH₃ sol.에서 10분간 세정하고 상온에서 1시간 건조하였다. 건조된 분쇄골을 0.6 N HCl 액에 1:10의 비율로 침지하고 4°C에서 10 일간 교반하여 탈회하였다. 탈회된 분쇄골은 다시 0.3 mM NaH₃ sol.에서 10분간 세정하고 상온에서 1시간 건조하였다. 건조된 분쇄골을 50배의 CM sol.에서 12시간 침지하여 탈지하였다. 탈지된 분쇄골을 같은 방법으로 0.3 mM NaH₃ sol.에서 세정-건조하고 이를 -80°C의 동결건조기에서 7일간 동결건조하여 탈회와 탈지가 된 치밀골을 얻었다(defatted and demineralized cortical bone; DDM). 동결건조된 DDM에서 BMP를 추출하기 위한 용매로서 6 mol guanidine hydrochloride (6M Gdn HCl)을 사용하였다. DDM에 대한 10배의 6 M Gdn HCl액으로 4°C에서 72시간 교반하여 1차액을 추출하였다. 같은 방법으로 10배의 6 M Gdn HCl액을 교환하여 2차액과 3차액을 추출하였다. 6 M Gdn HCl액에는 내인성 유해 효소 중 단백질의 분해효소를 억제하여 BMP를 보호할 목적으로 2 mmol N-ethylmaleimide (NEM) (sigma, USA)와 1 mmol Iodo-acetic acid (sigma, USA), 1 mmol phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (sigma, USA)를 첨가하였으며, 제균을 목적으로 1 mmol sodium azide (sigma, USA)를 첨가하였다. 추출된 1-3차 추출액을 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액을 flat width 40 mm, cellulose tube (Spectra/Por Membrane, MWCO: 6000-8000, Spectrum, USA) 15 cm (5 ml/cm)에 넣고 10배의 이온수를 12시간마다 교환하여 백색의 침전물이 형성될 때까지 48-72시간 투석하였다. 투석된 백색의 침전물을 10배의 이온수로 희석하여 4°C, 4,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 침전층을 회수하였으며 이와 같은 이온수 희석을 2 회 시행하였다. 이온수로 희석된 침전액을 4°C, 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 동결건조 (-80°C)하여 crude BMP를 추출하였다.

결 과

생골의 치밀골에서 골막과 혈액 및 해면질을 제거한 치밀골 2,000 g을 CM sol.에서 20일간 처리하여 1,896 g (94.8%)을 얻어 104 g (5.2%)의 지방과 수분이 빠져나간 것을 알 수 있었다. 탈지된 치밀골을 동결건조한 결과 1,701 g을 얻

어 195 g (10.3%)의 수분이 탈수되었다. 이는 CM sol. 처리전에 비하여 299 g (15.0%)의 수분과 지방량이 손실되었음을 알 수 있었다. 즉 2 kg의 치밀골에서 85.0%인 1,701 g의 동결건조처리된 치밀골 (FBCB)을 얻을 수 있었다.

1,700 g의 FBCB를 0.5-2.0 mm의 크기로 분쇄하여 얻은 수율은 81.0%로 1,377 g이었다. 분쇄기 (wheel mill)에서 66.4%의 수율을 얻을 수 있었고 절구를 이용하였을 경우에는 67.7%의 수율을 얻을 수 있었으며 분쇄기로 분쇄되지 않는 FBCB를 절구를 병용하여 81.0%의 수율을 얻을 수 있었다. 여기에서 손실된 양은 500 µm 이하의 작은 입자이다. 이것은 생골의 치밀골에 대비하면 68.9%에 해당된다.

분쇄된 치밀골 1,300 g을 0.6 N HCl로 탈회하여 840 g (64.6%)의 탈회된 치밀골을 얻었으며 탈회량은 460g (35.4%)이었다. 탈회된 분쇄골을 12시간 CM sol.로 침지하여 재탈지를 시켰으나 치밀골량에는 변화가 없었으며 -80°C의 동결건조기에서 7일간 동결건조한 치밀골의 양은 355.5 g으로 분쇄된 치밀골에 대하여 27.4%, FBCB에 대하여 20.9% 이었다. 탈회와 탈지 및 탈수가 된 DDM 300 g을 6 M Gdn HCl 3 liter로 1차 추출하여 2,232 ml (74.4%)의 추출액을 회수하였다. 이 추출액을 원심분리하여 얻은 상층액은 2,143 ml (96%)이었으며 침전량은 89 ml (4%)이었다. 상층액 2,000 ml를 투석하여 얻은 침전물은 264 ml로 13.2%였으며 이 침전물을 이온수로 세정하고 원심분리하여 얻은 침전물은 56 ml (21.3%)이었다. 이 침전물을 동결건조하여 얻은 crude BMP는 9.7 g으로 분쇄된 동결건조 치밀골 1,300g에 대한 0.75%의 수율이며 이는 생골 2,000 g에 대한 0.49%이었다. 2차 추출에서의 crude BMP는 4.2 g으로 동결건조 분쇄골의 0.32%, 생골의 0.21%이었다. 3차 추출액에서의 crude BMP는 0.3 g으로 동결건조 분쇄골의 0.02% 생골의 0.015%이었다. 1차에서 3차에 걸쳐 얻은 총 crude BMP는 14.2 g으로 동결건조 분쇄골의 1.09%, 생골에 대해서는 0.71%를 얻을 수 있었다.

이러한 결과를 처리과정별 백분율로 crude-BMP의 수율을

환산하면 Table 1과 같다.

고 찰

골이식에 공여하기 위해 동결건조 처리한 치밀골의 이식물이 새로운 신생골의 형성을 유도한다는 사실이 임상적으로 또는 실험적으로 많이 보고 되어 있으며 이것은 동결건조처리된 치밀골내에 BMP가 함유되어 있기 때문인 것으로 알려져 있다^{1,2,10-12,15,16,22}. 그러나 동결건조 처리된 치밀골에서 BMP 추출을 하였다는 보고는 아직 접하지 못했다. 이것은 동결건조처리를 한 치밀골이 생체 내에서 신생골의 형성을 유도하는 것이 증명되었기 때문에 동결건조 처리된 치밀골에서 BMP를 측정하는 것이 의미가 없다고 생각될 수도 있으며, 또한 생골에서의 BMP 추출과정이 CM sol.로 탈지의 과정과 동결건조과정을 거치게 되기 때문에 BMP를 추출하는 치밀골은 이미 동결건조처리를 한 것과 같은 상태로 간주될 수 있기 때문일 것으로 사료된다. 그러나 실제로는 치밀골을 이식골판으로 이용할 경우 큰 형태의 이식골편이 요구되는 경우가 많기 때문에 탈지시간이 더 많이 소요될 수 있으며, 탈지기간이 20일 이상으로 긴 경우 BMP에 대한 손상의 가능성이 제기된다. 현재 BMP추출에서 이용되는 탈지기간은 4시간에서 12시간까지 다양하다¹⁶. 이것은 치밀골의 입자가 5 mm³ 이하로 작기 때문일 것이다. 실험동물을 이용한 치밀골의 이식에서도 이식골판은 비교적 작기 때문에 1-4일 까지 탈지처리가 되는 것으로 보고 되었다^{3,4,8}. 그러나 사람이나 개 등의 골 결손부에서 요구되는 이식골편은 더 큰 형태가 요구되므로 탈지기간의 연장이 필요하며, 이에 따른 BMP의 손상여부 및 신생골 형성에 미치는 영향이 검토되어야 할 것이다. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 치밀골의 크기를 두께 5-7 mm, 너비 10 mm, 길이 50-70 mm로 하고 CM sol.의 처리기간을 20일로 하였다. BMP 손상에 대한 검증은 BMP의 수율 또는 신생골 형성의 유도능력으로 생골과 대비되어 평가해야 할 것이다.

Table 1. The yield of BMP according to processing of bovine cortical bone.

Processing	Yield based on lyophilized cortical bone weights (percentage)			
	wet cortical bone fresh	0.5~2.0 mm particles	freeze-dried DDM	crude BMP
wet cortical bone fresh (2kg)	100.0%			
chloroform-methanol sol	94.8%			
freeze-dried cortical bone(FBCB)	84.9%			
0.5~2.0mm particles	68.8%	100.0%		
demineralized-defatted	44.5%	64.6%		
freeze-dried(DDM)	18.9%	21.2%	100.0%	
1st extraction	0.49%	0.71%	2.59%	69.0%
2nd extraction	0.21%	0.31%	1.11%	29.6%
3rd extraction	0.015%	0.02%	0.08%	2.1%
Total Crude BMP	0.71%	1.09%	3.76%	100%

동결건조 처리된 치밀골에서 crude-BMP를 추출하여 동결 건조시킨 상태의 수율은 생골에 대해서는 0.71%, 동결건조 골에 대해서는 1.09%, 골기질 (DDM)에 대해서는 4.73%에 해당하는 양을 얻었다. 이러한 수율은 지금까지 모든 동물의 치밀골에서 얻은 어느 수율보다도 높게 나타났다. 즉 지금까지 생골에 대한 crude-BMP의 수율에서 Urist (1984)는¹⁹ 0.053%를 보고하였으며 가장 높은 수율을 보고한 Shibahara (1995)의¹⁶ 0.44% 보다 높게 나타났다.^{2,16,19} 이와 같이 높게 나타난 수율은 DDM의 높은 수율과 Gdn-HCl의 추출 횟수 때문인 것으로 생각된다. DDM 수율은 Urist (1984)은¹⁹ 14%, Mizutani (1982)은¹² 12%로 보고하였으며 Urist (1979)는²⁰ 토끼에서 25.6%의 수율을 보고한 바 있다. 본 실험에서는 소에서 17.8%로 나타나 다른 연구자들 보다 약간 높았다. 또한 치밀골에서 BMP를 Gdn-HCl로 추출할 경우에 2회 이상 반복하여 BMP를 추출한 일이 없었으나 본 연구에서 3회 반복 추출한 것이 원인인 것으로 생각된다. Mizutani (1993)는¹¹ 소의 치아에서 BMP를 3회 추출한 일이 있으나 추출회수별 수율에 대해서는 밝히지 않았다. 여기에서 Mizutani (1993)는¹¹ DDM은 12%를 얻었으며 crude-BMP는 0.036%의 수율을 보고하였다. 치아에서 3회의 Gdn-HCl 추출에도 불구하고 본 연구에서의 17.8%의 DDM이나 0.71%의 crude-BMP 수율보다 낮은 수율을 나타낸 것은 치아의 치밀한 구조 때문인 것으로 생각된다. 또한 본 실험의 결과에서 총 0.71%의 crude-BMP 수율 중 1차 추출에서 얻은 수율은 0.49% (9.7 g)이었고 총 crude-BMP의 68.3%를 차지했으며, 2차에서는 0.21% (4.2 g)이었고 총 crude-BMP의 29.6%를 차지하여 1, 2차 추출에서 전체의 97.9%의 수율을 얻을 수 있었다. 즉 1차 추출만으로는 약 70% 정도의 BMP 밖에 추출할 수 없기 때문에 Gdn-HCl 추출은 2회의 추출이 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 crude-BMP의 Gdn-HCl 추출에 관한 지금까지의 연구에서 용매의 비율은 치밀골에 대한 10배의 용량으로 추출하며, 농도는 4-6 mol을 적용하고 있고 추출온도는 BMP의 변성을 억제하기 위하여 4°C에서 추출하고 추출시간은 12-48시간이 적용되고 있으나^{7,12,16}, 효과적인 crude-BMP의 추출을 위해서는 Gdn-HCl 용매의 추출농도와 용량 그리고 추출온도와 시간의 영향에 관한 조사가 이루어져야 할 것이다. 이러한 조사의 일환으로 Gdn-HCl 추출용매를 20배로 한 예비실험에서 1차 추출에 crude-BMP의 82.3%가 추출된바 있다. 그러나 crude-BMP의 1차 추출과 2차 추출액의 골아세포 분화유도 능력의 차이는 아직 조사되지 않았다. 또한 crude-BMP의 수율만으로 BMP를 평가할 수는 없으며 신생골의 유도능력은 앞으로 순수하게 분리된 BMP와 이들의 생체이식에서 평가되어야 할 것이다.

결 론

순수한 소뼈의 치밀골 2,000 g에서 84.9%의 동결건조골과 17.8%의 DDM 및 0.71%의 crude-BMP를 얻을 수 있었다. 본 실험에서 다른 연구자들 보다 높은 DDM 수율을 얻은

이유는 Gdn-HCl로 BMP를 3차에 걸쳐 추출한 것이 그 원인으로 생각된다. Gdn-HCl용액의 1차 추출에서 전체 crude BMP 수율의 68.3%, 2차에서 29.6%, 3차에서는 2.1%를 얻을 수 있었다. 따라서 Gdn-HCl의 BMP추출은 2회 추출이 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 crude-BMP의 높은 수율이 순수한 BMP의 높은 수율이나 신생골 유도능력의 우수성을 의미하는 것은 아니므로 진정한 BMP의 높은 수율은 crude-BMP의 순수분리와 생체내 신생골 유도능력으로 평가되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Bessho K, Tagawa T, Murata M. Purification of bone morphogenetic protein derived from bovine bone matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 595-601.
- Bentz H, Nathan RM, Rosen DM, et al. Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J Biol Chem* 1989; 264: 20805-20810.
- Blanco J, Alonso A, Sanz M. Long-term results and survival rate of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year case series prospective study. *Clin Oral Implants Res* 2005; 16: 294-301.
- Cammack GV, Nevins M, Clem DS, et al. Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005; 25: 231-237.
- Friedlaender GE. Current concept review Bone-banking. *J Bone Joint Sur.* 1982; 64-A: 307-311.
- Galea G, Kearney JN. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. *Transfusion Med Rev.* 2005; 15: 165-174.
- Jortikka L, Marttinen A, Lindholm TS. High yield of osteoinductivity can be derived from demineralized bone matrix using collagenase digestion. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 1993; 207: 31-35.
- Kakiuchi M. Bone allograft and its clinical application - defatted, gas-sterilized bone allograft. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1994; 68: 26-35.
- Ono K. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas, part 2. *Int Orthop* 1996; 20: 147-152.
- Kim NH, Yang KH, Lee HM, et al. Purification of porcine bone morphogenetic protein. *J Kor Orthop Assoc* 1991; 26: 232-238.
- Mizutani H, Mera K, Ueda M. A study of the bone morphogenetic protein derived from bovine demineralized dentin matrix. *Nagoya J Med Sci* 1993; 59: 37-47.
- Mizutani H, Urist MR. The nature of bone morphogenetic protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. *Clin Orthop* 1982; 171: 213-223.
- Rougraff BT. Bone graft alternatives in the treatment of benign bone tumors. *Instr Course Lect* 2005; 54: 505-512.
- Oksanen J, Marttinen A, Paatsama S. Extraction and characterization of native canine bone morphogenetic protein (cBMP) qualified with osteoinductivity *Acta Vet Scand.* 1998; 39: 165-171.
- Sampath TK, Muthukumar N, Raddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix associated bone-inductive protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 87: 7109-7111.

16. Shibahara T, Noma H, Yama M, et al. Purification and characterization of bone morphogenetic protein derived from bovine bone matrix. *Bull Tokyo Dent Coll* 1995; 36: 75-82.
17. Strates BS, Urist MR. Origin of the inductive signal in implants of normal and lathyritic bone matrix. *Clin Orthop Rel Res* 1969; 66: 226-240.
18. Thoren K, Aspenberg P, Thorngren KG. Lipid extracted bank bone. *Clin Orthop Rel Res* 1995; 311: 232-246.
19. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 371-375.
20. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76: 1828-1832.
21. Vajaradul Y. Bangkok biomaterial center: 15 years experience in tissue banking. *Cell Tissue Bank* 2000; 1: 229-239.
22. Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*. 2002 15; 27: S2-8.
23. Yoshimura Y, Hirano A, Nishida M, et al. Purification of water-soluble bone-inductive protein from bovine demineralized bone matrix. *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 444-447.