

文章编号: 1004-0374(2013)08-0779-08

## 显微CT技术在古生代鱼类研究中的应用

盖志琨\*, 朱 敏

(中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室, 北京 100044)

**摘要:** 高分辨率计算机断层扫描(显微CT, micro-CT)已逐渐成为古生物学研究的重要支撑手段。研究者可以在不破坏珍贵化石样品的情况下,取得微米级或亚微米级的高分辨率三维断层图像。根据X光源不同,高分辨率CT可以分为工业用显微CT和同步辐射显微CT,两者相互补充,满足了对多数化石材料的无损探测要求。目前,显微CT技术在古生代鱼类的脑颅三维重建和骨组织学显微成像上已经有了比较成熟的应用,从而为脊椎动物早期演化史上的若干重大问题(如颌的起源、牙齿的发育和脑的演化等)取得突破性进展提供了关键的技术支撑。

**关键词:** 显微CT; 同步辐射; 古生代鱼类; 脑颅; 骨组织学

**中图分类号:** Q91-3; Q915.862 **文献标志码:** A

## Application of micro-CT in the research on Paleozoic fishes

GAI Zhi-Kun\*, ZHU Min

(Key Laboratory of Vertebrate Evolution and Human Origins, Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100044, China)

**Abstract:** The high-resolution computed tomography (CT) has become a powerful tool in paleontology, providing three-dimensional (3D) tomographic images at micron or sub-micron resolution without damaging fossil samples. According to the X-ray sources, the high-resolution CT includes the industrial X-ray microtomography and synchrotron X-ray microtomography. The two micro-CTs complement each other to meet nondestructive investigations of fossil materials with a broad size range. Currently, the micro-CT technique has been successfully applied to the research on Paleozoic fishes, e.g. 3D reconstruction of fish braincase and imaging of microstructure of bone tissue. Thanks to the development of industrial and synchrotron micro-CT, breakthroughs have been achieved in understanding early vertebrate evolution, such as the origin of the jaw, tooth development and brain evolution.

**Key words:** micro-CT; synchrotron; Palaeozoic fishes; braincase; histology

鱼类从古生代的寒武纪(约5.4亿前)开始出现,到泥盆纪末期(约3.6亿年前)它们不仅衍生出了许多与现代鱼类很近似的类群,而且成功登上陆地演化出四足动物或陆地脊椎动物(图1)。古生代鱼类的演化涉及到脊椎动物、有颌类、硬骨鱼类的起源以及肉鳍类登陆等重大演化事件(图1),其研究一直是古生物学、演化-发育生物学最前沿课题之一<sup>[1-7]</sup>。近年来,应用高分辨率计算机断层扫描(显微CT, micro-CT),特别是同步辐射显微CT对古生物化石开展高精度无损探测,并建立三维虚拟模型,已经成为古生物学研究越来越受欢迎的方

法。显微CT不仅能够提供化石内部解剖结构的高分辨率断层图像,而且能够提供准确的体积、空间分布、方向和大小,以及生物埋藏学和成岩过程等信息<sup>[8-13]</sup>。目前,这一新技术在古生代鱼类研究中有了比较成熟的应用,从而为脊椎动物早期演化史

收稿日期: 2013-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(41202015, 4093-0208); 现代古生物学和地层学国家重点实验室(中国科学院南京地质古生物研究所)(123101)

\*通信作者: E-mail: gaizhikun@ivpp.ac.cn

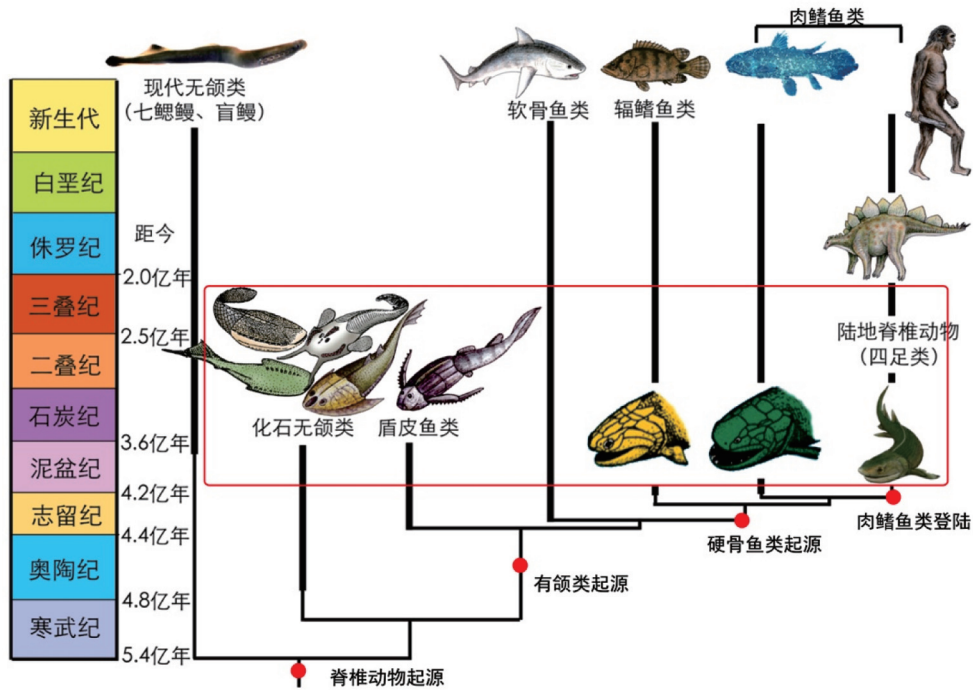


图1 古生代鱼类系统分类图及地史分布图

上的若干重大问题 (如颌的起源、牙齿的发育和脑的演化等) 取得突破性进展提供了关键支撑<sup>[1-4]</sup>。

### 1 古生代鱼类三维数据的获取方法

#### 1.1 经典的连续磨片法

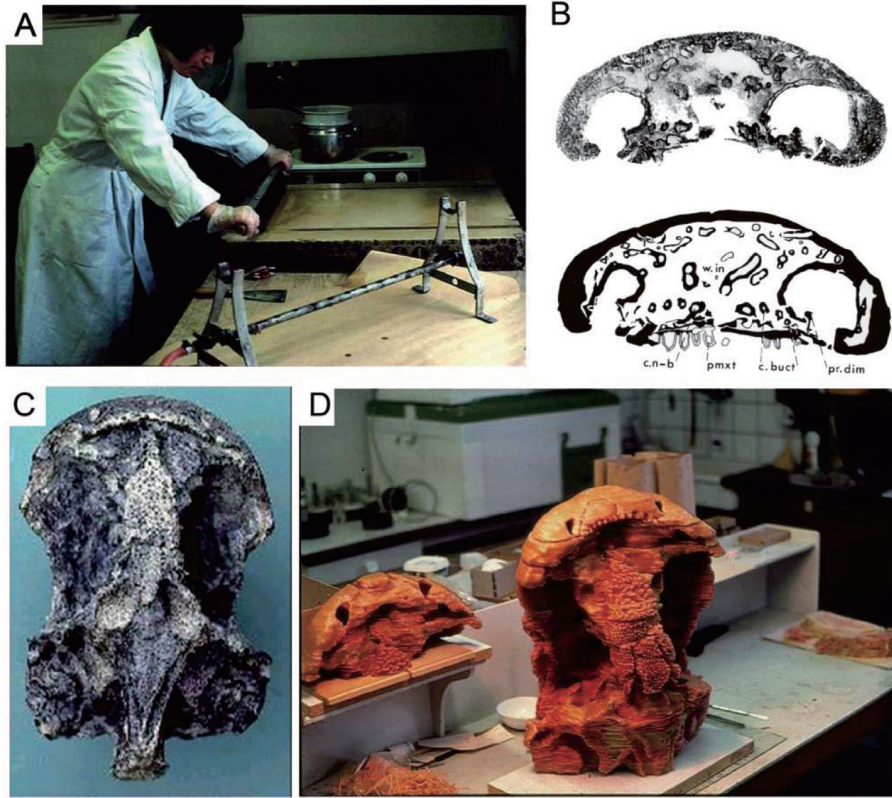
早期获取脊椎动物化石三维数据的方法是经典的连续磨片法, 该方法由 W. J. Sollas 发明<sup>[14]</sup>, 简单说就是拿一块化石磨掉薄薄的一层, 画一个切面图, 再磨掉一薄层, 再画一个切面, 直到整块化石磨完为止 (与胚胎学用的切片很相近), 最后经过光学放大制作三维蜡质模型。该方法被瑞典古生物学家 E. A. Stensiö 及其追随者在 20 世纪广泛应用于包括骨甲鱼类<sup>[15-16]</sup>、盾皮鱼类<sup>[17]</sup>和肉鳍鱼类<sup>[18-19]</sup>等早期脊椎动物脑颅的三维复原。我国在这一方面经典的工作是张弥曼院士应用连续磨片法对杨氏鱼脑颅的细致研究<sup>[19]</sup>(图 2), 从根本上动摇了以孔鳞鱼类为代表的早期肉鳍鱼类具有内鼻孔的这一权威结论, 在国际上引起了关于肉鳍鱼类系统关系和四足动物起源问题的反思与热烈讨论。

经典的连续磨片法虽然能够获取大量的脑颅信息, 但是不得不破坏珍贵的化石标本, 同时也是一种非常耗费时间与精力的方法。由于早期脊椎动物脑颅化石材料十分珍贵, 使得对古生代鱼类各个类群脑颅的详细比较解剖学研究在 20 世纪后期一直处

于停滞不前的状态。

#### 1.2 工业用显微CT

X 射线计算机断层扫描技术 (CT) 的发明提供了一种无损探测化石内部解剖结构的方法。这种方法可以获得空间分辨率能与经典连续磨片法相媲美的断层图像数据, 并且数据的获取更加迅速和省力<sup>[20]</sup>。这项新技术最先在医学中应用和发展, 随后扩展到工业生产的各个领域。传统的工业用 CT, 从笔束、扇束发展到三维锥束和密集平行光束, 已有四代。目前, 能够提供不同空间分辨率 (从 5 μm 到 100 μm) 断层扫描成像以满足不同领域的需求。高分辨率工业用显微 CT 在古生物学研究中的作用很快被意识到了<sup>[21]</sup>, 并被广泛应用到了古生代鱼类的不同类群上, 如盾皮鱼类<sup>[6]</sup>、软骨鱼类<sup>[3, 7, 22-26]</sup>、肉鳍鱼类<sup>[4-5]</sup>等。目前, 中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室新建成的 225 kV-3D-工业用显微 CT 和 450 kV-通用型工业用 CT 已经投入使用, 其中 225 kV 工业用显微 CT 非常适合古生代鱼类脑颅的无损探测 (图 4A、B), 其设计的扫描方式为三维锥束 X 射线三代扫描, 有效扫描范围为 φ100 mm, 有效扫描高度为 100 mm, 样本最大重量 10 kg, 射线穿透最大厚度 35 mm(Fe), 密度分辨率为 1%。对不同直径样本的扫描分辨率分别是: 直径 8 mm 样品—5 μm, 直径 25 mm 样品—



A, 张弥曼院士在瑞典应用经典的连续磨片法制作杨氏鱼 (*Youngolepis*) 脑颅的蜡质模型; B, 杨氏鱼脑颅的连续磨片; C, 杨氏鱼的脑颅标本; D, 杨氏鱼脑颅的蜡质模型

图2 经典的连续磨片法(A~D图片均由张弥曼院士提供)

15  $\mu\text{m}$ , 直径 50 mm 样品—30  $\mu\text{m}$ , 直径 100 mm 样品—60  $\mu\text{m}$ 。目前 225 kV-3D-工业用显微 CT 在古生代鱼类取得的突出进展之一便是对最古老的基于四足动物——奇异东生鱼颅腔以及相关的神经、血管等结构的三维成像 (图 3), 揭示了基于四足动物脑的基本形态, 表明陆生脊椎动物某些重要脑部特征 (如腺垂体结节部) 在四足动物支系演化的最初期就已经形成<sup>[4]</sup>。

1.3 同步辐射显微CT

工业用显微 CT 虽然能够得到高分辨率的三维数据, 但是当化石标本高度矿化或尺寸非常小的时候 (如寒武纪胚胎化石), 其应用会受到诸多限制。所受限制主要来自工业用 CT 的多色光谱 X 射线源, 以及化石的内在本质 (高度矿化的样品密度对比度往往非常低)<sup>[9]</sup>。要取得更高空间分辨率和密度分辨率的话, 就需要同步辐射 X 射线源。同步辐射作为一种高灵敏度的 X 射线源, 把显微 CT 成像的分辨率推到了亚微米的级别。与传统的工业用显微 CT 相比, 同步辐射显微 CT 有许多优点: (1) 光源的单色性可以最大限度地避免光束硬化, 这对区分出古

生物化石围岩与骨组织具有非常重要的意义; (2) 高亮度的 X 射线光束使得数据的获取非常的迅速, 配合高分辨率探测器使用能够保证化石内部结构的精确绘制; (3) 同步辐射 X 射线束的准相干性使得基于相位衬度的断层扫描成为可能。该方法主要基于准平行的 X 射线束穿透样品后的相位变化反映样品内部不同电子密度信息, 从而大大提高了图像的对比度<sup>[8-9, 12]</sup>。但是, 由于同步辐射 X 射线束光斑较小, 使得同步辐射显微 CT 在扫描尺寸上受到诸多限制, 如瑞士光源的同步辐射 TOMCAT 线站 (图 4C) 一次只能提供 7 mm 的扫描高度和 7.15 mm  $\times$  7.15 mm 的扫描视域。

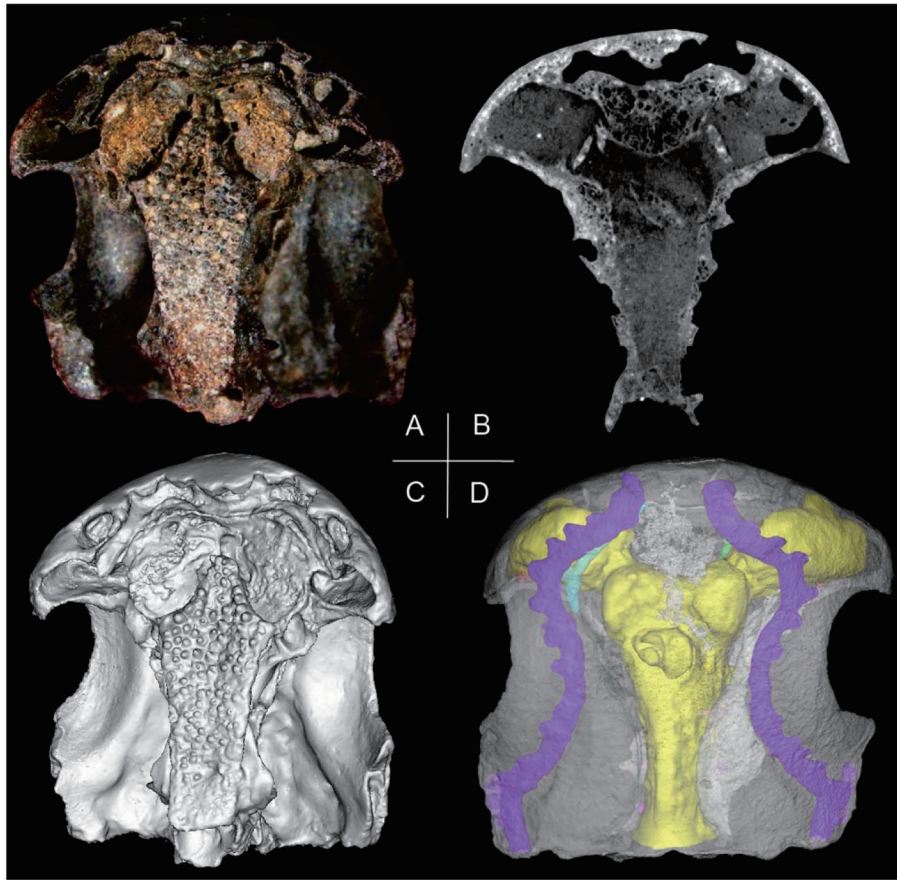
2 同步辐射显微CT在古生代鱼类中的研究进展

目前, 同步辐射显微 CT 在古生代鱼类脑颅的三维重建和骨组织学的显微成像上已经有了比较成熟的应用, 从而在一些关键的演化问题上取得了突破性进展, 如颌的起源、牙齿的发育等<sup>[1,3]</sup>。

2.1 对无颌类曙鱼脑颅的三维虚拟重建

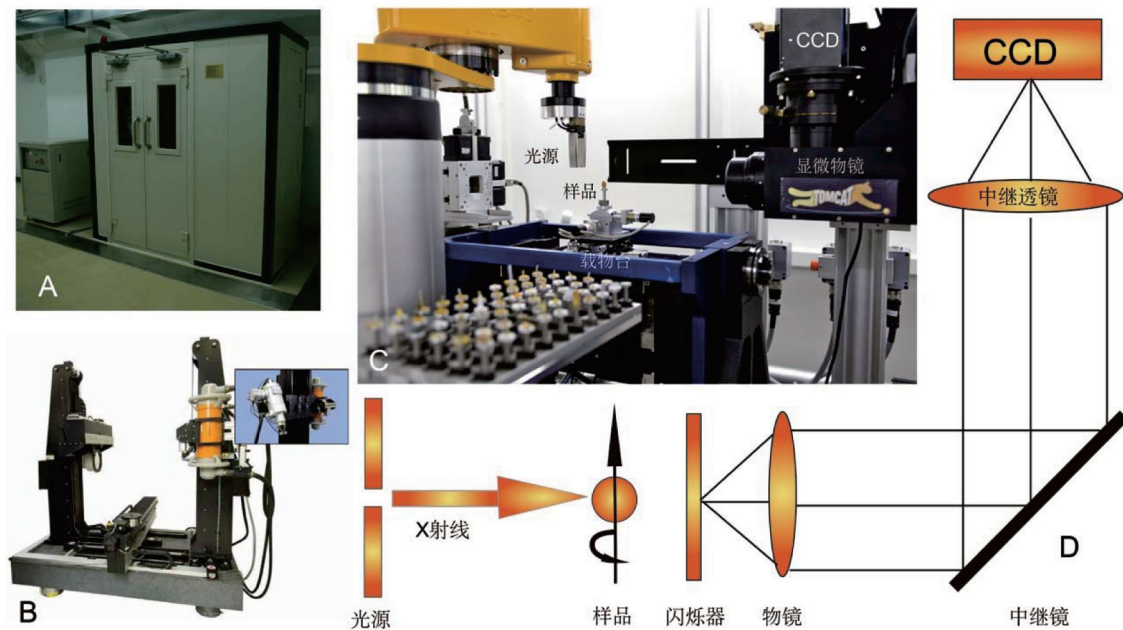
从 2006 年起, 本课题组开始借助瑞士光源的





A, 奇异东生鱼脑颅化石, 标本 IVPP V10687, 腹视; B, 奇异东生鱼脑颅断层显微成像, 水平切片; C、D, 奇异东生鱼脑颅的三维虚拟复原(C, 腹视; D, 背视)

**图3 应用225 kV-3D工业用显微CT对奇异东生鱼的脑颅显微成像及三维虚拟复原(卢静博士供图)**



A、B, 225 kV-3D 工业用显微CT (中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室); C, 同步辐射显微CT (瑞士光源 TOMCAT线站), 从左至右分别为X射线源、样品载物台、探测成像设备, 所有设备部件都安装在一个在垂直方向上可以精确调整的操控板上(图片由瑞士光源Stampanoni教授提供); D, 高分辨显微CT基本原理图<sup>[12]</sup>

**图4 高分辨率显微CT装置**

同步辐射显微 CT 对采自 4 亿多年前中国志留系盔甲鱼类曙鱼脑颅开展精细的比较解剖学研究。盔甲鱼类是“甲胄鱼类”中一个地方性色彩很浓的类群, 目前仅发现于中国和越南北部, 在系统发育关系上被认为是有颌类的基干类群, 是解开脊椎动物颌的起源之谜的一个关键类群。同时, 盔甲鱼类是除骨甲鱼类之外, 惟一个具有钙化脑颅三维保存的“甲胄鱼类”<sup>[27]</sup>。在长期的野外调查中, 本课题组在浙江长兴志留系茅山组的地层当中, 采集到了大量早期盔甲鱼类曙鱼的标本, 其中有 7 件标本 (IVPP V14334.1~7) 特异保存了三维立体的脑颅。盔甲鱼类的脑颅是一整块大的软骨 (内骨骼), 背面覆盖着一层很薄的连续的膜质骨 (外骨骼), 内部包裹着脑、感觉器官、脑神经以及头部血管等, 腹面覆盖着一个大的梨形口鳃腔<sup>[28]</sup>。古生代鱼类脑颅大多为软骨, 一般很难保存为化石, 但因软骨表层经常有一层球状钙化软骨或者软骨外成骨<sup>[29-30]</sup>, 或者脑颅内部的空腔被沉积物填充形成一个自然内模, 因此通过同步辐射显微 CT 可以清楚地揭示出古生代鱼类脑颅内部详细的解剖结构。浙江曙鱼是一种小型的盔甲鱼类, 脑颅大小只有 10 mm × 10 mm, 尺寸非常适合同步辐射显微 CT 扫描。

本次研究中本课题组采用瑞士光源的同步辐射 TOMCAT 线站 (图 4C) 对曙鱼的脑颅标本进行无损化的体积扫描。该同步辐射显微 CT 由同步辐射 X 射线源、样品载物台和显微成像系统组成 (图 4C、D)。同步辐射 X 射线源能够产生一束 7 mm 平行单色 X 射线束, 因此一次只能完成 7 mm 的扫描高度。对曙鱼脑颅标本而言, 大多数标本的高度都在 7 mm 以内, 因此只需一次扫描便可获取完整的脑颅显微图像, 只有标本 V14334.5 高度超过 7 mm, 需要在垂直方向上顺序执行两次独立的扫描, 所得数据在三维重建软件 AVISO 上合并在一起, 并删除两次扫描中的重叠数据。样品载物台安装在一个在垂直方向上可以精确调整高度的操控板上。样品首先被固定在一个直径 2 cm 的圆柱铜桩上, 然后安装到载物台上, 可做 360° 旋转, 对标本进行透视预览 (图 4C、D)。显微成像系统由闪烁器、显微镜、中继镜和数码成像系统组成。闪烁器能够将通过样品的 X 射线转换成可见光, 然后通过显微镜等光学系统放大, 经中继镜反射投影到一台数码相上, 最终达到显微成像的目的 (图 4C、D)。瑞士光源的数码成像系统是一台能够快速读出的低噪音 CCD 相机, 可以记录标称 14 位的 2 048 × 2 048 像素的

全帧图像, 读取时间为 260 ms。我们使用的显微镜为 4 × PLAPO 物镜, 选用 2 倍的放大倍率, 其视域为 7.15 mm × 7.15 mm, CCD 图像分辨率为 2 048 × 2 048 像素, 因此可得到的图像分辨率为 1.85 μm。曙鱼脑颅大小约 10 mm × 10 mm, 因此一些标本会轻微超出显微目镜的视域, 但是脑颅的关键结构都被记录下来。

在一个总的 180° 的旋转范围内, 以 0.12° 角度增量对每个标本进行体数据扫描, 因此每个标本可产生 1 501 张体数据投影图, 每个角度增量的曝光时间约 100 ms。所得的体数据在 32 位的 Linux PC 工作站上采用高度优化的滤波反投影程序进行重建, 因此整个的体数据信息在扫描后的几分钟便可转化为连续断层切片数据。在 2 GHz 的英特尔处理器和 16 GB RAM 的惠普工作站上采用 AVISO 三维虚拟重建软件 <www.tgs.com> 进行脑颅内模的三维虚拟复原。在不影响重建效果的前提下, 将 32 位的 2 048 × 2 048 像素的原始数据转化为 8 位的 1 024 × 1 024 像素的取样数据, 以减少三维数据的运算量, 但仍能保证足够的空间分辨率 (3.5 μm) 和密度分辨率。AVISO 软件允许约 1 GB 的数据保存在内存中, 并能够同时从三个方向的正交平面进行数据预览和重建。

应用 AVISO 三维虚拟重建软件, 本课题组用了 3 年的时间, 重建了 7 个曙鱼脑颅标本, 在只有指甲大小的脑颅里, 几乎复原了所有脑、感觉器官及头部神经与血管的通道 (图 5)。初步研究结果显示: 盔甲鱼的脑颅结构已经发生了关键的重组, 成对鼻囊位于口鼻腔的两侧, 垂体管向前延伸, 并开口于口腔, 与七鳃鳗和骨甲鱼类的鼻垂体复合体完全不同, 而与有颌类的非常相似。盔甲鱼类面部特征的这一显著变化与发育生物学家 2002 年发表在 *Science* 上的建立起来的颌的发育模型非常吻合, 代表了在颌演化过程中的一个非常关键的中间环节, 从而为解开脊椎动物颌的起源之谜提供了关键的化石证据<sup>[1, 27, 31]</sup>。2011 年 8 月, 研究成果在 *Nature* 以封面推荐文章的形式发表<sup>[1]</sup>, 马上引起国际学术界的广泛关注。

## 2.2 对古生代鱼类骨组织学的显微成像

同步辐射显微 CT 在古生代鱼类的另一个成功应用是对盾皮鱼类 (*Compagopiscis*) 外骨骼和牙齿组织学的研究<sup>[2, 10-11]</sup>。骨组织是研究脊椎动物骨骼生长模式、速率、机械性能、肌肉附着及其他周边组织的重要信息来源<sup>[32]</sup>。同步辐射显微 CT 可以高





A, 浙江曙鱼脑颅化石, IVPP V 14334.1; B, 浙江曙鱼脑颅断层显微成像, 水平切片; C、D, 浙江曙鱼脑颅的三维虚拟复原 (C, 背视; D, 腹视)

图5 应用同步辐射显微CT对曙鱼脑颅的显微成像及三维虚拟复原

分辨率地三维再现骨骼及牙齿的组织学微观结构, 成像效果可与传统的光学显微成像相媲美。在对盾皮鱼类 *Compagopiscis* 间侧片骨组织的三维组织学研究中, 高达  $0.678\ \mu\text{m}$  的高分辨率使得骨骼内微小的脉管通道, 甚至骨细胞陷窝都清晰可见 (图 6C~E)。同时, 多分辨率扫描、边缘增强、相位衬度等多技术手段的综合运用, 使得嵌入骨骼内部细微特征, 如原来工业用显微 CT 无法观察到的生长线、吸收线以及骨纤维等, 都可以获得清晰成像 (即使其密度与周围的材料很接近) (图 6B~E)。至关重要的是, 所获得的三维数据使得研究者可以观察骨细胞陷窝在空间上的分布以及众多脉管的三维走向, 这些信息都是传统的二维切片研究无法获取的。因此, 这些信息将为研究骨骼在三维上的生长过程提供重要的数据支持。

由于古生代鱼类大部分只保存为零碎的外骨骼碎片, 所能提取的形态信息非常少。因此, 通过同步辐射显微 CT, 能够更深入地挖掘零散骨片内部

组织学的三维信息, 并为解释某些重要的特征带来新的契机。古生代鱼类的骨骼及其他硬组织的三维组织学信息很可能成为解决一些重要特征演化和早期脊椎动物系统发育关系的关键数据来源。例如, 最近 Rücklin 等<sup>[2]</sup>通过对盾皮鱼类 *Compagopiscis* 颌骨及牙齿系列化石标本进行同步辐射显微 CT 成像研究 (图 6B), 实现了颌骨内细胞和生长线的可视化, 显示出 *Compagopiscis* 的牙齿由齿质、骨质和髓腔组成, 并且其齿序的发育过程与现生的有颌脊椎动物一致, 都表现为一种线性的规则生长模式, 这表明盾皮鱼类的节甲鱼类可能已经具有了真正的牙齿发育模式, 证明节甲类可能是最早具有真正牙齿的脊椎动物。结合其他盾皮鱼类的对比研究将可能进一步揭示有颌类牙齿这一重要特征在其起源阶段的演化过程。

### 3 结论

显微 CT 目前已经成为支撑古生物研究的一项

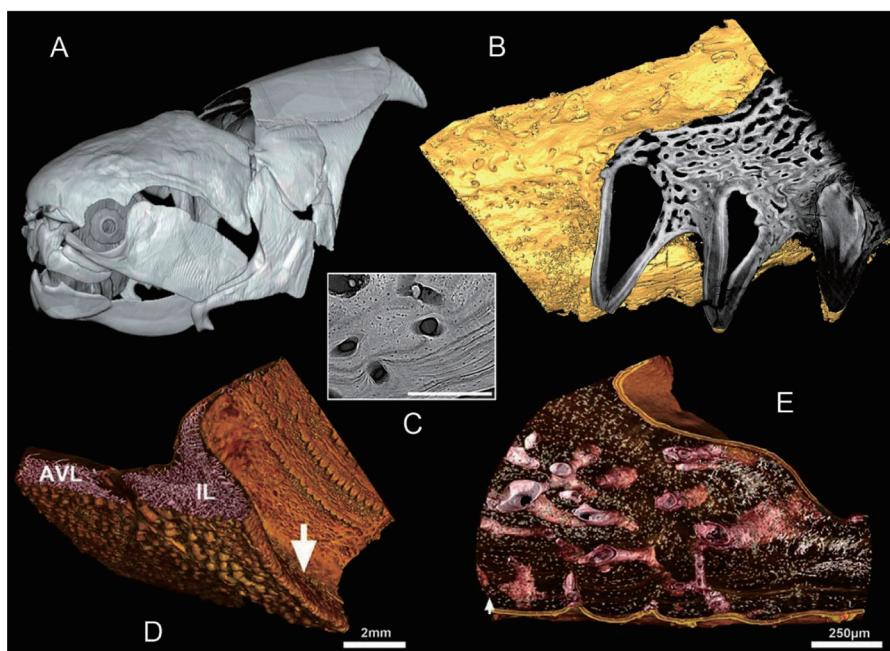


图6 应用同步辐射显微CT对盾皮鱼类*Compagopiscis*间侧片(IL)和牙齿组织学显微成像及三维虚拟重建(A、B, 由Rücklin博士供图; C~E, 引自参考文献[11], Figure.7)

非常强大的技术,能够在不破坏珍贵化石样品的情况下,取得微米级或亚微米级的高分辨率断层图像。应用工业用显微CT和同步辐射显微CT对古生物化石标本进行无损扫描和三维虚拟重建,开展精细的形态学、比较解剖学、形态功能学研究已经成为国际上古生物学研究的大势所趋,两种显微CT相互补充,相得益彰,满足了对多数化石材料的无损探测要求。目前,两种显微CT技术在古生代鱼类的脑颅三维重建和骨组织学显微成像上已经有了比较成熟的应用,从而为脊椎动物早期演化史上的若干重大问题(如颌的起源、牙齿的发育和脑的演化等)取得突破性进展提供了关键的技术支持。

**致谢:**感谢张弥曼、卢静、吴飞翔、Marco Stampanoni、Martin Rücklin等先生为文稿提供精美的插图;瞿清明为文稿的修改提出诸多建议,侯叶茂工程师提供了225 kV工业用显微CT的扫描参数,在此一并表示诚挚的谢意!

#### [参 考 文 献]

- [1] Gai ZK, Donoghue P, Zhu M, et al. Fossil jawless fish from China foreshadows early jawed vertebrate anatomy. *Nature*, 2011, 476: 324-7
- [2] Rücklin M, Donoghue P, Johanson Z, et al. Development of teeth and jaws in the earliest jawed vertebrates. *Nature*, 2012, 491: 748-52
- [3] Pradel A, Langer M, Maisey JG, et al. Skull and brain of a 300-million-year-old chimaeroid fish revealed by synchrotron holotomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (13): 5224-8
- [4] Lu J, Zhu M, Long JA, et al. The earliest known stem-tetrapod from the Lower Devonian of China. *Nat Commun*, 2012, 3: 1160
- [5] Zhu M, Yu XB, Lu J, et al. Earliest known coelacanth skull extends the range of anatomically modern coelacanths to the Early Devonian. *Nat Commun*, 2012, 3: 772
- [6] Burrow CJ, Jones AS, Young GC. X-ray microtomography of 410 million-year-old optic capsules from placoderm fishes. *Micron*, 2005, 36(6): 551-7
- [7] Pradel A, Tafforeau P, Maisey JG, et al. A new Paleozoic Symmoriiformes (Chondrichthyes) from the Late Carboniferous of Kansas (USA) and cladistic analysis of early Chondrichthyans. *PLoS One*, 2011, 6(9): 1-22
- [8] Stampanoni M, Groso A, Isenegger A, et al. Trends in synchrotron-based tomographic imaging: the SLS experience[M] // Bonse VU. *Developments in X-Ray Tomography*. Proc SPIE, 2006, 6318: 63180M-1-14
- [9] Tafforeau P, Boistel R, Boller E, et al. Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimens. *Appl Phys A-Mater Sci Process*, 2006, 83(2): 195-202
- [10] Sanchez S, Ahlberg PE, Trinajstić KM, et al. Three-dimensional synchrotron virtual paleohistology: A new insight into the world of fossil bone microstructures. *Microsc Microanal*, 2012, 18(05): 1095-105
- [11] Sanchez S, Dupret V, Tafforeau P, et al. 3D microstructural architecture of muscle attachments in extant and fossil vertebrates revealed by synchrotron microtomography.

- PLoS One, 2013, 8(2): e56992
- [12] Stampanoni M, Borchert G, Wyss P, et al. High resolution X-ray detector for synchrotron-based microtomography. Nucl Instrum Methods Phys Res A, 2002, 491: 291-301
- [13] Stampanoni M, Groso A, Isenegger A, et al. TOMCAT: A beamline for TOMographic Microscopy and Coherent rAdiology experimenTs. Synchr Radiat Instrum, Pts 1 and 2, 2007, 879(1): 848-51
- [14] Sollas WJ. A method for the investigation of fossils by serial sections. Phil Trans R Soc B, 1903, 196: 259-63
- [15] Stensiö EA. The Downtonian and Devonian vertebrates of Spitsbergen. Part 1. Family Cephalaspidae[M]. Oslo: I Kommissjon Hos Jacob Dybwad, 1927
- [16] Janvier P. *Norselaspis glacialis* n.g., n.sp. et les relations phylogénétiques entre les Kiaeraspidiens (Osteostraci) du Dévonien Inférieur du Spitsberg. Palaeovertebrata, 1981, 11(2-3): 119-31
- [17] Stensiö EA. Elasmobranchiomorphi Placodermata Arthrodiros [M] // Piveteau J. Traité de Paléontologie. Paris: Masson, 1969: 71-692
- [18] Stensiö EA. The brain and the cranial nerves in fossil lower craniate vertebrates[M]. Oslo: Mat.-naturv. Kl., 1963
- [19] Chang MM. The braincase of *Youngolepis*, a Lower Devonian crossopterygian from Yunnan, south-western China [D]. Stockholm: University of Stockholm, Department of Geology, 1982
- [20] Ketcham RA, Carlson WD. Acquisition, optimization and interpretation of X-ray computed tomographic imagery: applications to the geosciences. Comput Geosci-UK, 2001, 27: 381-400
- [21] Conroy GC, Vannier MW. Noninvasive three-dimensional computer imaging of matrix-filled fossil skulls by high-resolution computed tomography. Science, 1984, 226: 456-8
- [22] Maisey JG. A primitive chondrichthyan braincase from the Middle Devonian of Bolivia [M] // Ahlberg PE. Major events in early vertebrate evolution: palaeontology, phylogeny, genetics and development. London: Taylor & Francis, 2001: 263-88
- [23] Maisey JG. CT-Scan reveals new cranial features in Devonian chondrichthyan “*Cladodus*” *wildungensis*. J Vertebr Paleontol, 2001, 21(4): 807-10
- [24] Maisey JG. Endocranial morphology in fossil and recent chondrichthyans[M] // Arratia G, Wilson MVH, Cloutier R. Recent Advances in the Origin and Early Radiation of Vertebrates. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil, 2004: 139-70
- [25] Maisey JG. Morphology of the braincase in the Broadnose Sevengill shark *Notorynchus* (Elasmobranchii, Hexanchiformes), based on CT scanning. Am Mus Novit, 2004, 3429: 1-52
- [26] Maisey JG. Braincase of the Upper Devonian shark *Cladodoides wildungensis* (Chondrichthyes, Elasmobranchii), with observations on the braincase in early chondrichthyans. Bull Am Mus Nat Hist, 2005, 288: 1-103
- [27] Gai ZK, hu M. The origin of the vertebrate jaw: Intersection between developmental biology-based model and fossil evidence. Chin Sci Bull, 2012, (30): 3819-28
- [28] Janvier P. Early Vertebrates [M]. Oxford: Clarendon Press, 1996
- [29] Zhu M, Janvier P. The histological structure of the endoskeleton in galeaspids (Galeaspida, Vertebrata). J Vertebr Paleontol, 1998, 18(3): 650-4
- [30] Wang NZ, Donoghue P, Smith MM, et al. Histology of the galeaspid dermoskeleton and endoskeleton, and the origin and early evolution of the vertebrate cranial endoskeleton. J Vertebr Paleontol, 2005, 5(4): 745-56
- [31] Shigetani Y, Sugahara F, Kawakami Y, et al. Heterotopic shift of epithelial-mesenchymal interactions in vertebrate jaw evolution. Science, 2002, 96(5571): 1316-9
- [32] Currey JD. Bones: structure and mechanics. Princeton NJ: Princeton University Press, 2002